

Membrantopologie und funktionale Charakterisierung
der Transmembrandomänen des Transportkomplexes

TAP

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Susanne Schrodtt

aus

Wächtersbach

Frankfurt am Main, 2005

D30

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Robert Tampé

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation: 06. Dezember 2005

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Schrodt*, S., Herget, M., Koch, J. and Tampé, R. (2005) Identification of an essential Cysteine for peptide binding of TAP2. In Vorbereitung

Herget, M., Oancea, G., **Schrodt*, S.**, Karas, M., Abele, R., und Tampé, R. (2005) Mapping of peptide contact sites in the transporter associated with antigen processing (TAP) by a “Trojan Horse” and crosslinking approach. Eingereicht

Schrodt*, S., Koch, J. and Tampé, R. (2005) Membrane topology of the transporter associated with antigen processing (TAP) within an assembled functional peptide-loading complex. *J. Biol. Chem.*, Published online on January 5, 2006 as Manuscript M509784200

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.

Heintke, S., Chen, M., Ritz, U., Lankat-Buttgereit, B., Koch, J., Abele, R., Seliger, B. and Tampé, R. (2003) Functional cysteine-less subunits of the transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) by de novo gene assembly. *FEBS Lett.*, **533**, 42-46

*Susanne Schrodt, geb. Heintke

Zusammenfassung

Der humane ABC-Transporter TAP (*transporter associated with antigen processing*) spielt in der Antigenprozessierung und in der MHC Klasse I-vermittelten Antigenpräsentation eine zentrale Rolle. Unter ATP-Hydrolyse katalysiert der heterodimere TAP-Komplex den Transport von proteosomal degradierten Peptiden aus dem Cytosol in das ER-Lumen. Diese werden im Peptidbeladungskomplex (PLC) auf MHC Klasse I-Moleküle geladen und zur Zelloberfläche transportiert, wo sie zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden. Die Assemblierung eines funktionalen Komplexes hängt dabei von der korrekten intra- und intermolekularen Anordnung seiner Transmembransegmente (TMS) ab. Die strukturelle Organisation des TAP-Komplexes ist schon seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Cystein-freie Proteinvarianten dienen bei der Untersuchung der Topologie als sehr gute Hilfsmittel und wurden bereits erfolgreich zur Aufklärung der Membrantopologie von komplexen Membranproteinen, wie P-glycoprotein oder der Lactose-Permease LacY, eingesetzt (Kaback *et al.*, 2001; Loo und Clarke, 1995).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden humane TAP1- und TAP2-defiziente Fibroblasten, die ansonsten alle anderen Komponenten der Antigenpräsentationsmaschinerie besitzen, stabil mit der jeweiligen humanen Cystein-freien TAP1- oder TAP2-Untereinheiten transfiziert. Alle 19 natürlichen Cysteine von TAP1 und TAP2 konnten vorher durch *de novo* Gensynthese ausgetauscht werden. Nach erfolgreicher Expression konnte ein ATP-abhängiger Peptidtransport, der spezifisch durch den viralen Inhibitor ICP47 inhibiert wurde, nachgewiesen werden. Außerdem konnte die MHC Klasse I-Oberflächenexpression der Zellen, ein Indikator einer funktionsfähigen Antigenpräsentierung, nach Transfektion mit den Cystein-freien TAP-Untereinheiten wiederhergestellt werden.

Im zweiten Abschnitt wurde die Membrantopologie des humane TAP-Transporters in einem funktionalen Peptidbeladungskomplex durch ortsspezifische Mutagenese in Kombination mit der Markierung mittels thioispezifischer Fluorophore untersucht. Durch Co-Immünpräzipitationen und Transportstudien mit radioaktiv-markierten Peptiden konnte die Funktionalität des, in Sf9 Zellen exprimierten, Cystein-freien TAP-Komplexes gezeigt werden. Einzelne Cysteine wurden aufgrund von Hydrophobizitätsanalysen in Kombination mit Sequenzvergleichen von anderen ABC-Transportern in vorhergesagte cytosolische oder ER-luminale Schleifen der TAP1-Untereinheit

eingeführt und deren Zugänglichkeit mit dem thiol-spezifischen, membran-impermeablen Fluorophor Fluoreszein-5-Maleimid in semi-permeabilisierten Zellen untersucht. Es konnte zum ersten Mal experimentell gezeigt werden, dass die Transmembrandomäne (TMD) der TAP1-Untereinheit in einem funktionalen Komplex aus zehn Transmembranhelices aufgebaut ist. Die TMD lässt sich in eine für die Heterodimerisierung, die Peptidbindung und den Transport essentielle und für viele ABC-Transporter charakteristische *Core*-Domäne, und zusätzliche N-terminale Domänen, die für die Bindung von Tapasin und die Assemblierung des PLCs verantwortlich sind, unterteilen. Somit konnte experimentell die Membrantopologie des ABC-Transporters TAP in einem funktionalen Peptidbeladungskomplex aufgeklärt werden.

Der dritte Teil der Arbeit befasste sich mit der Untersuchung der veränderten Peptidbeladungskapazität, die in Kombinationen aus wildtyp TAP1 und Cystein-freiem TAP2 beobachtet wurde. Durch ortsspezifische Mutagenese wurden einzelne Cysteine in TAP2 wiedereingeführt und deren Funktionalität in Transportstudien analysiert. Es konnte ein einzelnes Cystein in TAP2 identifiziert werden, welches die Peptidbeladungskapazität beeinflusst und durch Modifikation mit thiol-spezifischen Reagenzien zum Schalter für die Peptidbindung wird. Durch Quervernetzungsstudien mit radioaktiv-markierten Peptiden konnte weiterhin ein direkter Kontakt zwischen dem Cystein und dem gebundenen und somit transportierten Peptid des TAP-Transporters nachgewiesen werden.

Summary

The transporter associated with antigen processing (TAP) translocates antigenic peptides from the cytosol into the ER-lumen for subsequent loading onto MHC class I molecules. These peptide/MHC complexes are recognized at the cell surface by cytotoxic T-lymphocytes. Assembly of the functional peptide transport and loading complex depends on intra- and intermolecular packing of transmembrane helices (TMs).

As a central tool to investigate the structure and function of the TAP complex, cysteine-less human TAP subunits were created by *de novo* gene synthesis, replacing all 19 cysteines in TAP1 and TAP2 by other amino acids. After expression in TAP-deficient human fibroblasts, cysteine-less TAP1 and TAP2 are functional with respect to ATP-dependent peptide transport and sensitivity to the TAP-specific inhibitor ICP47 from herpes simplex virus. Cysteine-less TAP1 and TAP2 restore maturation and intracellular trafficking of MHC class I molecules to the cell surface.

In the second part of the thesis the membrane topology of human TAP1 within an assembled and functional transport complex was examined by cysteine-scanning mutagenesis. The accessibility of single cysteine residues facing the cytosol or ER-lumen was probed by a minimal invasive approach using membrane-impermeable, thiol-specific fluorophors in semi-permeabilized “living” cells. TAP1 contains ten transmembrane segments placing the N- and C-terminus in the cytosol. The transmembrane domain consists of a translocation core of six TMs, a building block conserved among most ABC-transporters, and a unique N-terminal domain of four TMs, essential for tapasin binding and assembly of the peptide-loading complex. This study provides a first map on the structural organization of the functional TAP complex.

In the last part, the peptide binding capacity of constructs with wild-typ TAP1 and Cysteine-less TAP2 was investigated. Based on Cysteine-less TAP1 and TAP2 a set of single-cysteine constructs of TAP2 were generated and one Cysteine was identified to be involved in the alteration of the peptide binding ability. The Cysteine at position 213 could restore the peptide binding capacity. Different thiol-specific reagents to modify the single Cysteine of the construct S213C could inhibit peptide binding. Furthermore crosslinking experiments revealed a direct interaction of the peptide and the Cysteine 213.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Das Immunsystem	11
1.2	Antigenprozessierung und –präsentation	12
1.3	ABC-Transporter	15
1.4	Der Peptidtransporter TAP	18
1.4.1	Strukturelle Organisation und Membrantopologie von TAP	18
1.4.2	Peptidbindung und -transport	21
1.4.3	Virale Inhibition von TAP	23
1.5	Motivation und Zielsetzung der Arbeit	25
2	Material	26
2.1	Chemikalien, Enzyme und Kits	26
2.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
2.3	Puffer und Lösungen	31
2.4	Kulturmedien	32
2.4.1	Medien und Antibiotika für die Bakterienkultur	32
2.4.2	Medien mit Antibiotika-Zusatz für die Zellkultur	33
2.5	Biologisches Material	34
2.5.1	Bakterien	34
2.5.2	Vektoren	34
2.5.3	Eukaryotische Zelllinien	34
2.5.4	Antikörper	35
2.5.5	Peptide	35
2.5.6	Oligonukleotide	36
3	Methoden	39
3.1	Mikrobiologische Methoden	39
3.1.1	Kultivierung und Konservierung von Bakterien	39
3.1.2	Herstellung von RbCl-kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	39
3.1.3	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen (DH5 α)	40
3.1.4	Transformation von BH10 Bac Zellen	40

3.2	Molekularbiologische Methoden	41
3.2.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	41
3.2.2	Enzymatische Modifikationen von DNA	41
3.2.3	Gelelektrophorese, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
3.2.4	Polymerase-Kettenreaktion	43
3.2.5	DNA-Sequenzierung	49
3.2.6	Konstruktion der Plasmide	49
3.3	Zellbiologische Methoden	51
3.3.1	Monolayerkulturen von <i>Sf9</i> Zellen.....	51
3.3.2	Schüttelkulturen von <i>Sf9</i> Zellen.....	51
3.3.3	Transfektion von <i>Sf9</i> Zellen	51
3.3.4	Virusamplifikation	52
3.3.5	Infektion von <i>Sf9</i> Zellen.....	52
3.3.6	Bestimmung des Virustiters mittels „Plaque Assay“	52
3.3.7	Kultivierung von humanen Zelllinien.....	53
3.3.8	Stabile Transfektion von TAP-defizienten Zellen.....	53
3.3.9	Herstellung und Lagerung von Gefrierkulturen.....	53
3.3.10	Analyse der MHC Klasse I-Oberflächenexpression mittels FACS.....	54
3.4	Generelle biochemische Methoden	55
3.4.1	SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	55
3.4.2	Western Blot-Analyse.....	56
3.4.3	Silberfärbung von Blot-Membranen.....	57
3.4.4	Strippen von Western Blot-Membranen	58
3.4.5	Proteinbestimmungen	58
3.5	Spezielle biochemische Methoden	59
3.5.1	Membranpräparation	59
3.5.2	Mikrosomenpräparation	59
3.5.3	Peptidjodierung mit Na ¹²⁵ J	60
3.5.4	Peptidbindungs-Assay	60
3.5.5	Peptidbindungs-Inhibitions-Assay	61
3.5.6	Peptidtransport-Assay mit semi-permeabilisierten <i>Sf9</i> Zellen	61
3.5.7	Peptidtransport-Assay mit Membranen oder Mikrosomen	62
3.5.8	Immunpräzipitation	63

3.5.9	Fluoreszenz-Markierung von Einzel-Cystein-Mutanten.....	63
3.5.10	Oxidative Quervernetzung von Cysteinen.....	64
4	Ergebnisse.....	65
4.1	Herstellung Cystein-freier TAP-Untereinheiten.....	65
4.1.1	<i>De novo</i> Gensynthese und Klonierung von Cystein-freien TAP-Untereinheiten.....	65
4.1.2	Generierung von stabil-transfizierten Zelllinien.....	66
4.1.3	Funktionsanalyse von Cystein-freiem TAP1 und TAP2.....	68
4.1.4	Wiederherstellung der MHC Klasse I-Oberflächenexpression durch Cystein-freies TAP1 und TAP2.....	70
4.2	Membrantopologie von TAP im funktionalen Peptid-Beladungskomplex.....	72
4.2.1	Expression, Heterodimerisierung und Funktion des Cystein-freien TAP Komplex.....	72
4.2.2	Generierung von TAP1 Einzel-Cystein-Mutanten.....	75
4.2.3	Membrantopologie basierend auf Cystein-Zugänglichkeit.....	78
4.2.4	Die Grösse der TAP1-Transmembrandomäne.....	82
4.2.5	TAP1 besitzt sechs zentrale Transmembransegmente.....	84
4.2.6	Die Membrantopologie der N-terminalen Domäne von TAP1.....	85
4.2.7	Die Bindung von Tapasin führt zu keiner topologischen Veränderung der N-terminalen Domäne.....	87
4.3	Cystein 213 in TAP2 – ein Schalter für die Peptidbindung an TAP? ...	89
4.3.1	Klonierung und Expression von Kombinationen aus Cystein-freiem und wildtyp TAP in Sf9 Zellen.....	89
4.3.2	Kombinationen aus Cystein-freiem und wildtyp TAP zeigen Unterschiede in der Funktionalität.....	91
4.3.3	Generierung von TAP2 Einzel-Cystein-Konstrukten.....	94
4.3.4	Konstruktion ergänzender Einzel-Cystein-Mutanten von TAP2.....	96
4.3.5	Das Cystein 213 in TAP2 ist für die Peptidbindung essentiell.....	97
4.3.6	Die Peptidbindung des Konstruktes S213C ist durch thioispezifische Reagenzien inhibierbar.....	99
4.3.7	Nonapeptide können spezifisch mit dem Konstrukt S213C quervernetzt werden.....	102

5	Diskussion	104
5.1	Funktionale Cystein-freie TAP-Untereinheiten	105
5.1.1	Herstellung und Funktionsanalyse von Cystein-freien TAP-Untereinheiten.....	105
5.1.2	Wiederherstellung der MHC Klasse I-Oberflächenexpression durch Cystein-freies TAP1 und TAP2	107
5.2	Membrantopologie von TAP im funktionalen Peptid-Beladungskomplex.....	108
5.2.1	Expression und Funktion des Cystein-freien TAP-Komplexes und Einzel-Cystein-Mutanten von TAP1	108
5.2.2	Cystein-Zugänglichkeitsstudien zur Bestimmung der Membrantopologie der TAP1-Untereinheit.....	110
5.3	Cystein 213 in TAP2 – ein Schalter für die Peptidbindung an TAP? .	114
5.3.1	Kombinationen aus Cystein-freiem und wildtyp TAP.....	114
5.3.2	Generierung von TAP2 Einzel-Cystein-Konstrukten	115
6	Literatur.....	120
7	Abkürzungen	134
8	Anhang.....	137
8.1	Plasmid-Karten	137
8.1.1	pGEM3Z TAP1dn und pCRScript TAP2dn XN.....	137
8.1.2	p46 TAP1dn und p46 TAP2dn	138
8.1.3	pFastBac Dual Expressionsvektor	139
8.1.4	Plasmidkarten von Cystein-freiem TAP und der Kombinationen aus wildtyp und Cystein-freiem TAP	140
8.1.5	Klonierungsvektor pSL1180	141
8.2	Plasmid-Liste	142
8.3	Primerliste <i>de novo</i> Gensynthese.....	149
	Danksagung.....	154
	Lebenslauf.....	155

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Im Verlauf der Evolution hat sich bei Vertebraten ein komplexes Abwehrsystem entwickelt, welches es dem Organismus ermöglicht, sich gegen den Angriff einer Vielzahl von Bakterien, Viren, Toxinen und Parasiten sowie entarteten Zellen zu schützen und zur Wehr zu setzen. Im Mittelpunkt steht die spezifische Erkennung körperfremder, schädlicher Strukturen und Substanzen und deren selektive Bekämpfung. Es wird dabei zwischen der unspezifischen (angeborenen) und der spezifischen, erworbenen (adaptiven) Immunabwehr (Engelhard, 1994) unterschieden.

Die unspezifischen Abwehrmechanismen sind bereits bei der Geburt voll ausgebildet. Sie dienen der ersten Abwehr von Erregern und basieren auf physikalischen Barrieren, phagozytierenden Zellen wie Makrophagen und Granulozyten und den natürlichen Killerzellen. Unterstützt wird die Vernichtung von körperfremden Erregern durch humorale Faktoren, wie Lysozym, C-reaktives Protein, Interferone oder dem Komplementsystem. Die natürliche Abwehr kann jedoch Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen und auch keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion geben.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der adaptiven Immunabwehr um ein hoch spezifisches Abwehrsystem, das auf der klonalen Selektion von Lymphozyten mit antigenspezifischen Rezeptoren beruht. Außerdem zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses und das Unterscheidungsvermögen zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen aus. B- und T-Lymphozyten spielen dabei eine entscheidende Rolle.

Die humorale Immunantwort (Vitetta *et al.*, 1989) wird durch B-Lymphozyten vermittelt. Diese im Knochenmark reifenden Zellen binden zellfremde Strukturen (Antigene) durch membrangebundene Immunglobuline (B-Zell-Rezeptoren) und internalisieren diese. Nach der Prozessierung der Antigene werden diese auf MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse II-Molekülen präsentiert. MHC-II-Moleküle befinden sich ausschließlich auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (pAPC) wie Makrophagen und dendritischen Zellen und präsentieren überwiegend Peptide von durch Phagozytose in die Zelle gelangten extrazellulären Pathogenen. Im Folgenden erkennen $CD4^+$ -T-Zellen (T-Helferzellen, CD = *cluster of differentiation*) spezifisch

über ihre T-Zell-Rezeptoren (TCR) und mit Hilfe des Co-Rezeptors CD4 diese Antigene und stimulieren durch Ausschüttung von Zytokinen, wie zum Beispiel Interleukin 4, die B-Lymphozyten zur Proliferation und Differenzierung zu Antikörpersezernierenden Plasmazellen. Die ausgeschütteten Antikörper markieren durch Bindung wiederum antigene Oberflächenstrukturen und führen diese so dem Abbau durch Makrophagen zu oder aktivieren das Komplementsystem. Außerdem wandelt sich ein Teil der B-Lymphozyten in sogenannte B-Gedächtniszellen um, die später durch einen zweiten Antigenkontakt unter Mithilfe von T-Zellen lösliche Immunglobuline in großen Mengen produzieren können.

T-Zellen sind die Vermittler der spezifischen zellulären Immunreaktion (Kupfer und Singer, 1989). Nach antigener Stimulation proliferieren sie und differenzieren entweder zu T-Gedächtniszellen oder zu den T-Effektorzellen, bei denen zwischen T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen (CTL) unterschieden wird. Zytotoxische T-Zellen binden über ihren T-Zell-Rezeptor in Kombination mit dem Co-Rezeptor CD8 an peptidbeladene MHC Klasse I-Moleküle (MHC-Restriktion) auf der Oberfläche von kernhaltigen Zellen. Solche aktivierten CTLs setzen anschließend Enzyme und Proteasen frei, die zu einer irreversiblen Schädigung der Zielzelle führen. Zusätzlich wird mit Hilfe von Fas-Liganden die Apoptose induziert (Janeway und Travers, 2001).

1.2 Antigenprozessierung und -präsentation

Die durch MHC I-Moleküle vermittelte Antigenprozessierung und -präsentation ist in kernhaltigen Zellen konstitutiv aktiv und wird durch inflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) erhöht (siehe Abbildung 1.1). Zelleigene und endogene Peptide werden dabei hauptsächlich durch das Proteasom, einem multikatalytischen makromolekularen Protease-Komplex, abgebaut (Baumeister *et al.*, 1998; Goldberg *et al.*, 2002). Das zylinderförmige 20S-Proteasom (~ 700 kDa) besteht aus zwei heptameren äußeren Ringen mit insgesamt 14 α -Untereinheiten, die für die strukturelle und regulatorische Funktion verantwortlich sind. Die beiden inneren Ringe werden von 14 β -Untereinheiten gebildet, die das katalytische Zentrum darstellen (Kloetzel, 2001; Löwe *et al.*, 1995). Wird das 20S-Proteasom durch zwei zusätzliche regulatorische Untereinheiten 19S, die an den jeweiligen Enden des Zylinders eine Art „Kappe“ bilden, ergänzt, so entsteht das 26S-Proteasom (~ 1500 kDa). Diese Proteasom-

Variante degradiert in erster Linie poly-ubiquitinierte Proteine unter ATP-Verbrauch zu Peptiden einer Länge von 8-22 Aminosäuren (Kisselev *et al.*, 1999).

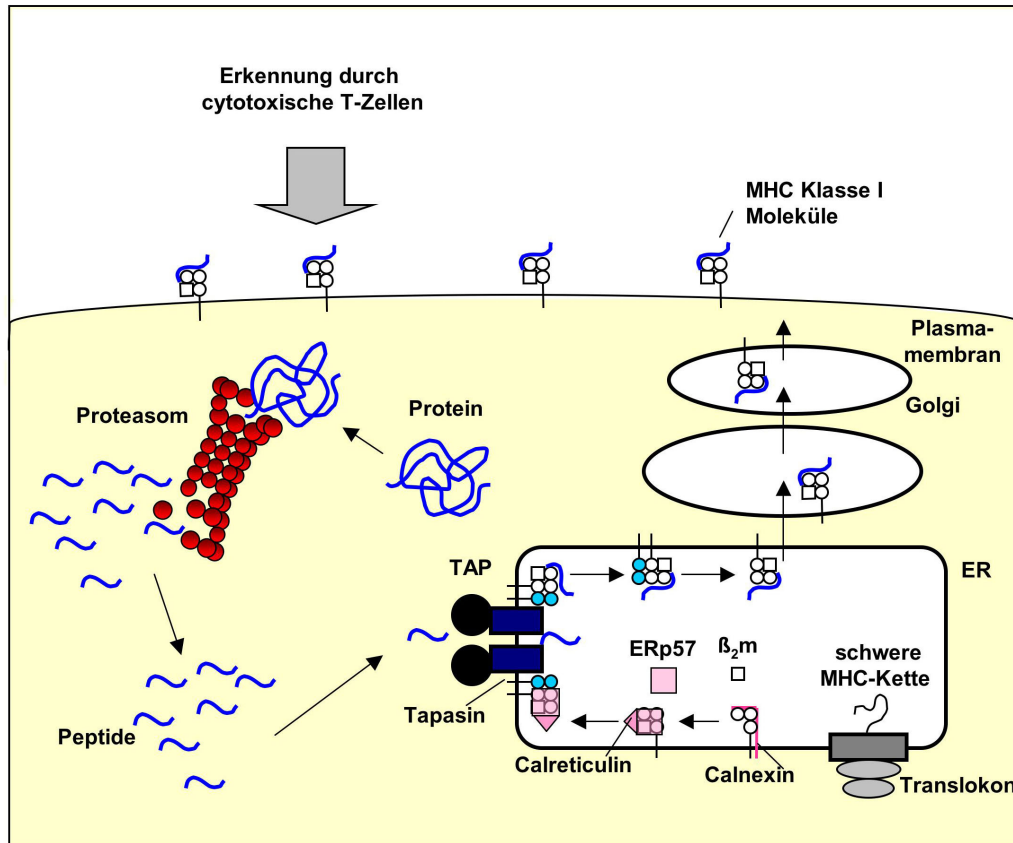


Abbildung 1.1: Der Weg der Antigenprozessierung und -präsentation über MHC I-Moleküle. Endogene Proteine werden im Cytosol durch das Proteasom zu Peptiden degradiert und durch den Transporter TAP (*transporter associated with antigen processing*) über die Membran in das ER-Lumen transportiert. Neu synthetisierte MHC I-Moleküle werden dort unter Mithilfe verschiedener Chaperone wie Calnexin und Calreticulin sowie der Oxidoreduktase ERp57 und Tapasin mit Peptiden beladen und anschließend über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert, wo sie zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden.

Wird im Zuge einer Immunantwort $\text{INF-}\gamma$ ausgeschüttet, so bildet sich durch diese Stimulation eine spezielle Proteasomen-Form in Vertebraten, das Immunproteasom. $\text{INF-}\gamma$ bewirkt dabei den Einbau von LMP2 (*low molecular weight protein*), LMP7 und MECL-1 (*multicatalytic endopeptidase complex-like protein-1*) anstelle der katalytischen β -Untereinheiten (Belich *et al.*, 1994; Früh *et al.*, 1994; Groettrup *et al.*, 1996). Diese Immunproteasomen generieren Peptide mit basischen oder hydrophoben

C-Termini, welche den Ansprüchen für einen effektiven Transport durch TAP (*transporter associated with antigen processing*) und einer hoch-affinen Bindung an MHC I-Moleküle genügen. Dennoch werden insbesondere längere Peptide zusätzlich noch durch Amino-Exopeptidasen im Cytosol oder im ER-Lumen modifiziert (Brooks *et al.*, 2000).

Die durch Degradation im Cytosol generierten Peptide müssen nun mit Hilfe des Transporters TAP in das ER-Lumen überführt werden, um dort auf MHC I-Moleküle geladen zu werden. Der komplexe Vorgang der Beladung von MHC I-Molekülen erfolgt unter Beteiligung verschiedener Proteine des makromolekularen Peptid-Beladungskomplexes (*peptide-loading complex*, PLC). MHC I-Moleküle sind ein wichtiger Bestandteil des PLCs. MHC I-Moleküle sind aus einer polymorphen, schweren Kette (*heavy chain*, HC) von 45 kDa und einer invarianten, leichten Kette von 12 kDa, dem β_2 -Mikroglobulin (β_2m) aufgebaut. Die schwere Kette ist ein Transmembran-Glycoprotein mit drei Domänen ($\alpha 1$ - $\alpha 3$), einem transmembranen und einem cytosolischen Anteil, und geht eine nicht-kovalente Bindung mit β_2m ein. Die räumliche Struktur der MHC I-Moleküle ist untrennbar mit der Bindung und der Präsentation von antigenen Peptiden verbunden (Madden, 1995). Die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen bestehen aus je vier antiparallel verlaufenden β -Faltblattsträngen, an die sich C-terminal jeweils eine α -Helix anschließt. Durch diese Anordnung wird die Peptid-Bindungsgrube gebildet. Die Peptide binden über multiple Wasserstoff- und Salzbrücken mit ihren N- und C-terminalen Resten während die zentralen Aminosäuren späterhin auf der Zelloberfläche den TCRs präsentiert werden. Nur richtig gefaltete MHC I-Moleküle können die ER-Qualitätskontrolle passieren und ihre Peptide auf der Zelloberfläche präsentieren (Paulsson und Wang, 2004).

In Abbildung 1.2 ist die Assemblierung von MHC I-Molekülen im ER unter Mithilfe von Chaperonen dargestellt. Die neu synthetisierte schwere Kette des MHC I-Moleküls wird sequenziell oder gleichzeitig durch die Chaperone BiP (*immunoglobulin binding protein*) und dem ER-Lektin Calnexin gebunden (Paulsson *et al.*, 2001). Anschließend assoziiert die Thiol-Oxidoreduktase ERp57, die für die Disulfidbrückenbildung von MHC I-Molekülen verantwortlich gemacht wird (Dick *et al.*, 2002; Hughes und Cresswell, 1998; Lindquist *et al.*, 1998) mit der schweren Kette, welche anschließend unter dem Austausch von Calnexin zu Calreticulin mit β_2m ein Heterodimer bildet. Tapsin, ein 48 kDa Typ-1 Glycoprotein, überbrückt nun die Distanz zwischen dem neu assemblierten Komplex aus der schweren Kette und β_2m , samt aller

assoziierten Chaperone und dem TAP-Transporter (Ortmann *et al.*, 1994). Tapasin stabilisiert dabei den TAP-Komplex und steigert dessen Effizienz der Peptidbindung im Cytosol (Li *et al.*, 2000). Im vollständig assemblierten PLC werden nun die MHC I-Moleküle mit Peptiden beladen und können anschließend den PLC verlassen (Ortmann *et al.*, 1994; Suh *et al.*, 1994). Die Peptidbindung stabilisiert dabei die MHC I-Moleküle und ist essentiell für den Transport über den konstitutiven, sekretorischen Weg durch den Golgi-Apparat und das Golgi-Netzwerk auf die Zelloberfläche (Grommé und Neefjes, 2002). Leere, nicht beladene MHC I-Moleküle sind instabil und verbleiben im ER oder werden nach Transport über das Translokon im Cytosol vom Proteasom degradiert (Hughes *et al.*, 1997).

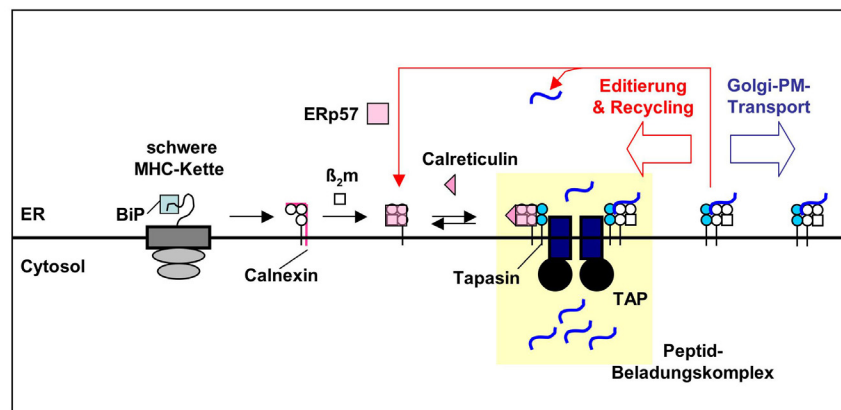


Abbildung 1.2: Assemblierung der MHC I-Moleküle im Peptid-Beladungskomplex (PLC). Neu synthetisierte schwere MHC-Ketten werden durch die Hilfe der Chaperone BiP, Calnexin und der Oxidoreduktase ERp57 mit β_2m assembliert und nach Austausch von Calnexin durch Calreticulin über Tapasin mit TAP im Peptid-Beladungskomplex assoziiert. Die durch das Proteasom degradierten und von TAP transportierten antigenen Peptide werden schließlich auf MHC I-Moleküle geladen und auf die Zelloberfläche transportiert.

1.3 ABC-Transporter

Die Superfamilie der *ATP-binding cassette* (ABC)-Proteine bildet eine der größten Familie paraloger Proteine. Vertreter dieser Superfamilie finden sich in allen bekannten Organismen von Bakterien bis hin zu Säugetieren. Das humane Genom zum Beispiel kodiert für mindestens 48 ABC-Proteine (Dean und Annilo, 2005), die sich aufgrund ihrer Sequenzhomologien in sieben verschiedene Unterfamilien, *ABCA* bis *ABCG*, einteilen lassen.

ABC-Proteine sind überwiegend Membranproteine und nehmen einer Vielzahl von zellulären Aufgaben war. Sie sind an der Nährstoffaufnahme, dem Lipidtransport, an der Ionen- und Osmolyt-Homöostase sowie an der Antigenprozessierung beteiligt. Als aktive Transporter, das heißt unter Verbrauch von ATP, transportieren sie dabei gegen einen Konzentrationsgradienten eine Fülle von chemischen Substanzen, wie zum Beispiel Kohlenhydrate, Peptide, Proteine, Steroide, Antibiotika, Metallionen sowie ein breites Spektrum an hydrophoben Substanzen. ABC-Proteine fungieren als Ionenkanal, Kanalregulator, Rezeptor, Sensor oder auch als Proteasen (Higgins, 1995). ABC-Transporter stehen im Zusammenhang mit verschiedenen pathophysiologischen Prozessen, wie der Entstehung von Mukoviszidose durch eine Mutation im Gen des Chloridkanalproteins CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*; (Riordan, 2005)), der Degenerationen der Retina (Allikmets, 2000), Defekten des Transports von Cholesterol, Gallensäuren und pflanzlichen Sterolen (Schmitz *et al.*, 2000; Sudhop und von Bergmann, 2004), der Adrenoleukodystrophie (ALD; (Mosser *et al.*, 1993)) und der Ausbildung der Multidrogenresistenz nach Überexpression von P-glycoprotein in Tumorzellen (Higgins, 1993).

Definiert wird die Proteinfamilie durch die Homologie innerhalb der ATP-Bindekassette (Walker *et al.*, 1982). Die hochkonservierten Sequenzabschnitte wie Walker A (Konsensussequenz (KS): GxxGxGKST, x= jede Aminosäure) und B (KS: $\phi\phi\phi\phi$ D, ϕ = jede hydrophobe Aminosäure) sind jeweils 5-9 Aminosäuren lang und durch 90-120 Aminosäuren voneinander getrennt. Die für ABC-Proteine spezifische C-Schleife mit der Signatursequenz LSGGQ liegt ca. 25 Aminosäuren strangaufwärts der Walker B Sequenz. Ferner existieren in Nukleotidbindungsdomänen (NBD) weitere konservierte Aminosäuren und Schleifen, wie zum Beispiel ein als katalytische Base bezeichnetes Glutamat C-terminal des Walker B Motivs (Smith *et al.*, 2002; Verdon *et al.*, 2003), die Q-Schleife, die unter Beteiligung eines H₂O-Moleküls eine Wasserstoffbrückenbindung zum γ -Phosphat des ATPs vermittelt (Chen *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2002) sowie die H- und D-Schleife (Abele und Tampé, 2004; Zaitseva *et al.*, 2005).

Die Architektur von ABC-Transportern ist trotz der Diversität der zu transportierenden Substrate konserviert. Typischerweise besteht ein ABC-Transporter aus vier Modulen: zwei Transmembrandomänen (TMD) und zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBD) (Higgins, 1992). Die Anordnung der Module ist sehr variabel (siehe Abbildung 1.3). Bei Prokaryoten werden alle vier Domänen durch separate Polypeptidketten

gebildet. Zur Verbesserung der Substrataffinität können weiterhin periplasmatische Bindungsproteine oder Membranfusionsproteine mit den jeweiligen Transportern assoziiert sein (van der Heide und Poolman, 2002). Eukaryotische ABC-Transporter können als Volltransporter mit je zwei TMDs und zwei NBDs in einer Polypeptidkette aufgebaut sein. Ein bedeutender Vertreter ist dabei P-gp, welches für die Ausschleusung vieler Chemotherapeutika aus der Zelle verantwortlich ist. Die Halbtransporter, wie TAP1/2 oder der homologe, mitochondriale Transporter Mdl1p (*multidrug resistance like*), welche aus jeweils einem TMD und NBD-Modul assembliert werden und deren funktionale Einheiten aus Homo- oder Heterodimeren bestehen, bilden eine weitere Möglichkeit der Modulanordnung.

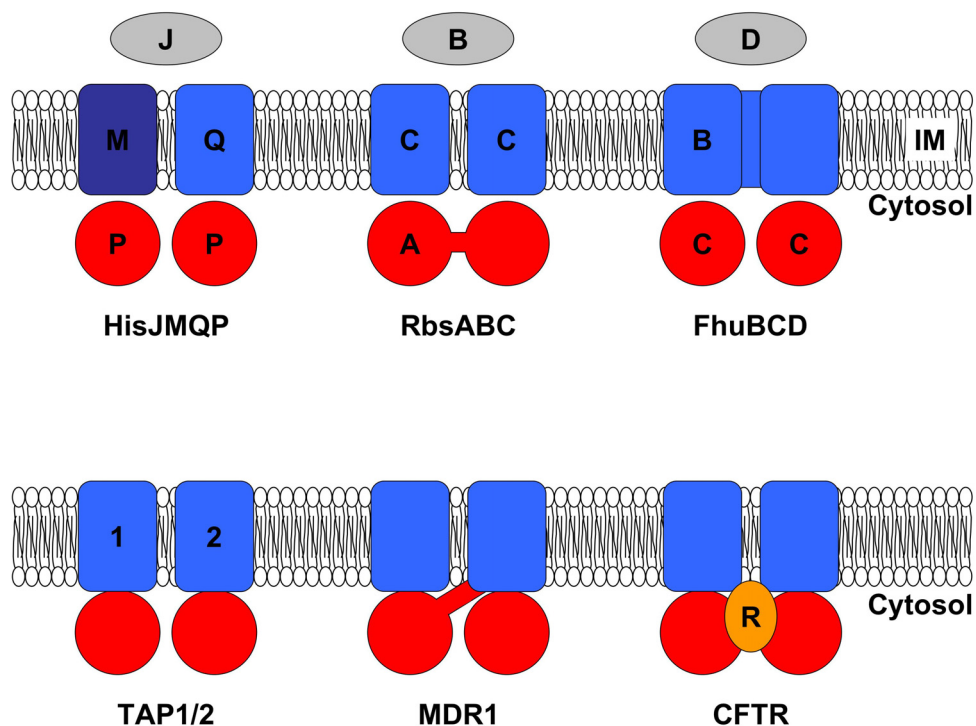


Abbildung 1.3: Organisation der Domänen von ABC-Transportern. In bakteriellen Importsystemen, zum Beispiel für Histidin, Ribose oder Eisenhydroxamat (obere Reihe), sind die vier Domänen (NBDs in rot und TMDs in blau dargestellt) normalerweise in Form von vier separaten Polypeptidketten aufgebaut (HisJMQP). Es können aber auch zwei NBDs (RbsABC) bzw. beide TMDs (FhuBCD) miteinander gekoppelt sein. Die periplasmatischen Substratbindungsproteine sind in grau dargestellt. Bei eukaryotischen Exportsystemen werden die vier Domänen durch eine (Volltransporter) bzw. zwei Polypeptidketten (Halbtransporter) gebildet. Homo- oder Heterodimere assemblieren zu einer funktionsfähigen Einheit. Exemplarisch sind hier die Domänen für den Peptid-Transporter TAP, MDR1, welches Chemotherapeutika aus Zellen transportiert, und für den Chlorid-Ionenkanal CFTR dargestellt. Die zusätzliche regulatorische Domäne R (CFTR) ist in Orange hervorgehoben (Beismann-Driemeyer und Tampé, 2004).

1.4 Der Peptidtransporter TAP

Der humane ABC-Transporter TAP ist für die Translokation antigener Peptide aus dem Cytosol in das ER-Lumen verantwortlich und spielt in der MHC I-Antigenprozessierung und –präsentation eine zentrale Rolle.

Die ersten Indizien für einen interzellulären Peptidtransporter lieferten Studien an mutierten Zelllinien, die Defekte in der Oberflächenexpression von MHC I-Molekülen aufwiesen (Hosken und Bevan, 1990). Nachdem die verantwortlichen Gene *tap1* und *tap2* im MHC-II-Lokus des menschlichen Chromosoms 6 identifiziert wurden (Trowsdale *et al.*, 1990), konnte durch Transfektion der defekten Zelllinien mit cDNA von TAP1 und TAP2 die Oberflächenexpression der MHC I-Moleküle wieder hergestellt werden (Powis *et al.*, 1991; Spies und DeMars, 1991). Desweiteren konnte in einem heterologen Expressionssystem (Insekten- und Hefezellen) ein ATP-abhängiger, intrazellulärer Peptidtransport etabliert werden, ohne dass weitere Faktoren des Immunsystems notwendig waren (Meyer *et al.*, 1994; Urlinger *et al.*, 1997). Durch Immunpräzipitations-Studien konnte gezeigt werden, dass TAP als Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2 vorliegt und in der ER- und cis-Golgi-Membran lokalisiert ist (Kelly *et al.*, 1992; Kleijmeer *et al.*, 1992; Spies *et al.*, 1992). Ein bisher unbekanntes ER-Retentionssignal verhindert eine andere Lokalisation.

1.4.1 Strukturelle Organisation und Membrantopologie von TAP

Der heterodimere Transportkomplex TAP besteht aus TAP1 (748 Aminosäuren, 81 kDa) und TAP2 (686 Aminosäuren, 75 kDa) (siehe Abbildung 1.4). Beide Untereinheiten sind aus einer hydrophoben TMD und einer konservierten NBD aufgebaut. TAP1 und TAP2 besitzen eine Sequenzhomologie von 38%. Vergleiche zwischen beiden NBDs bzw. TMDs der Untereinheiten liefern Sequenzidentitäten von 59% und 25%. Die NBD besteht aus den Aminosäuren 489-748 für TAP1 und 454-648 für TAP2 und enthält alle für ABC-Transporter charakteristischen Motive, wie Walker A, Walker B und C-Schleife, die bei der Energetisierung des Peptidtransports eine wesentliche Rolle spielen (Neefjes *et al.*, 1993b). Neuere Untersuchungen der C-Schleifen von TAP1 (LSGGQ) und TAP2 (LAAGQ) deuten daraufhin, dass dieses ABC-Signaturmotiv die Peptidtransporteffizienz kontrolliert (Chen *et al.*, 2004).

Die N-terminalen 488 und 453 Aminosäuren von TAP1 und TAP2 bilden die TMDs des Komplexes, welche die Peptidbindungsregion beinhalten (Nijenhuis und Hämerling, 1996; Nijenhuis *et al.*, 1996). Sie können in eine sogenannte „Core“-Domäne und in unique N-terminale Domänen unterteilt werden. Die für eine Vielzahl von ABC-Transportern charakteristische Core-Domäne ist essentiell und hinreichend für die Heterodimerisierung, Peptidbindung und -transport, während die unique N-terminalen Domänen für die Bindung von Tapasin und die Assemblierung des PLCs notwendig sind (Koch *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2005). Ferner enthält die TAP-Sequenz 19 intrinsische Cysteine, neun in TAP1 und zehn in TAP2 (Heintke *et al.*, 2003).

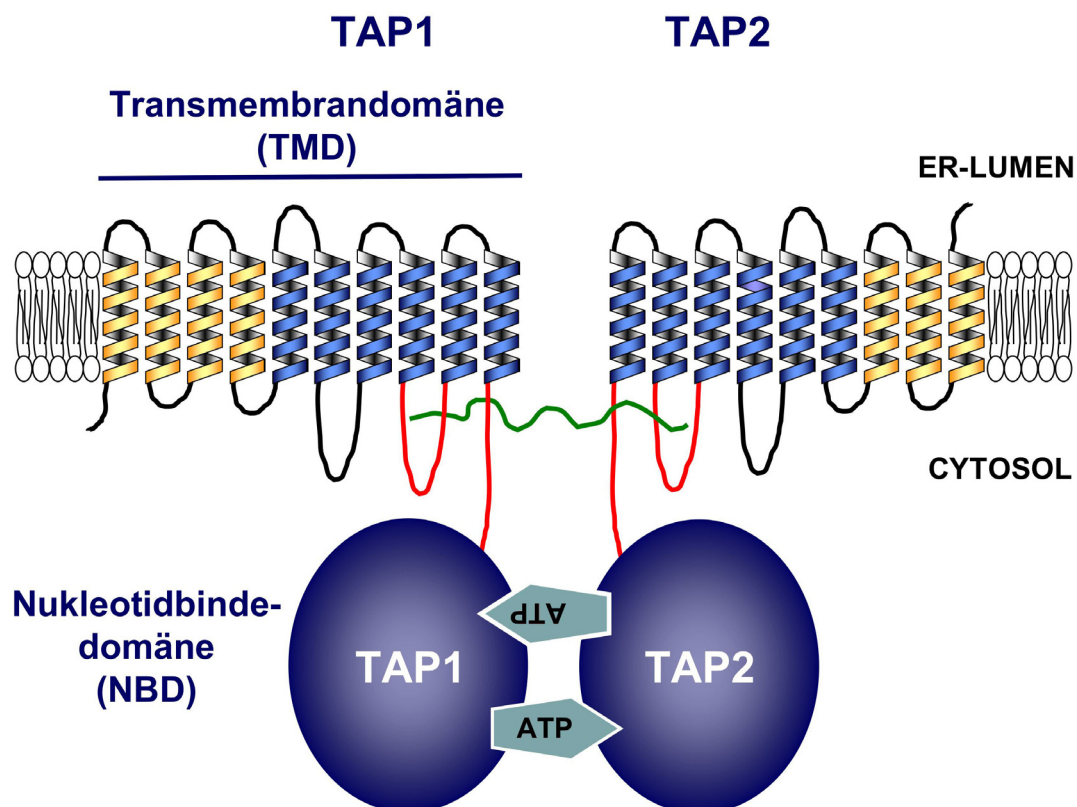


Abbildung 1.4: Strukturelle Organisation des TAP-Komplexes. TAP ist ein Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2, die sich weiterhin in eine Transmembrandomäne (TMD) und eine Nukleotidbindedomäne (NBD) unterteilen lassen. Die NBDs sind für die Energetisierung des Peptidtransportes zuständig und beinhalten die Konsensussequenzen aller ABC-Transporter, wie Walker A und B sowie die C-Schleife. Die TMDs können ferner in die sogenannte Core-Domäne (blaue Helices) und die N-terminalen Domänen (orange Helices) unterteilt werden. Die Peptidbindungsregion innerhalb der TMDs ist rot, das zu transportierende Peptid in grün dargestellt.

Mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse konnten bisher zwei Strukturen unterschiedlicher Auflösungen von bakteriellen ABC-Transportern, nämlich die des Lipid-A-Exporters MsbA (Chang, 2003; Chang und Roth, 2001; Reyes und Chang, 2005) und des Vitamin-B₁₂-Importers BtuCD (Locher *et al.*, 2002) gelöst werden. Erstaunlicherweise zeigen die Strukturen beider ABC-Transporter deutliche Unterschiede in der Anzahl und Anordnung der Transmembransegmente ihrer TMDs. Die funktionale Einheit des Halbtransporters MsbA ist ein Homodimer. Jede Untereinheit kann weiterhin in eine TMD mit sechs Transmembransegmenten, eine NBD und die α -helicale intrazelluläre Domäne (ICD) unterteilt werden. Der Vitamin-B₁₂-Transporter ist ein Heterotetramer und die beiden TMDs weisen jeweils 10 Transmembransegmente auf. Eine zentrale Schwierigkeit in der Kristallographie ist die Generierung von gut beugenden Proteinkristallen. Humane Membranproteine stellen dabei eine der größten Herausforderungen dar. Auf dem Weg zu einem beugenden Membranproteinkristall liefern biochemische Untersuchungen wichtige Informationen, um die strukturelle Organisation von Proteinen zu bestimmen.

In den letzten Jahren konnten große Fortschritte bei der Topologiebestimmung von Membranproteinen durch Verbesserungen von Vorhersagealgorithmen in der Bioinformatik und der Weiterentwicklung von biochemischen Methoden, wie der ortsspezifischen Mutagenese oder der Fusion mit Reportermolekülen, gemacht werden. Allerdings zeigte sich, dass größere Eingriffe in die natürliche Struktur von ABC-Transportern durch Fusion von verkürzten Varianten mit einem Reportermolekül, wie der β -Laktamase oder Glykosylierungssequenzen oft zu falsch integrierten oder nicht-funktionalen Proteinen führen.

Die Membrantopologie des Heterodimers TAP ist in der Literatur kontrovers diskutiert. Basierend auf Hydrophobizitätsanalysen und Vergleichen mit der Sequenz von P-gp, ebenfalls Mitglied der ABCB-Unterfamilie, konnten 10 und 9 Transmembransegmente für TAP1 und TAP2 vorhergesagt werden (Abele und Tampé, 1999; Abele und Tampé, 2004). Dagegen liefern Untersuchungen mit verkürzten oder mit Reporterproteinen fusionierten TAP-Varianten ein Topologiemodell mit acht bzw. sieben Transmembransegmenten für TAP1 und TAP2 (Vos *et al.*, 2000; Vos *et al.*, 1999). Andere Studien zur Bestimmung der Topologie von TAP basieren auf: I) Vergleichen von Sequenzen verschiedener Transmembransegmente innerhalb der TMDs (Elliott, 1997), II) der Lokalisation von Punktmutationen oder des Auftretens natürlicher Polymorphismen, welche die Peptidbindung oder den Transport beeinflussen

(Armandola *et al.*, 1996; Momburg *et al.*, 1996; Powis *et al.*, 1992a) oder III) der cytosolischen oder ER-luminalen Lokalisation von Reportermolekülen, die mit TAP-Varianten fusioniert wurden (Gileadi und Higgins, 1997; Vos *et al.*, 1999). Elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalysen von immunochemisch aufgereinigten TAP-Partikeln liefern aufgrund mangelnder Auflösung keine zusätzlichen Informationen über die Topologie von TAP (Velarde *et al.*, 2001). Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Bestimmung der Membrantopologie von ABC-Transportern aufgrund der schlecht zu definierenden Länge und Hydrophobizität der Transmembransegmente sehr schwierig ist.

1.4.2 Peptidbindung und -transport

Mittels Quervernetzungsstudien mit radioaktiv-markierten Peptiden konnte die Peptidbindungsregion des TAP-Komplexes ermittelt werden. Es stellte sich heraus, dass cytosolische Bereiche sowohl von TAP1 als auch von TAP2 an der spezifischen Bindung antigener Peptide beteiligt sind (Nijenhuis und Hämmerling, 1996; Nijenhuis *et al.*, 1996). Wie in Abbildung 1.4 rot dargestellt, befinden sich die Peptidbindungsgebiete in den Schleifen zwischen den Helices 4 und 5 der *Core*-Domäne sowie einem ca. 15 Aminosäuren langem Sequenzbereich nach Transmembransegment 6.

Die Substratspezifität des TAP-Transportes wurde intensiv untersucht. Es zeigte sich, dass Peptide mit einer Länge von 8 bis 16 Aminosäuren mit der höchsten Affinität an TAP binden, jedoch bei einer Länge von 8-12 Aminosäuren am effektivsten transportiert werden (Koopmann *et al.*, 1996; Neefjes *et al.*, 1993a; Neefjes *et al.*, 1993b; van Endert *et al.*, 1994). Allerdings werden auch längere Peptide (bis zu 40 Aminosäuren) von TAP transportiert. Darüber hinaus ist ein freier N- und C-Terminus des Peptids von großer Bedeutung. Mit Hilfe einer komplexen Peptidbibliothek konnte die Peptidspezifität von TAP aufgeklärt und eine Selektivität für basische und hydrophobe Aminosäuren am C-Terminus des Peptids ermittelt werden (siehe Abbildung 1.5). Am N-Terminus dagegen werden Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Asparagin an erster, Arginin an zweiter sowie Tryptophan und Tyrosin an dritter Position eines Peptids bevorzugt (Uebel *et al.*, 1997). Dies macht deutlich, dass es sich bei den genannten Positionen um „Ankerpositionen“ des Peptids an TAP handelt, während die dazwischen liegenden Aminosäuren späterhin von den TCRs abgetastet und erkannt werden. In einer Studie zur Analyse der Geometrie der Peptidbindungs-

tasche wurden Peptide mit sukzessive modifizierten Seitengruppen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Peptidbindungstasche um eine sehr flexible Region handeln muss, da erstaunlicherweise auch sterisch anspruchsvolle Peptide von TAP gebunden und transportiert werden (Uebel *et al.*, 1995).

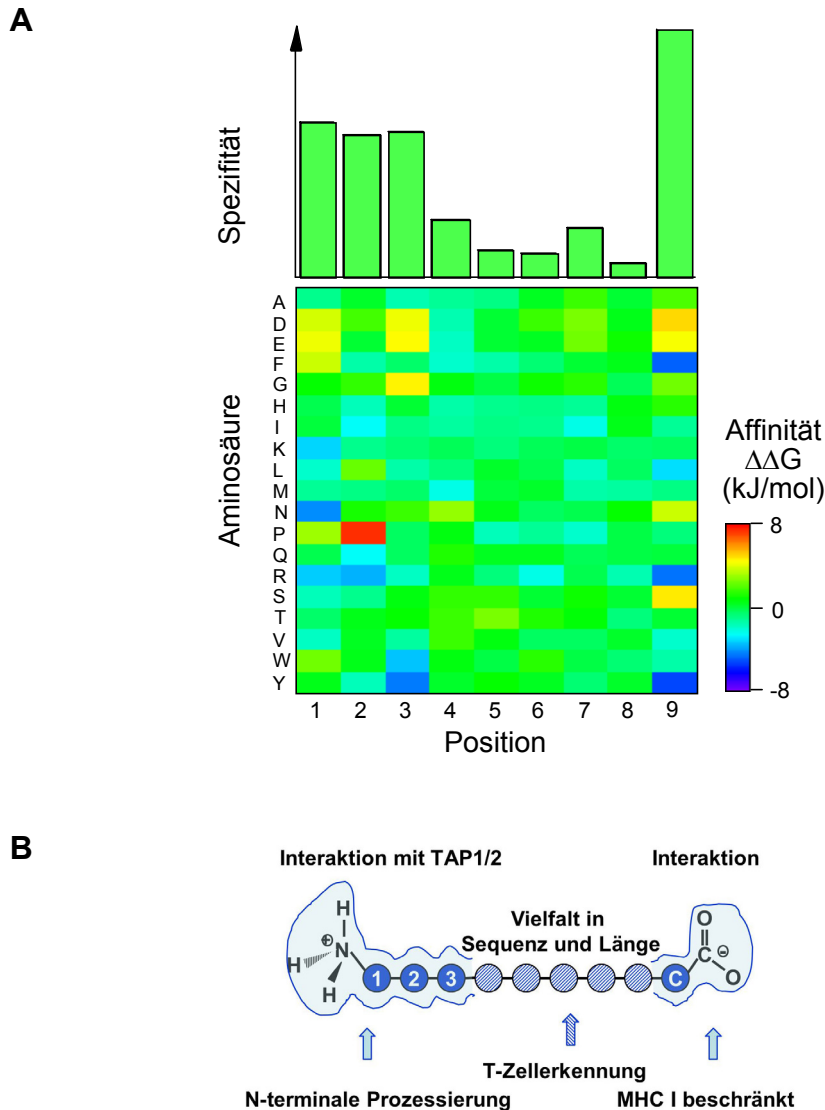


Abbildung 1.5: Peptidselektivität des TAP-Transporters. **A**, Durch Bindungsexperimente mit einer kombinatorischen Peptidbibliothek konnten an allen Positionen eines Nonapeptids die verschiedenen Aminosäurepräferenzen für TAP ermittelt werden. Favorisierte Aminosäuren werden an der entsprechenden Position in Blau (negative $\Delta\Delta G$ -Werte), schlecht bindende Aminosäuren in Rot dargestellt (positive $\Delta\Delta G$ -Werte). **B**, Modell der Peptidbindungstasche mit einem schematischen, in verschiedene Bereiche unterteilten, Peptid (Beismann-Driemeyer und Tampé, 2004).

Die Bindung der Peptide an TAP ist unabhängig von der Energetisierung des Komplexes mittels ATP. Erst wenn Peptide über die Membran transportiert werden, ist die Hydrolyse von ATP erforderlich. ATP kann bei diesem Prozess nicht durch ADP oder andere nicht-hydrolysierbare Derivate ersetzt werden (Neefjes *et al.*, 1993a; Neefjes *et al.*, 1993b; Uebel *et al.*, 1997; van Endert *et al.*, 1994). Für den komplizierten Transportzyklus wird ein Modell mit mehreren Schritten postuliert: Peptid und ATP binden unabhängig voneinander und gehen mit Konformationsänderungen in der NBD und der TMD einher, die die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i initiieren und dem Peptid die Möglichkeit geben, durch eine Pore auf die ER-luminale Seite des Transporters zu gelangen. Anschließend wird das ADP gegen ATP ausgetauscht und der TAP-Komplex wieder in seine Ausgangssituation versetzt (Abele und Tampé, 2004). Die Funktionalität beider NBDs muss für einen effizienten Peptidtransport gegeben sein. Dies konnte durch verschiedene Mutationsstudien geklärt werden (Alberts *et al.*, 2001; Daumke und Knittler, 2001; Karttunen *et al.*, 2001; Lapinski *et al.*, 2003).

Die Transportspezifität bezüglich des C-Terminus von Peptiden wird durch bestimmte Sequenzabschnitte (Aminosäuren 1-361) der humanen TAP2-Untereinheit beeinflusst. Allerdings kann eine Beteiligung der TAP1-Untereinheit nicht ausgeschlossen werden. Die Punktmutation von Aminosäure 374 A→D in TAP2 führt zu einer 70 %igen Reduktion der Transporteffizienz von Peptiden mit kleinen polaren/hydrophoben Seitenketten (Armandola *et al.*, 1996). Im Falle von Ratten-TAP konnten vier weitere Positionen, nämlich 217, 218 sowie 374 und 380 in TAP2 identifiziert werden, die ebenfalls die Transportspezifität des Komplexes beeinflussen (Momburg *et al.*, 1996).

1.4.3 Virale Inhibition von TAP

Viren haben im Laufe der Evolution verschiedene Strategien entwickelt, um einer adaptiven Immunantwort zu entkommen. Eine Möglichkeit, einen Immunzugriff zu verhindern, ist die Inhibition des ABC-Transporters TAP. Dadurch wird die MHC I-vermittelte Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche der infizierten Zelle verhindert und die Zelle somit der Erkennung durch das Immunsystem entzogen (Bauer und Tampé, 2002; Loch und Tampé, 2005). Die beiden am besten charakterisierten vira-

len Inhibitoren ICP47 (*infected cell peptide 47*), ein *immediate early* Genprodukt des Herpes simplex Virus-1 (HSV1) und US6 (*unique short region 6*) vom humanen Cytomegalievirus (HCMV) interagieren direkt mit dem TAP-Komplex.

Das 10 kDa-Polypeptid ICP47 konkurriert mit einer hohen Affinität um die Peptidbindungstelle und verhindert auf diese Weise die Bindung und den Transport des Peptides vom Cytosol ins ER-Lumen, ohne jedoch die ATP-Bindung zu beeinflussen (Ahn *et al.*, 1996; Früh *et al.*, 1995). Als aktive Region der Polypeptidkette konnten die Aminosäuren 3-34 identifiziert werden, die mit einer Affinität von 50 nM an TAP binden und zur Inhibition des TAP-Komplexes führen (Neumann *et al.*, 1997). Durch die Bindung erfährt das in wässriger Lösung unstrukturierte ICP47 eine Konformationsänderung, wobei eine Helix-loop-Helix-Struktur entsteht (Beinert *et al.*, 1997; Pfänder *et al.*, 1999). ICP47 blockiert die Peptidbindungsstelle des humanem, nicht jedoch die des murinen TAP-Komplexes (Ahn *et al.*, 1996).

Einen ganz anderen Mechanismus der Inhibition des TAP-Komplexes macht sich das Typ-1 Membranglycoprotein US6 (21 kDa) zunutze. Das im ER lokalisierte US6-Protein inhibiert durch Bindung an TAP vom ER-Lumen erstaunlicherweise die ATP-Bindung und Hydrolyse auf der cytosolischen Seite, wobei die Peptid-Bindung nicht beeinträchtigt wird (Hewitt *et al.*, 2001; Kyritsis *et al.*, 2001; Lehner *et al.*, 1997). Für den genauen Inhibitionsmechanismus wird eine induzierte Konformationsänderung von TAP, welche eine ATP-Bindung unterdrückt, favorisiert (Kyritsis *et al.*, 2001).

In neuen Studien konnte ein weiteres Genprodukt, nämlich UL49.5, des bovinen Herpesvirus-1 mit der Inhibition des TAP-Komplexes in Verbindung gebracht werden, welches durch Bindung an den PLC eine Reduktion der MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche bewirkt und den kompletten Peptid-Beladungskomplex (PLC) der proteasomalen Degradation zuführt (Ambagala *et al.*, 2005; Koppers-Lalic *et al.*, 2005; Koppers-Lalic *et al.*, 2003; Schölz, 2005).

1.5 Motivation und Zielsetzung der Arbeit

Der ABC-Transporter TAP spielt eine wichtige Rolle in der MHC-I-vermittelten Antigenprozessierung und –präsentation. Die strukturelle Organisation und die genaue Funktionsweise des Membrankomplexes steht schon seit vielen Jahren im Fokus aktueller Forschungen. Dennoch konnte bis zum heutigen Zeitpunkt keine genaue Aussage über die Membrantopologie des Heterodimers getroffen werden. Verschiedene in der Literatur kontrovers diskutierte Ansätze lieferten Topologiemodelle, die sich in der Anzahl der vorhergesagten Transmembransegmente, zwischen acht und zehn für TAP1 und sieben und neun für TAP2, deutlich unterscheiden (Vos *et al.*, 1999; Abele *et al.*, 1999; Tampé *et al.*, 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit soll mittels verschiedener Cystein-freier oder Einzel-Cystein-Konstrukten von TAP die strukturelle Organisation und die Membrantopologie des Komplexes beleuchtet werden. Zu Beginn der Arbeit lagen durch *de novo* Gensynthese hergestellte Cystein-freie *tap1* und *tap2* Gene vor.

Im ersten Abschnitt soll die Frage geklärt werden, ob der Austausch aller 19 natürlichen Cysteine der TAP-Untereinheiten durch andere Aminosäuren einen Einfluss auf die Heterodimerisierung und die Funktionalität des Peptidtransporters hat. Hierzu werden humane TAP1- oder TAP2-defiziente Haut-Fibroblasten stabil mit der jeweiligen Cystein-freien TAP-Untereinheit transfiziert und anschließend deren Oberflächenexpression von MHC I-Molekülen bestimmt. Weiterhin soll analysiert werden, ob beide Cystein-freien TAP-Untereinheiten nach Expression in Sf9 Zellen in der Lage sind, einen Heterodimer und somit einen in Peptidbindung und -transport funktionsfähigen TAP-Komplex zu bilden. Um schließlich die Membrantopologie des TAP-Komplexes untersuchen zu können, sollten durch ortsspezifische Mutagenese einzelne Cysteine in durch Hydrophobizitätsanalysen vorhergesagte cytosolische und ER-luminale Schleifen von TAP1 eingeführt werden, um später durch Markierung mit thiol-spezifischen Reagenzien deren Zugänglichkeit zu bestimmen und eine definierte Aussage über ihre Lokalisation relativ zur Membran treffen zu können.

Die dritte Fragestellung entwickelte sich im Zuge der Experimente mit Kombinationen aus wildtyp und Cystein-freien TAP1 und TAP2. Die zehn ausgetauschten Cysteine von TAP2 scheinen einen Einfluss auf die Peptidbindung des TAP-Komplexes zu haben. Welche Cysteine für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden können, soll in Untersuchungen von Einzel-Cystein-Konstrukten von TAP2 ermittelt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid-Stammlösung 30 %ig mit 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth
Adenosin-5'-triphosphat, Na ₂ -Salz (ATP)	Sigma-Aldrich
Adenosin-5'-diphosphat, Na ₂ -Salz (ADP)	Sigma-Aldrich
Agar	Invitrogen
Agarose	Sekem
Agarose für die Zellkultur	Invitrogen
AMS	Molecular Probes
Ampicillin, Na-Salz (Amp)	Carl Roth
ATP-Agarose	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich
Bluo-Gal	Carl Roth
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid Dihydrat	Merck
Calciumacetat	Carl Roth
Chloramin T	Riedel-de Haën
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich
Concanavalin A-Sepharose	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliantblau R-250	Carl Roth
Digitonin	Calbiochem
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth
n-Decyl-β-maltosid (DM)	Glycon
DMEM	PAA Laboratories
Dowex 1x8 Anionenaustauscher	Sigma-Aldrich
Dulbecco's 1 x PBS (steril)	PAA Laboratories
EDTA, Na ₂ -Salz Dihydrat	Carl Roth
Essigsäure, p.a. und technisch	Carl Roth

Ethanol (EtOH), p.a. und technisch	Carl Roth
Ethidiumbromid (1 % w/v in Wasser)	Carl Roth
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma-Aldrich
<i>Enhanced Chemiluminescence System</i> (ECL)	Amersham Pharmacia
FCS (Fötales Kälberserum)	PAA Laboratories
Fluoreszein-5-Maleimid	Molecular Probes
Fungizone	Invitrogen
G418	PAA Laboratories
Gentamycin	Carl Roth
L-Glutamin	PAA Laboratories
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Hefe-Extrakt	Carl Roth
Hygromycin B	PAA Laboratories
Hyperfilm Chemilumineszenz Film	Amersham Pharmacia
Igepal (NP40)	Sigma-Aldrich
Isopropanol, p.a. und technisch	Carl Roth
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	MBI Fermentas
Jodoacetamidoflourescein	Molecular Probes
Kaliumacetat	Carl Roth
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Kanamycin	Carl Roth
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth
Magnesiumsulfat Hydrat	Carl Roth
β -Mercaptoethanol	Carl Roth
Methanol (MeOH)	Merck
Na ¹²⁵ J	Hartmann
Natriumazid	Carl Roth
Natriummetabisulfit	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
Natriumpyruvat	PAA Laboratories
dNTPs	MBI Fermentas

Ni-NTA Sepharose	Qiagen
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories
Pepton aus Casein	Carl Roth
Pluronic F-68 (10 %)	Invitrogen
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Protein A (oder G) Agarose	Sigma-Aldrich
Salzsäure (37 % w/v)	Carl Roth
Saponin	Sigma-Aldrich
SF900II Medium	Invitrogen
Streptactin	IBA
<i>Streptavidin-alkaline phosphatase conjugate</i>	IBA
Tetracyclin	Carl Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris-Base	Carl Roth
Triton X-100	Carl Roth
Trypan Blau Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	Gibco
Trypton	Carl Roth
Tween 20	Carl Roth

Tabelle 2.1: Chemikalienliste

Enzyme / Proteine	Hersteller
AEBSF	Calbichem
AmpLigase	Biozym
Aprotinin	Calbichem
Apyrase	Sigma-Aldrich
Benzamidin	Sigma-Aldrich
Benzonase	Merck
<i>Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)</i>	Fermentas
Klenow-Fragment	New England Biolabs
Leupeptin	Sigma-Aldrich
<i>Mung Bean Nuclease</i>	New England Biolabs
Pepstatin A	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA), Frakt. V	Sigma-Aldrich

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs und MBI Fermentas
RNAse A	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega
T4 DNA Ligase, 5 U/ μ l	MBI Fermentas
T4 DNA Polymerase	MBI Fermentas
T4 Polynucleotid Kinase	MBI Fermentas
<i>Taq</i> DNA Polymerase	MBI Fermentas

Tabelle 2.2: Enzyme und Proteine

Name	Hersteller
<i>BCA-Kit</i>	Pierce
<i>Coomassie Plus™-Kit</i>	Pierce
<i>BaculoGold™ Transfections Kit</i>	BD Bioscience Pharmingen
<i>Effectene Transfection Kit</i>	Qiagen
<i>Nucleospin Plasmid Kit</i>	Macherey & Nagel
<i>Nucleobond AX100 Kit</i>	Macherey & Nagel
<i>Nucleospin Extract</i>	Macherey & Nagel
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick Spin PCR Purification Kit</i>	Qiagen
<i>QIAGEN Midi and Maxi Kit</i>	Qiagen
100 Bp DNA Leiter	MBI Fermentas
1 kBp DNA Leiter	MBI Fermentas
<i>Prestained Protein Marker, Broad Range</i>	New England Biolabs
<i>Prestained Protein Molecular Weight Marker</i>	MBI Fermentas

Tabelle 2.3: Kits und Standards

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte	Hersteller
Autoklav, 5075 ELVC	Systemec GmbH
Brutschränke	Heraeus
<i>Douncer</i> -Homogenisator (30 ml)	Braun Melsungen
Entwicklermaschine	AGFA (Curix 60)
FACS-Gerät	Coulter Epics XL MCL
Filtrationseinrichtung für Bindungs-Assay	Millipore
ELISA-Lesegerät, Polarstar Galaxy	BMG Labortechnologie
Fluoreszenz-Spektrometer, Cary-Eclipse	Varian
<i>Gamma-Counter</i> (Cobra II)	Packard
Geldokumentationssystem	Amersham-Pharmacia (Hoefer SE 660)
Gilson Pipetten; P-2, -10, -20, -200, -1000	Abimed
<i>Hamilton</i> -Spritze	Mettler-Toledo
Lumi-Imager F1™	Roche
Mikroskop	Zeiss (Axiovert 10)
Milli-Q ⁵⁰ Plus Anlage	Millipore
Multipipette	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Präzisionswaage, Kern 770	Kern & Sohn
pH-Meter	InoLab
Quarzküvette (500 µL, 1000 µL)	Hellma
Rotoren für die Ultrazentrifugation (SW 28.1, Ti 70.1)	Beckmann Instruments
SDS-Gelapparatur	BioRad
Schüttelinkubatoren	Infors
<i>Semidry-Blot</i> -Apparatur	BioRad
Spannungsgeber	BioRad
<i>Speed Vac</i> -Konzentrator	Buchofer
Thermoblock, Thermomixer compact	Eppendorf
<i>Thermocycler T-personal</i>	Whatman Biometra
Ultrazentrifuge Beckmann L-70	Beckmann Instruments
UV-Tisch UVT-20M/W	Herolab
UV-VIS-Spektrometer, Cary 50-Bio	Varian
Vakuumsstation (<i>Multiscreen Filtration System</i>)	Millipore

Vortexer, Vortex-Genie® 2	Scientific Industries
Zentrifugen: Sorvall RC 5 B Plus, Sorvall RC 3 C Plus	Kendro

Tabelle 2.4: Geräte

Name	Hersteller
Reaktionsgefäße; 1 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
PCR Gefäße	Sarstedt
Pipettenspitzen; klar, gelb, blau	Greiner Bio-One
Einmalspritzen; 1 ml	Henke-Sass, Wolf
Einmalspritzen; 5 ml, 20 ml	Braun Melsungen
Injektionskanülen	Braun Melsungen
Spritzenfilter steril, Rotilabo®, 0,45 µM	Carl Roth
Nitrozellulosemembran	Hartmann
Whatmanpapier	Hartmann
Halbmikro-Kunststoff Küvetten 1,6 ml	Sarstedt
Kryoröhrchen	Nunc
Kulturschalen, 56,7 cm ² , 21,9 cm ² , 8,8 cm ²	Greiner Bio-One
Kulturgefäße, 175 cm ² , 75 cm ² , 25 cm ²	Greiner Bio-One
Multiwell Platten, 6 Vertiefungen mit 9,6 cm ²	Greiner Bio-One
Kunststoffpipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One
Spinsäulchen	BioRad

Tabelle 2.5: Verbrausmaterialien

2.3 Puffer und Lösungen

Reagenzien für Puffer und Lösungen wurden je nach Bedarf entsprechend in Milli-Q⁵⁰-gereinigtem oder deionisiertem Wasser gelöst und gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur bzw. 4°C. Die Zusammensetzung der benötigten Puffer und Lösungen werden im jeweiligen Methodenteil aufgeführt.

2.4 Kulturmedien

2.4.1 Medien und Antibiotika für die Bakterienkultur

Luria-Broth (LB)-Medium:

Trypton	1,0 % (w/v)
Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1,0 % (w/v)

LB-Agar Platten:

LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar. Das LB-Agar-Medium wurde autoklaviert, auf ca. 50°C abgekühlt und anschließend mit den entsprechenden Antibiotika-Lösungen und je nach Bedarf mit IPTG und Bluo-Gal (Endkonzentrationen 40 µM bzw. 100 µM) versetzt.

Die Lagerung des LB-Mediums und der Selektionsplatten erfolgte bei 4°C .

SOC-Medium:

Trypton	2,0 % (w/v)
Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,05% (w/v)
KCl	2,5 mM

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von:

MgCl ₂	10 mM	(steril filtriert)
Glucose	20 mM	(steril filtriert)

Das SOC-Medium wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/l in H ₂ O	100 µg/ml
Gentamycin	7 mg/l in H ₂ O	7 µg/ml
Kanamycin	50 mg/l in H ₂ O	50 µg/ml
Tetrazyklin	10 mg/l in EtOH (70 %ig)	10 µg/ml

Tabelle 2.6: Antibiotika

Die Stammlösungen wurden steril filtriert und bei -20°C gelagert.

2.4.2 Medien mit Antibiotika-Zusatz für die Zellkultur

DMEM-Grundmedium (steril):

DMEM	500	ml
FCS _i (durch Hitze inaktiviert)	10	% (v/v)
Penicillin	100	U/ml
Streptomycin	100	µg/ml
L-Glutamin	2	mM
Natriumpyruvat	1	mM
Hygromycin	0,1	mg/ml

Selektionsmedium wurde zusätzlich noch mit

G418	0,5	mg/ml
------	-----	-------

versetzt.

Dulbecco's 1 x PBS (steril)

Trypsin-Lösung

Trypsin	0,25 %	(v/v)
---------	--------	-------

in Dulbecco's 1 x PBS

SF900 II Medium (steril):

SF900 II Medium	1000	ml
FCS _i	5	% (v/v)
Penicillin	10	U/ml
Streptomycin	100	µg/ml
Pluronic	0,2	% (v/v)
Fungizone	0,5	µg/ml

2.5 Biologisches Material

2.5.1 Bakterien

Es wurde mit folgenden *Escherichia coli* Stämmen gearbeitet:

DH5 α	F ⁻ <i>gyrA96</i> (Nal ^r) <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> (r _k -m _k +) <i>glnV44</i> <i>deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 [ϕ 80d Δ <i>lacZ</i> Δ M15], (Woodcock <i>et al.</i> , 1989); Invitrogen
DH10Bac	F- <i>mcrA</i> D(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galk</i> λ - <i>rpsL</i> <i>nupG</i> / bMON14272 / pMON7124; Invitrogen

2.5.2 Vektoren

pCRScript	Stratagene
pGem3Z	Promega
pSL1180	Pharmacia
pFastBac Dual	Invitrogen

Eine Liste aller in diese Arbeit klonierten Plasmide ist dem Anhang (siehe Kapitel 8.2) beigefügt.

2.5.3 Eukaryotische Zelllinien

BRE-169	(de la Salle <i>et al.</i> , 1994; de la Salle <i>et al.</i> , 1999)
STF-169	(de la Salle <i>et al.</i> , 1994; de la Salle <i>et al.</i> , 1999)
Sf9	Invitrogen, (ATCC Nr. CRL1711)

2.5.4 Antikörper

Name	Typ	Gerichtet gegen	Erkennungsregion
148.3	monoklonal (Maus)	TAP1	CYWAMVQAPADAPE
435.3	monoklonal (Maus)	TAP2	NBD
429.3	monoklonal (Maus)	TAP2	NBD
1p1	polyklonal (Kaninchen)	TAP1	GRLTDWILQDGSA
2p2	polyklonal (Kaninchen)	TAP2	RIREQLFSSLL
7F6	monoklonal (Ratte)	Tapasin	

Tabelle 2.7: TAP- und Tapasin-spezifische Antikörper (vergleiche Tabelle 3.2: **Antikörper-verdünnungen**)

Name	Firma
HLA-ABC-FITC	Beckmann/Coulter
IgG _{2a} -FITC	Beckmann/Coulter
α -His	Sigma-Aldrich
Streptactin-HRP	Dianova
<i>Goat-α-mouse</i> -HRP	Sigma-Aldrich
<i>Goat-α-rabbit</i> -HRP	Sigma-Aldrich

Tabelle 2.8: Kommerziell erhältliche Antikörper

2.5.5 Peptide

Peptid	Sequenz
C4F	RRYCKSTEL, Cystein gekoppelt mit Fluorophor
NSTCL	RRYQNSTCL, Cystein gekoppelt mit Fluorophor
NSTEL	RRYQNSTEL
R9LQK	RRYQKSTEL
ICP47 (2-34)	SWALEMADTFLDTMRVGPRTYADVR- DEINKRGR

Tabelle 2.9: Peptide für Peptidbindung und Transport

2.5.6 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von der Firma MWG oder von Sigma-Genosys als Lyophilysat bezogen und mit sterilem Wasser auf 100 μ M verdünnt. Alle Stocklösungen wurden bei -20°C gelagert.

Name	5'-Sequenz-3'
TAP1CI_S6C	GGCTTCCTCCAGATgtCCTGCTCCTAGA
TAP1EI_A51C	CCCTGCTGGTCCCTACctgCCTGCCTCTG
TAP1CI_A87C	GCTCCAAGTCCGAAAActgTGGCGCTCAGG
TAP1EI_S124C	CGCTCCCGGGTgtGCTGACTCCACCAGA
TAP1CI_S179C	GACTGCTGGGCTgtCTGGGTTCG
TAP1EI_S220C	GCAGGATGGCTgtGCTGACACCTT
TAP1EI_S326C	GGGCTCCGTCTgtCTGACTATGG
TAP1EI_S326C-n	GTGGGGCTCCGTCTgCCTGACTATGGTGACCCTG
TAP1CI_T399C	TGCAGGAAATCAAGtgCCTGAACCAGAAGGA
TAP1EI_S436C	ACTGGTGACCTgtGGCGCTGTGAG
TAP1EI_S436C-n	GGCCAACTGGTGACCTgtGGCGCTGTGAGCTCTG
TAP1CI_S488C	ACCCCTAGATgtCCACCTAGTGGC
TAP2 dn XhoI	CCGCTCGAGATGAGACTGCCTGAC
TAP2 dn NsiI	CCAATGCATTCAACCACCGAA
TAP2dn_S197C	CTTCTTCATGtgCCTGTTCTCCTTCG
TAP2dn_A209C	CTGTCCGCTGGTtgCAGAGGCGGTTC
TAP2dn_A209+S213C	CCGCTGGTtgCAGAGGCGGTgtTTCACCTAC
TAP2dn_A209+S213C-n	CCTGTCCGCTGGTtgCAGAGGCGGTgtTTCACCTAC
TAP2dn_S213C	CAGAGGCGGTgtTTCACCTACAC
TAP2dn_S353C	CACGAAGTCTgtAGATACAAGGAAG
TAP2dn_S353C-n	GAACACGAAGTCTgtAGATACAAGGAAGCTCTG
TAP2dn_S362C	GCTCTGGAACAGTgtAGACAGC
TAP2dn_V394C	TGATGCTGTCCtgCGGTCTGCAAC

Tabelle 2.10: Klonierungsprimer für TAP1 und TAP2. Die mutierten Basen sind mit kleinen Buchstaben dargestellt.

Name	5'-Sequenz-3'
pcDNA 5'	ACGACTCACTATAGGGAGACC
TAP1 Pos.428	CTGACAACGAAGGCGGTAGG
TAP2 Pos.471	ACCTGGTCCTGCTCCTTCTC
Primer 14	CAGCTCGAGATGTGGGGCTCCCATC- CAACCGCTTTC
M13 forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

Tabelle 2.11: Kontroll-Primer für die genomische bzw. Bacmid-PCR für TAP1 und TAP2

Name	5'-Sequenz-3'
TAP1-Seq0F	GTGCTGCAAGGCGATTAAGT
TAP1-Seq0R	GGCCAGGCCCCAGAGCAGC
TAP1-Seq1F	GGGGATCCATGGCTTCC
TAP1-Seq2R	CGCGTGAAGGTGTCAGC
TAP1-Seq3F	CTGCTCTGGGCCTGGCC
TAP1-Seq4F	GGTTCCGAAACCAGAAGAC
TAP1-Seq4R	AGGGCCAGGCCTCTGAC
TAP1-Seq5F	GTCAGAGGCCTGGCCCTG
TAP1-Seq6F	TGCTATGCCTACCGTCAGAT
TAP1-Seq6R	AGCAGGCCACTAGGTGG
TAP1-Seq7F	CCACCTAGTGGCCTGCTG
TAP1-Seq8F	CAAGCCTCTGCCTCAGTACG
TAP1-Seq8R	AGTGGGCCCCGGACTTG
TAP1-Seq9F	GACCTGGCGAAGTCACC
TAP1-Seq10R	ACAAGCTTTCAGTGATGGTG
Seq pSL1180	GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGT

Tabelle 2.12: Sequenzierungsprimer für *tap1*. Zur vollständigen Sequenzierung von *tap1* wurden folgende Primer verwendet: TAP1-Seq0F, 4F, 6F und 8F.

Name	5'-Sequenz-3'
TAP2-Seq1F	GGGGATCCATGAGACTGC
TAP2-Seq2F	GTAAAACGACGGCCAGTGAG
TAP2-Seq2R	AGCAGGAGGAGCCCTGG
TAP2-Seq3F	CCAGGGCTCCTCCTGCTAG
TAP2-Seq4F	ACACTACTCCGGCAGAGTCA
TAP2-Seq4R	GGACGTTAGCGTTTAAAGG
TAP2-Seq5F	GCCTTTAAACGCTAACGTC
TAP2-Seq6F	AGGTCGTCAGAGAAGCTGTC
TAP2-Seq6R	ACGGACAGCATCAGCATC
TAP2-Seq7F	GAGCCCTGTACCTGCTGG
TAP2-Seq8R	ACAGGCCTATCAGGTCTG
TAP2-Seq9F	GACCTGGCGAAGTCACC
TAP2-Seq10R	AGCCCTTTTCGCCGACATC
TAP2-Seq11F	ATGTCCGCGAAAAGGGC
TAP2-Seq12R	ACAAGCTTTCAACCACCG

Tabelle 2.13: Sequenzierungsprimer für *tap2*. Zur vollständigen Sequenzierung von *tap2* wurden folgende Primer verwendet: TAP2-Seq2F, 4F, 6F und 8F.

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Die Kultivierung der Übernachtskulturen von *E. coli* DH5 α Zellen erfolgte bei 37°C und 200 rpm in LB-Medium (3–100 ml). Zur Selektion wurde dem autoklavierten Medium das Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml zugesetzt. Im Falle der Anzucht von DH10Bac Zellen erfolgte die Selektion mit Hilfe der Antibiotika Kanamycin (50 μ g/ml), Tetrazyklin (10 μ g/ml) und Gentamycin (7 μ g/ml).

Zur dauerhaften Konservierung der *E. coli* Stämme wurden Glycerinkulturen angelegt, indem 800 μ l einer stationären Übernachtskultur mit 200 μ l 85 % (v/v) sterilem Glycerin gemischt und bei –80°C aufbewahrt wurden.

3.1.2 Herstellung von RbCl-kompetenten *E. coli* Zellen

Für die Herstellung von RbCl-kompetenten Zellen (Hanahan, 1985) eines *E. coli* Stammes (DH5 α bzw. DH10Bac) wurden diese als Vorkultur ohne Zugabe von Antibiotikum über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag 50 ml LB-Medium 0,5 %ig angeimpft und bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD₅₅₀ = 0,3-0,4 inkubiert und anschließend langsam auf Eis abgekühlt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter Eiskühlung oder bei 4°C (Zentrifuge) ausgeführt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 2000 x g wurde das Pellet vorsichtig in eiskaltem, sterilen TFB I Puffer (30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl und 15 % Glycerin; auf pH 5,8 mit 1 M HAc eingestellt) resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10 min bei 3000 x g. Das entstandene Pellet wurde abschließend in 2 ml TFB II Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ und 15 % Glycerin; auf pH 6,8 mit 1 M KOH eingestellt) resuspendiert und in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert (100 μ l), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen (DH5 α)

Zur Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli* Zellen (DH5 α) wurden diese zunächst 30 min auf Eis aufgetaut und dann vorsichtig mit 5-10 μ l des Ligationsproduktes gemischt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen, wurden die Zellen eine Minute lang einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und nochmals für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Regeneration der Zellen für eine Stunde in 1 ml vorgewärmtem LB-Medium bei 37°C unter Schütteln. Anschließend wurden 100 μ l des Transformationsansatz direkt auf vorgewärmten Selektionsplatten (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausplattiert, während die restlichen 900 μ l 1 min bei 1000 x g abzentrifugiert, das Pellet in 100 μ l resuspendiert und dann ausplattiert wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation für mindestens 12 h bei 37°C im Brutschrank. Die gewachsenen Kolonien wurden mittels einer DNA-Minipräparation (siehe 3.2.1) und nachfolgendem Restriktionsverdau (siehe 3.2.2) oder einer Kolonie-PCR (siehe 3.2.4.3) analysiert.

3.1.4 Transformation von BH10 Bac Zellen

Die Transformation von DH10Bac-Zellen wurde ähnlich zu der von DH5 α -Zellen durchgeführt. Die Regenerationsphase der Zellen verlängerte sich aufgrund der zusätzlichen Antibiotika-Resistenzen allerdings auf 4 h bei 37°C unter Schütteln, außerdem wurde SOC-Medium als Nahrungsquelle verwendet. Der Transformationsansatz wurde auf vorgewärmten Selektionsplatten (mit Gentamycin, Kanamycin und Tetrazyklin), die außerdem 100 μ g/ml Bluo-Gal und 40 μ g/ml IPTG enthielten, ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag konnten blaue und weiße Kolonien unterschieden werden. Weiße Klone wurden auf frische Selektionsplatten transferiert und weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Die Überprüfung der durch Minipräparation (siehe 3.2.1) isolierten Bacmid-DNA erfolgte durch PCR (siehe 3.2.4.4).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden 2 ml Minikulturen, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, mit frisch isolierten Kolonien von Agarplatten inokuliert. Die Kulturen wurden 8-12 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend 5 min bei 2000 x g pelletiert. Um reine und salzarme DNA für Sequenzierungsreaktionen zu erhalten, wurde die Isolation mit Hilfe des *NucleoSpin Plasmid Kits* von Macherey & Nagel durchgeführt. Für Restriktionsanalysen erfolgte die Aufreinigung der Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

Das Zellpellet wurde in 300 µl TE-Puffer (15 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA und 100 µg/ml RNase A; pH 8.0) aufgenommen, mit 300 µl alkalischem Lysepuffer (0,2 M NaOH, 1 % SDS) vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Zur Abtrennung von chromosomaler DNA, Proteinen und Zelltrümmern erfolgte die Zugabe von 300 µl schwach saurem Neutralisationspuffer (3 M Kaliumacetat; pH 5,5). Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde der flockig, weiße Niederschlag für 10 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 800 µl Isopropanol versetzt und nach sorgfältigem Mischen 15 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde nun einmal mit 80 %igem EtOH gewaschen und bei RT getrocknet und schließlich in 20–50 µl autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen.

Plasmid-DNA für Transfektionsansätze wurde in größerem Maßstab mit Hilfe des *Nucleobond AX100 Kits* von Macherey & Nagel entsprechend des Herstellerprotokolls isoliert.

3.2.2 Enzymatische Modifikationen von DNA

Die Restriktionsanalysen von Plasmid-DNA wurden nach allgemein üblichen Standardvorschriften (Sambrook, 1989)) durchgeführt. Es wurden Restriktionsendonukleasen verschiedener Hersteller (New England Biolabs, MBI Fermentas) verwendet. Ein Standardansatz enthielt 1/10 Volumenanteil des vom Hersteller entsprechend empfohlenen 10x Puffers und eventueller Zusätze wie z.B. BSA und maximal die gleiche Menge an Restriktionsenzym. Die Ansatzgröße betrug zwischen 10-20 µl

für Kontrollanalysen, wohingegen 50-100 µl für präparative Ansätze verwendet wurden. Die Restriktionsenzyme wurden meist im Überschuss eingesetzt, in der Regel 2–10 U/µg DNA. Die Reaktionsdauer variierte zwischen 45 min und 4 h. Je nach Anwendung wurden die Reaktionen abschließend durch Inkubation bei 65–80°C für 20 min inaktiviert. Wurden zwei Restriktionsenzyme gleichzeitig in einem Ansatz verwendet, erfolgte die Pufferwahl nach den Empfehlungen der Hersteller, falls notwendig wurden Spaltungen mit unterschiedlichen Reaktionstemperaturen und Puffern sequenziell durchgeführt. Die Auftrennung der Ansätze erfolgte elektrophoretisch im DNA-Agarosegel (siehe 3.2.3).

Die durch Spaltung entstandenen DNA-Fragmente haben je nach verwendetem Restriktionsenzym entweder glatte (*blunt-end*) oder 5' oder 3'-überhängende (*sticky-end*) Enden. Zum Auffüllen der 5'-überhängenden DNA-Fragmente wurde das Enzym Klenow-Fragment (MBI Fermentas) verwendet. Im Ansatz von 20 µl wurden 0,1–4 µg Restriktionsansatz mit 0,5 µl dNTPs (2 mM), 2 µl Klenow-Puffer (10x) und 1-5 U Klenow-Fragment für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend 10 min bei 70°C inaktiviert.

Wurden 5' oder 3'-überhängende DNA-Fragmente abgebaut, so kam die einzelstrang-spezifische Endonuklease zum Einsatz. Dem Reaktionsansatz wurden 0,1 µg/µl DNA, 1/10 Volumeneinheit des entsprechenden Puffers (NEB 1-4) und 1 U *Mung Bean* Nuklease (New England Biolabs) pro µg DNA zugeben und 30 min bei 30°C inkubiert. Da eine Hitzinaktivierung nicht möglich war erfolgte die Aufreinigung der modifizierten DNA mit Hilfe des QIAquick Spin PCR Purification Kits.

Das Enzym Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (*Calf intestine alkaline phosphatase* = CIAP, MBI Fermentas) katalysiert die Hydrolyse von 5'-Phosphatgruppen von DNA, wodurch eine Religation von Vektor-DNA nach erfolgreichem Restriktionsverdau verhindert wird. Im Reaktionsansatz wurden 1-20 pmol DNA-Termini mit 1/10 Volumeneinheit des optimalen Puffers (MBI) und 1 U Enzym für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 15 min bei 85°C inaktiviert.

Die Ligierungsreaktion wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei einer Temperatur von 16°C bzw. RT durchgeführt, wobei die Reaktionszeit zwischen 1 h und 12 h variiert wurde. Die DNA Menge im Reaktionsansatz betrug 50–40 ng. Je nach Beschaffenheit der zu ligierenden DNA-Fragmente (*sticky-end* oder *blunt-end*) wurden 2 bzw. 4 U Ligase eingesetzt.

Für eine Transformation von *E. coli* DH5 α Zellen wurden jeweils 5–10 μ l des Ansatzes eingesetzt.

3.2.3 Gelelektrophorese, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von Nukleinsäuren zu analytischen oder präparativen Zwecken erfolgte in Abhängigkeit ihrer Größe mit Hilfe von Agarosegelen im elektrischen Feld. Es wurde die entsprechende Menge an Agarose abgewogen, in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA; pH 8,0) aufgelöst und in der Mikrowelle aufgekocht. Die gut gemischte, schlierenfreie Agaroselösung wurde blasenfrei in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Anschließend wurden die 0,7-2 %igen Agarosegele in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Laufkammer überführt. Die zu trennenden DNA-Proben wurden mit 6 x DNA-Auftragspuffer (60 mM EDTA, 60 % Glycerin, 0,09 % Bromphenolblau, 0,09 % Xylencyanol) gemischt, auf das Gel aufgetragen und bei 20–150 mA getrennt. Als Längenstandard wurden jeweils 5 μ l des jeweiligen Markers eingesetzt. Anschließend wurde das Gel 30 min in wässriger Ethidiumbromid-Lösung (5 μ g/ml) gefärbt. Durch Interkalation des Ethidiumbromids konnten die DNA-Banden am UV-Durchlichttisch (312 nm) sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert werden.

Zu präparativen Zwecken wurden getrennte DNA-Fragmente aus einem Agarosegel isoliert. Die Banden wurden mit einem sterilen Skalpell vorsichtig ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus der Agarose erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits nach Anleitung des Herstellers.

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch Extinktionsmessungen bei 260 nm, wobei eine $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 ng/ μ l doppelsträngiger DNA entsprach. Alternativ wurde die Konzentration von DNA-Lösungen durch Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentration im Agarosegel abgeschätzt.

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) ist es möglich DNA-Matrizen (*templates*) sequenzspezifisch zu amplifizieren. Die DNA-Moleküle werden im ersten Schritt durch Hitze denaturiert, um die Hybridisierung der komple-

mentären Oligonukleotidprimer zu ermöglichen. Die eingesetzte DNA-Polymerase synthetisierte im Folgenden ausgehend von den Primern in 5'→3'-Richtung den neuen DNA-Strang. Der Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung wiederholt sich je nach Anwendung 20–35 mal, wobei die neu synthetisierten Tochterstränge jeweils im nächsten Zyklus als Matrize fungieren. Auf diese Weise entsteht schon im dritten Zyklus doppelsträngige DNA, die der Länge des Abstands zwischen zwei Primern entspricht. Die Vervielfältigung der Zielsequenz verhält sich annähernd logarithmisch, so dass am Ende einer PCR-Reaktion genügend DNA amplifiziert wurde, um das Produkt elektrophoretisch auf einem DNA-Agarosegel zu analysieren.

Zur Amplifikation der *tap*-Gene und zum Austausch von Schnittstellen wurde für alle Reaktionen die *Pfu* DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991) eingesetzt, welche eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität (*proofreading*) besitzt, die die Fehlerrate der Reaktion reduziert. Das Reaktionsvolumen lag je nach Klonierungsstrategie zwischen 50–100 µl. Ein Standardreaktionsansatz für eine präparative PCR enthielt zwischen 0,1 und 10 ng DNA-Matrize und je 25 pmol der beiden benötigten Primer. Zusätzlich wurden noch folgende Reagenzien eingesetzt:

5 µl	<i>Pfu</i> Puffer (10x)
4 µl	dNTPs (2 mM)
1,5 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase [2,5 U/µl]
33,5 µl	autoklaviertes Aqua bidest.

Folgendes Temperatur-Protokoll kam zum Einsatz:

95°C	3 min	} 35x
95°C	1 min	
55°C	30 sec	
72°C	4 min	
72°C	10 min	
4°C	Pause	

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt (siehe 3.2.3).

3.2.4.1 Ortsspezifische Mutagenese

Zur Herstellung verschiedener Einzel-Cystein-Mutanten von TAP wurde die *Ligase chain reaction* (LCR) Technik angewandt. Hierbei wurde die erwünschte Punktmutation durch einen mutagenen Primer eingeführt. Als Matrize dienten die Vektoren pGem3Z TAP1dn und pCRScript TAP2dn. Die mutagenen Primer für TAP1 und TAP2 sind in Tabelle 2.10 aufgelistet. Während der PCR wurde der durch die DNA-Polymerase *Pfu* synthetisierte komplementäre DNA Strang sofort durch die im Ansatz befindliche thermostabile Ligase (AmpLigase) ligiert. Auf diese Weise entsteht pro Zyklus eine einzelsträngige, zirkuläre DNA. Parentale DNA wurde nach Abschluss der PCR durch einen *Dpn I* Verdau entfernt und der Ansatz direkt in RbCl-kompetente DH5 α Zellen transformiert.

Zunächst wurden die mutagenen Primer nach folgendem Protokoll phosphoryliert:

2 μ l	Primer [100 μ M]
2 μ l	Kinase-Puffer [10 x]
2 μ l	ATP [10 mM]
1 μ l	T4 Polynukleotid-Kinase [10 U/ μ l]
13 μ l	autoklaviertes Aqua bisdest.

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und 10 min bei 70°C inaktiviert.

Anschließend erfolgte die Mutagenese-PCR nach folgendem Protokoll:

1 μ l	DNA-Template [ca 150 ng]
10 μ l	PCR-Puffer [mit 20 mM MgSO ₄]
2 μ l	mutagener Primer, phosphoryliert [Endkonz. 0,2 μ M]
10 μ l	dNTPs [2mM]
1 μ l	NAD [100 mM]
1 μ l	AmpLigase [2,5 U/ μ l]
1 μ l	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase [2,5 U/ μ l]
74 μ l	autoklaviertes Aqua bidest.

Folgendes Temperatur-Protokoll kam zum Einsatz:

95°C	1 min	
95°C	1 min	} 30x (typischerweise 2 min pro 1 kBp <i>template</i>)
55°C	1 min	
65°C	10,5 min	
65°C	10 min	
4°C	Pause	

Die Hybridisierungstemperatur wurde je nach mutagenem Primer zwischen 50-55°C variiert. Das PCR-Produkt wurde anschließend 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Dpn I* verdaut, Hitze inaktiviert (20 min bei 80°C) und 5-10 µl des Ansatzes in RbCl-kompetente DH5α-Zellen transformiert (siehe 3.1.3) Am folgenden Tag wurden Kolonien gepickt, Plasmid-DNA über Mini-Präparation (siehe 3.2.1) aufgereinigt und sequenziert.

3.2.4.2 Genomische PCR

Zum Nachweis der stabilen Transfektion von BRE- und STF-Zelleinzelklonen wurde eine PCR durchgeführt und genomische DNA als Matrize verwendet. Hierzu wurden $1-5 \times 10^4$ Zellen pro Ansatz pelletiert, in 20 µl sterilem H₂O resuspendiert und in ein PCR-Gefäß überführt. Die Denaturierung der Zellen erfolgte für 10 min bei 95°C im PCR-Gerät, gefolgt von einem Verdau der Proteine durch Zugabe von 5 µl Proteinase K (2 mg/ml) für 1 h bei 55°C und anschließender Inaktivierung des Enzyms für 10 min und 80°C. Nun erfolgt die Zugabe des PCR-Mastermixes (500 µl für 20 Proben á 25 µl):

100 µl	<i>Taq</i> Puffer [10x]
80 µl	dNTPs [5mM]
30 µl	MgCl ₂ [25 mM]
10 µl	Sense-Primer [100 µM]
10 µl	Antisense-Primer [100 µM]
20 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase [5 U/µl]
250 µl	autoklaviertes Aqua bidest.

Folgendes Temperatur-Protokoll kam zum Einsatz:

95°C	60 sec	} 40x
60°C	72 sec	
72°C	80 sec	
72°C	5 min	
4°C	Pause	

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch im Agarosegel augetrennt.

3.2.4.3 Kolonie-PCR

Diese PCR wurde an frisch gepickten *E. coli* Kolonien von LB-Agar-Platten durchgeführt, um eine aufwendigere Plasmid-Aufreinigung zu vermeiden. Zur Identifikation positiver Kolonien wurden insertspezifische Primer eingesetzt und auf deren Amplifikate gescreent. Der Mastermix (300 µl, je 15 µl Reaktionsvolumen) für 20 ausgewählte Kolonien hatte typischerweise folgende Zusammensetzung:

30 µl	<i>Taq</i> Puffer [10x]
4 µl	dNTPs [2 mM]
30 µl	MgCl ₂ [25 mM]
4 µl	Sense-Primer [100 µM]
4 µl	Antisense-Primer [100 µM]
4 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase [5 U/µl]
224 µl	autoklaviertes Aqua bidest.

Der Mastermix wurde in den PCR-Gefäßen auf Eis vorgelegt und die Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher vorsichtig in Reaktionsgefäße überführt. Das PCR-Temperaturprofil erforderte eine längere Denaturierungsphase, um die Plasmid-DNA für die Amplifikation zugänglich zu machen:

Folgendes Temperatur-Protokoll kam zum Einsatz:

95°C	4 min	} 30x
95°C	4 min	
60°C	30 sec	
72°C	2 min	

72°C	10 min
4°C	Pause

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgt anschließend im DNA-Agarosegel (siehe 3.2.3).

3.2.4.4 *Bacmid-Kontroll-PCR*

Zur Kontrolle der Transposition in DH10Bac Zellen wurde mit sequenzspezifischen Primern und den M13-Kontrollprimern (siehe Tabelle 2.11) eine PCR folgenden Ansatzes (Mastermix 500 µl für 20 Ansätze á 25 µl) durchgeführt:

50 µl	<i>Taq</i> Puffer [10x]
50 µl	dNTPs [2 mM]
50 µl	MgCl ₂ [25 mM]
5 µl	Sense-Primer [100 µM]
5 µl	Antisense-Primer [100 µM]
5 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase [5 U/µl]
300 µl	autoklaviertes Aqua bidest.

Folgendes Temperatur-Protokoll kam zum Einsatz wobei die Hybridisierungstemperatur je nach Primer zwischen 50-52°C variierte :

95°C	4 min	} 30x
95°C	1 min	
50°C	1 min	
72°C	5 min	
72°C	10 min	
4°C	Pause	

Die Kontrolle der PCR-Produkte erfolgte anschließend im Agarosegel. Bei einer erfolgreichen Transposition wurde für TAP1 ein ~2500 Bp und für TAP2 ein ~2000 Bp-Fragment erwartet

3.2.5 DNA-Sequenzierung

Alle Konstrukte wurden von der Firma *Scientific Research and Development GmbH* nach der Kettenabbruch-Methode mittels Fluoreszenz-markierter Nukleotide nach Sanger sequenziert (Sanger *et al.*, 1977).

3.2.6 Konstruktion der Plasmide

3.2.6.1 Humane Expressionsvektoren

Zur Klonierung der Cystein-freien *tap1* und *tap2* Gene in den humanen Expressionsvektor p46, ein pCMVires Neo-Derivat (Arbeitsgruppe Seeliger, Mainz) wurden diese aus ihren jeweiligen Klonierungsvektoren pGEM3Z TAP1dn und pCRScript TAP2dn über Restriktion (siehe 3.2.2) ausgeschnitten. Für *tap1* wurde der Klonierungsvektor zuerst mit *HindIII* geschnitten und die entstandene überhängende Schnittstelle anschließend mittels Klenow-Fragments (siehe 3.2.2) aufgefüllt. Dann erfolgte eine weitere Restriktion durch *BamHI*. Der Expressionsvektor p46 wurde mit *NotI* geöffnet, die Schnittstelle durch das Klenow-Fragment aufgefüllt und anschließend mit *BamHI* geschnitten. Nach der Ligation (siehe 3.2.2) wurde der für die Transfektion von humanen Zellen verwendete Expressionsvektor p46TAP1dn durch Sequenzierung (siehe 3.2.5) überprüft (Plasmidkarte siehe Abbildung 8.2). Für *tap2* konnte die Klonierung fast analog durchgeführt werden. Der Klonierungsvektor pCRScript wurde zuerst mit *HindIII* geschnitten und durch das Klenow-Fragment aufgefüllt bevor eine weitere Restriktion mit *BamHI* erfolgte. Der Expressionsvektor wurde in diesem Fall mit *XhoI* geöffnet, mittels Klenow-Fragment aufgefüllt und schließlich mit *BamHI* geschnitten. Der nach Ligation entstandene Vektor p46TAP2dn wurde durch Sequenzierung überprüft (Plasmidkarte siehe Abbildung 8.2).

3.2.6.2 Konstruktion der Plasmide zur Herstellung von rekombinanten Baculoviren für eine Expression in Sf9 Zellen

Für eine Expression in Sf9 Zellen wurden die Cystein-freien *tap1* und *tap2* Gene in den Vektor pFastBac Dual kloniert, der zwei Promotoren (p10 und Polyhedrin) besitzt. Hierzu wurde Cystein-freies *tap1* über Restriktion durch *BamHI* und *HindIII* aus dem Klonierungsvektor pGem3Z TAP1dn herausgeschnitten und unter der Kontrolle

des Polyhedrin-Promotors in pFastBac Dual eingefügt. Ergänzt wurde der Vektor durch *tap2*, welches mittels *NsiI* und *XhoI* ausgeschnitten und durch den p10-Promotor reguliert wurde. Das entstandene Plasmid trägt die Bezeichnung pFastBac Dual TAP1dn/TAP2dn XN, das resultierende Protein wurde mit Cystein-frei (Cys-frei) bezeichnet.

Für das Konstrukt Cys-frei/wt wurde *tap1* analog zu oben in den Vektor pFastBac Dual kloniert. Die wildtyp *tap2* Sequenz wurde durch Restriktion mit *NotI*, Klenow-Behandlung und anschließender Restriktion mit *NsiI* aus dem Expressionsvektor p46TAP2 wt ausgeschnitten und in den mit Schnitt durch *XhoI*, Klenow-Behandlung und anschließender Restriktion mit *NsiI* geöffneten pFastBac Dual TAP1dn kloniert. Dieser Vektor wurde mit pFastBac Dual TAP1dn/TAP2wt bezeichnet.

Die Klonierung des umgekehrten Konstrukts wt/Cys-frei erfolgte ausgehend vom Vektor pFastBac Dual TAP1wt, der von M. Chen zur Verfügung gestellt wurde (Chen, 2004). Das Cystein-freie *tap2* wurde mittels *XhoI* und *NsiI* Restriktion aus pSL1180 TAP2dn XN ausgeschnitten mit wildtyp *tap1* im Vektor pFastBac Dual TAP1wt/TAP2dn kombiniert.

Die Plasmidkarten sind im Anhang in Abbildung 8.4 zu finden.

3.2.6.3 Konstruktion der Einzel-Cystein-Konstrukte von TAP1 und TAP2

Die Klonierung der Einzel-Cystein-Konstrukte von TAP1 erfolgte ausgehend vom Vektor pGem3Z TAP1dn. Durch ortsspezifische Mutagenese (siehe 3.2.4.1) wurden mittels der in Tabelle 2.10 aufgeführten Oligonukleotide einzelne Cysteine in die *tap1* Sequenz eingefügt und erfolgreich mutierte Gene nach *BamHI* und *HindIII* Restriktion in den Vektor pFastBac Dual eingeführt und mit Cystein-freiem *tap2* über *XhoI* und *NsiI* kombiniert. Die resultierenden Plasmide wurden mit pFastBac Dual TAP1 (Position des Einzel-Cysteins)/TAP2dn bezeichnet.

Für die Konstruktion der Einzel-Cystein-Konstrukte von TAP2 wurde der Vektor pCRScript TAP2dn XN als *template* für die ortsspezifische Mutagenese mit denen in Tabelle 2.10 aufgeführten Oligonukleotiden eingesetzt. Die durch Sequenzierung überprüfte, mutierte *tap2* Sequenz wurde nach Restriktion mit *XhoI* und *NsiI* in den Vektor pFastBac Dual kloniert und mit Cystein-freiem *tap1* über *BamHI* und *HindIII* kombiniert. Die resultierenden Plasmide wurden mit pFastBac Dual TAP1dn/TAP2 (Position des Einzel-Cysteins) bezeichnet.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Monolayerkulturen von Sf9 Zellen

Spodoptera frugiperda (Sf9) Monolayerkulturen wurden in modifizierten SF900 II Medium kultiviert. Vor jeder Passagierung einer konfluenten Kultur (T75, 75 cm² Wachstumsfläche) wurde das Medium und die nicht-adherenten Zellen (*floaters*) abgesaugt, 10 ml vorgewärmtes Medium zugegeben und die Zellen durch leichtes Klopfen der Kulturflasche von deren Boden abgelöst. Für die Aussaat einer neuen Monolayerkultur wurden 2,5 ml der Zellsuspension in 10 ml SF900 II Medium verdünnt und in eine frische T75-Flasche überführt und bei 27°C inkubiert. Überschüssige Zellen wurden zu Schüttelkulturen expandiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

3.3.2 Schüttelkulturen von Sf9 Zellen

Sf9 Zellen für Schüttelkulturen wurden aus einer in SF900 II Medium kultivierter Monolayerkultur angezogen. Die Stammkulturen wurden in entsprechenden Volumen von 20–500 ml und einer Zelldichte von 0,4–2,6 x 10⁶ Zellen/ml bei 27°C im Schüttler kultiviert. Zur Vermeidung einer stationären Phase der Zellen (5–6 x 10⁶ Zellen/ml) wurden die Schüttelkulturen mit frischem Medium bis zu einer Zelldichte von 0,4 x 10⁶ Zellen/ml verdünnt.

3.3.3 Transfektion von Sf9 Zellen

2 x 10⁶ Sf9 Zellen wurden in 35 mm Kulturschalen ausgesät und für eine Stunde bei 27°C inkubiert. Die Kultur sollte dabei eine Konfluenz von 50–70 % erreichen. Die Transfektion wurde mit Hilfe des Baculo Gold Transfection Kits (BD Bioscience Pharmingen) durchgeführt. Nach Absaugen des Mediums und der Zugabe von 1 ml Puffer A, wurde tropfenweise Puffer B mit der zuvor gelösten Bacmid-DNA (5 µg) zum Ansatz pipettiert. Nach 4 h Inkubation bei 27°C wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch 3 ml frisches Sf900 II Medium ersetzt. Die transfizierten Kulturen wurden 5–7 Tage bei 27°C inkubiert bevor der rekombinate Virusstock (P₀) geerntet wurde.

3.3.4 Virusamplifikation

Zur Virusamplifikation P_1 (10 ml) wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät und 1 h bei 27°C inkubiert und anschließend mit 2 ml des P_0 Virusstocks, der typischerweise einen Virustiter von 1×10^7 pfu (*plaque forming units*)/ml besitzt, für 5-7 Tage bei 27°C amplifiziert. Um 200 ml an rekombinatem Virus (P_2) für Proteinexpressionen zu erhalten wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml mit 1,5 ml P_1 Virusstock infiziert und 5–7 Tage bei 27°C inkubiert. Nach der Ernte (Zentrifugation für 20 min bei $5000 \times g$ und 4°C) ist der Virusüberstand bei 4°C im Kühlschrank mehrere Monate lagerbar.

3.3.5 Infektion von Sf9 Zellen

Zur heterologen Expression von rekombinanter Proteine wurden 200–500 ml Schüttelkulturen in SF900 II Medium in Fernbach-Kolben bis zu einer Zelldichte von $1,6$ – $1,8 \times 10^6$ Zellen/ml bei 27°C kultiviert und mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 1-5 mit P_2 Virus infiziert. Die Kultivierung erfolgte 48-72 h bei 27°C bis zu einer Totenrate von maximal 30 % der Zellen. Geerntet wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei $1500 \times g$ und 4°C . Das entstandene Zellpellet wurde mit 30 ml PBS gewaschen und anschließend bei -20°C gelagert.

3.3.6 Bestimmung des Virustiters mittels „Plaque Assay“

Zur Bestimmung des Titers eines Virusstocks wurden 1×10^6 Zellen in 35 mm Kulturschalen ausgesät und 1 h bei 27°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Virusstocks von 10^{-1} bis 10^{-7} in SF900 II Medium angesetzt, das Medium der ausgesäten Zellen abgesaugt und durch 1 ml der jeweiligen verdünnten Stocklösung ersetzt und 1 h bei 27°C inkubiert. Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen jeweils mit 3 ml Baculovirus-Agarose (1 % in 100 ml SF900 II Medium ohne Pluronic) pro Kulturschale überschichtet und 5 Tage bei 27°C inkubiert. Das Anfärben der Plaques erfolgte für 2 h bei 27°C mit 0,1 %iger Neutral-Rot-Lösung in PBS. Nach Absaugen der Färbelösung wurden die Kulturen erneut über Nacht bei 27°C inkubiert und die entstandenen Plaques am nächsten Tag ausgezählt und der Titer über folgende Formel bestimmt:

$$\text{pfu/ml} = (\text{Anzahl der Plaques}) \times (\text{Verdünnung}^{-1}).$$

Zur Anzucht von Einzel-Klonen wurden die Plaques vorsichtig mit einer dünnen Kapillare ausgestochen und in 21 mm Kulturschalen mit 1×10^6 Zellen überführt und bei 27°C inkubiert.

3.3.7 Kultivierung von humanen Zelllinien

TAP1-defiziente BRE-Zellen (BRE.TAP1^{-/-}, Klon 1-169) und TAP2-defiziente STF-Zellen (STF.TAP2^{-/-}, Klon 1-169) sind aus Patienten isolierte, adherent wachsende Hautfibroblasten (de la Salle *et al.*, 1999). Sie wurden bei 37°C, einer CO₂-Konzentration von 5 % und einer relativen Feuchtigkeit von 95 % im Brutschrank kultiviert.

Die Zellen wurden aus einem Kryostock vorsichtig bei 37°C aufgetaut und anschließend in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt und für 5 min bei 200 x g und RT zentrifugiert. Nach Absaugen des Einfriermediums wurden die Zellen in frischen DMEM resuspendiert und in einer T75 Flasche kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von fast 100 % erreicht hatten, wurde das Medium abgezogen, einmal mit PBS gewaschen und 1,5 ml Trypsin-Lösung für 5 min zugegeben. Die abgelösten Zellen wurden für 5 min und 200 x g bei RT abzentrifugiert, 1:4 verdünnt und in eine neue Kulturflasche überführt.

3.3.8 Stabile Transfektion von TAP-defizienten Zellen

24 h nach Aussaat von 1×10^5 BRE.TAP1^{-/-} oder STF.TAP2^{-/-} Zellen, wurden die Kulturen mit 0,5 µg linearisierter Plasmid-DNA unter Verwendung des *Effectene Transfection Kits* (Qiagen) nach Herstellerprotokoll transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde mit der Selektion durch Zugabe von 100 µg/ml Hygromycin und 500 µg/ml Neomycin (G418) in DMEM begonnen. Das Selektionsmedium wurde alle zwei Tage erneuert und die Zellen gegebenenfalls passagiert. Nach 5–6 Wochen wurden G418-resistente, durch genomische PCR (siehe 3.2.4.2) überprüfte, positive Zellklone isoliert und für spätere Analysen weiter kultiviert.

3.3.9 Herstellung und Lagerung von Gefrierkulturen

Zum Einfrieren von Fibroblasten wurden diese in T75-Flaschen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert, trypsinisiert und 5 min bei 200 x g und RT abzentrifugiert.

giert. Das Zellpellet wurde anschließend vorsichtig in 1,5 ml Kryomedium (50 ml FCS mit 10 % DMSO) resuspendiert, in die Kryoröhrchen überführt und in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox langsam auf -80°C abgekühlt. 48 h später wurden die Gefierkulturen in einen Stickstofftank überführt und dort für Jahre gelagert.

3.3.10 Analyse der MHC Klasse I-Oberflächenexpression mittels FACS

Zur Überprüfung der MHC Klasse I-Oberflächenexpression von stabilen Zelllinien wurde die Methode der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) verwendet.

5×10^5 Zellen wurden trypsiniert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 30 min auf Eis mit dem HLA-ABC-FITC Antikörper im Dunkeln inkubiert. Dieser Fluoreszenz-markierte Antikörper ist spezifisch gegen alle MHC Klasse I-Subtypen gerichtet. Zur Isotypen-Kontrolle wurde ein weitere Ansatz mit dem Antikörper IgG2a-FITC ebenfalls für 30 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 5000 lebende Zellen im FACS-Gerät (Coulter Epics XL MCL, Beckmann/Coulter) analysiert.

3.4 Generelle biochemische Methoden

3.4.1 SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem spezifischen Molekulargewicht erfolgte unter denaturierenden Bedingungen über eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach dem von Laemmli (Laemmli, 1970) beschriebenen Verfahren. Es wurden Acrylamidanteile im Trenngel von 10 % und im Sammelgel von 5 % verwendet. SDS-PAGE-Minigel wurden in einer Mini-Protean 3 Casting-Kammer (Biorad) mit einer Plattengröße von 10,1 x 8,2 mm und einer Geldicke von 0,75 mm gegossen. Die pH-Werte der Trenn- und Sammelgelpuffer wurden mit HCl eingestellt. Die Puffer hatten folgende Zusammensetzung: Trenngel-Puffer (1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS; pH 8,8), Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS; pH 6,8). Die Acrylamid-Lösung aus 30 % Acrylamid und 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid wurde von Roth bezogen. Ammoniumperoxidisulfat (APS) wurde als 10 % Stock-Lösung in Aqua bidest. angesetzt und Aliquots bei -20°C gelagert.

Zur Herstellung der Mini-Gele wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Lösungen bis auf APS und TEMED zusammenpipettiert, gut gemischt und anschließend zum Start der radikalischen Polymerisation die beiden fehlenden Reagenzien zu gegeben. Das Trenngel wurde zügig in die vorbereitete Kammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach 20-minütiger Polymerisation wurde das Isopropanol abgezogen und das Sammelgel analog zum Trenngel hergestellt und gegossen. Je nach Anzahl der Proben wurden Kämme mit 10 bzw. 15 Taschen eingesetzt.

Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit 2 x SDS-Probenpuffer (100 mM Tris-HCl, 4 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 0,85 M β -Mercaptoethanol; pH 6,5) versetzt und 15 min bei 65°C erhitzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Gel für 1-1,5 h in 1 x Elektrophoresepuffer (10 x Elektrophoresepuffer: 250 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS, 1,94 M Glycin; pH 8,3). Als Standard wurde ein *Prestained Protein Marker* verwendet.

	Sammelgel	Trenngel
	5 %	10 %
Acrylamid	0,65 ml	3,10 ml
Sammelgelpuffer	1,10 ml	-
Trenngelpuffer	-	3,95
H ₂ O	2,70 ml	3,95
APS	45 µl	60 µl
TEMED	15 µl	30 µl

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels nach Laemmli

3.4.2 Western Blot-Analyse

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels Elektrotransfer im Semidry-Verfahren nach Kyhse-Anderson (Kyhse-Andersen, 1984) auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert und so der immunchemischen Analyse zugänglich gemacht (Western Blotting).

Die SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurde wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben durchgeführt und anschließend das Sammelgel vorsichtig mit einem Skalpell vom Trenngel abgetrennt. Für den Transfer wurden zwei dicke Whatmanpapiere (8,5 x 7,5 cm) und die Nitrozellulosemembran gleicher Größe in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,03 % SDS, 20 % Methanol) eingeweicht und in folgender Reihenfolge auf die Graphit-Kathode (-) der Semidry-Blot-Apparatur (Biorad) geschichtet: Whatmanpapier, Nitrozellulosemembran, SDS-Gel, Whatmanpapier. Eventuelle Luftblasen wurden durch walzen mit einem 50 ml-Reaktionsgefäß entfernt. Der Proteintransfer erfolgte nach Auflegen der Graphit-Anodenplatte (+) für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 75 mA pro Gel.

Um die Transfereffizienz zu bestimmen wurde die Nitrozellulosemembran nach abgeschlossenem Transfer für 1 min mit einer Ponceau-S-Färbelösung (0,1 % Ponceau S, 1% Eisessig) inkubiert und anschließend Hintergrundfärbung mit Aqua bidest. entfernt. Die roten Proteinbanden sollten nach erfolgreichem Transfer deutlich zu erkennen sein, gleichzeitig wurden die Banden des Proteinstandards markiert.

Zur immunchemischen Analyse wurde die Membran 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockpuffer (20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl; pH 8,0 mit 2 % (w/v) Milchpulver) unter horizontalem Schwenken inkubiert, anschließend 3 x 5 min mit TBS-T (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20) gewaschen und mit dem primären Antikörper (Verdünnungen siehe Tabelle 3.2) für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C versetzt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem Zweit-Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte nach erneutem Waschen mit TBS-T eine Inkubation von 3 min mit ECL-I- (100 mM Tris-HCl, 2,5 mM Luminol, 0,4 mM Coumarinsäure; pH 8,5) und 1 min mit ECL-II-Lösung (100 mM Tris-HCl, 18 µM H₂O₂; pH 8,5). Die unter enzymatischer Umsetzung des Substrats auftretende Chemilumineszenz im Bereich des Immunkomplexes wurde mit Hilfe des Lumi Imagers F1TM detektiert und digitalisiert.

Antikörper	Verdünnung	Gerichtet gegen
148.3	1:20	TAP1
435.3	1:10	TAP2
429.3	1:10	TAP2
7F6	1:20	Tapasin
α-His	1:2000	His-Tag
Streptactin	1:5000	Strep-Tag
Goat-α-mouse-HRP	1: 30.000	Maus-IgG
Goat-α-rabbit-HRP	1: 30.000	Kaninchen-IgG

Tabelle 3.2: Antikörperverdünnungen

3.4.3 Silberfärbung von Blot-Membranen

Es ist auch möglich Proteine durch eine Silberfärbung auf einer Nitrozellulosemembran nachzuweisen. Hierzu wurden die Membranen nach dem Transfer 10 min in frischer Färbelösung (2 % Na-Citrat, 0,8 % FeSO₄, tropfenweise AgNO₃ mit einer Endkonzentration von 2 % zugeben) inkubiert und anschließend unter fließendem H₂O bidest entfärbt. Wurde anschließend noch ein immunchemischer Nachweis der Proteine durchgeführt, so musste die Membran zweimal für 5 min im Entfärber (15 µM K₃[Fe(CN)₆] und 50 mM Na₂S₂O₃) inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit

H₂O bidest gewaschen werden. Dann schloss sich eine Western Blot-Analyse (siehe 3.4.2) an.

3.4.4 Strippen von Western Blot-Membranen

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, gebundene Antikörper von einer Nitrozellulosemembran zu entfernen, um so eine erneute Detektion mittels eines weiteren Antikörpers durchzuführen. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran erst 5 min in TBS-T geschwenkt und anschließend 15 min bei RT in *Stripping*-Puffer (250 mM Glycin; pH 2,5) inkubiert und 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Danach konnten unspezifische Bindungsplätze der Membran erneut mit Blockpuffer abgesättigt werden und eine weitere Western Blot-Analyse (siehe 3.4.2) durchgeführt werden.

3.4.5 Proteinbestimmungen

Die Proteinkonzentration der Membran- und Mikrosomenpräparation wurde spektroskopisch mittels folgender Formel (Lottspeich, 1998) bestimmt:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = (1,55 \times A_{280 \text{ nm}}) - (0,76 \times A_{260 \text{ nm}})$$

Alternativ wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe eines BCA (Bicinchoninsäure)-Tests (Smith *et al.*, 1985) bzw. des *Coomassie-PlusTM Kits* (Pierce) nach den Protokollen der Hersteller ermittelt.

3.5 Spezielle biochemische Methoden

3.5.1 Membranpräparation

Zur Präparation von Membranen wurden gefrorene Zellpellets ($2,0 \times 10^6$ Zellen/ml) mit dem dreifachen Volumen an Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl; pH 7,4) in Anwesenheit von 1 mM DTT und Proteaseinhibitoren-Mix (P_i-Mix: 50 µg/ml AEBSF, 1 µg/ml Aprotinin, 150 µg/ml Benzamidin, 10 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml Pepstatin A) überschichtet, langsam auf Eis aufgetaut und mit einem Glashomogenisator aufgeschlossen. Zellkerne und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 4 min bei 200 x g, gefolgt von 8 min bei 700 x g und 4°C abgetrennt und das Pellet erneut homogenisiert. Der gesammelte Überstand wurde anschließend 30 min bei 100.000 x g und 4°C in der Ultrazentrifuge sedimentiert, das Pellet mit 15 ml PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen und aliquotiert. Die Aliquots (50-200 µl) wurden in flüssigem Stickstoff Schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Konzentration der Membranen wurde mit Hilfe des *Coomassie Plus™ Kits* (Pierce) bestimmt (siehe 3.4.5).

3.5.2 Mikrosomenpräparation

Zur Präparation von Mikrosomen wurden gefrorene Zellpellets aus 300-500 ml Sf9 Schüttelkulturen (2×10^6 Zellen/ml) mit dem dreifachen Volumen an Cavitation-Puffer (50 mM Tris-HCl, 250 mM Sucrose, 25 mM K-Acetat, 5 mM Mg-Acetat, 0,5 mM Ca-Acetat; pH 7,4) in Anwesenheit von 1 mM DTT und P_i-Mix überschichtet und langsam auf Eis aufgetaut. Das Pellet wurde anschließend mit einem Glashomogenisator aufgeschlossen und die Zellkerne und Trümmer 4 min bei 200 x g, gefolgt von 8 min bei 700 x g und 4°C abgetrennt. Nach erneuter Homogenisierung und Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt und mit dem 3,08 fachen einer 2,7 M Sucrose-Lösung (50 mM Tris-HCl, 2,7 M Sucrose, 150 mM K-Acetat und 5 mM Mg-Acetat; pH 7,4) und 1 mM DTT vermischt. Zur Auftrennung wurde ein Sucrose-Gradient gegossen, indem die Zell-Sucrose-Suspension in Ultrazentrifugenröhrchen mit jeweils 5 ml einer 1,8 M und 0,4 M Sucrose-Lösung überschichtet wurden. Die Zentrifugation erfolgte über Nacht bei 100.000 x g und 4°C. Die Mikrosomen wurden aus der Zwischenschicht zwischen 1,8 und 0,4 M Sucrose vorsichtig abgezogen, mit dem gleichen Volumen an PBS versetzt und erneut 30 min bei 160.000 x g und 4°C pelletiert.

Im Anschluss wurde das Mikrosomenpellet in 2 ml PBS resuspendiert, die Gesamtprotein-Konzentration spektroskopisch (siehe 3.4.5) ermittelt und die Mikrosomen mit PBS auf eine Endkonzentration von 5 mg Gesamtprotein/ml verdünnt. Nach dem Einfrieren mit flüssigem Stickstoff wurden die Mikrosomen-Aliquots (20-200 μ l) bei -80°C gelagert.

3.5.3 Peptidjodierung mit Na^{125}J

Zur Jodierung von Tyrosinresten in Peptiden wurde die Chloramin T-Methode (Hunter und Greenwood, 1964) leicht modifiziert. Hierzu wurden 10 μ l des jeweiligen Peptids (500 μM) in 40 μ l PBS (pH 7,0) mit 10 μ l Chloramin T (1 mg/ml) und 1 μ l Na^{125}J (entspricht 100 μCi) für 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 120 μ l NaS_2O_5 (0,17 mg/ml) gestoppt. Freies Jod wurde mit Hilfe einer Anionenaustauscher-Chromatographie aus Dowex 1x8 Material aufgereinigt. Dazu wurden 10 mg getrocknetes Dowex 1x8 Material in PBS (pH 7,0 sublementiert mit 0,2 % dialysiertem BSA) äquibriert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. 220 μ l der Dowex-Suspension wurden zu dem Jodierungsansatz gegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Mit Hilfe eines Zentrifugationssäulchens (Biorad) wurde der Überstand mit dem jodierten Peptid (2,3 μM) durch Zentrifugation für 30 sec bei 1000 x g vom Säulenmaterial getrennt und bei 4°C abgeschirmt gelagert.

3.5.4 Peptidbindungs-Assay

Verwendet wurden Multiscreen Filter Platten (*MultiScreen Assay Systeme*, Milipore), die einen Durchsatz von 96 parallelen Proben ermöglichten. Zur Peptidbindung an TAP in Membranen und Mikrosomen wurden 25 μg Gesamtprotein in 50 μ l eiskaltem PBS mit 1 mM MgCl_2 in 96-Well-Platten resuspendiert und mit der entsprechenden Konzentration an radioaktiv-markiertem R9LQK-Peptid 20 min auf Eis inkubiert. Für die Bestimmung des K_D -Wertes wurden Peptid-Konzentrationen zwischen 10 nM und 8 μM eingesetzt, während die B_{max} -Bestimmung bei einer Konzentration von 2 μM durchgeführt wurde. Während der 20-minütigen Inkubation wurde eine *MultiScreen* Platte mit Glasfibrfiltereinsätzen (Porengröße 1 μm) mit 0,3 %iger Polyethylenimin (PEI)-Lösung für 10 min und anschließend mit 0,2 %iger BSA-Lösung für 5 min vorinkubiert. Die Reaktionsansätze wurden danach mittels einer 8-Kanal-Pipette auf die vorbehandelten MultiScreen Platten überführt und zweimal mit je 100 μ l eiskaltem

PBS mit 1 mM MgCl₂ gewaschen. Die Filter wurden getrocknet, ausgestochen und die Radioaktivität im *Gamma-Counter* quantifiziert. Die Menge an unspezifisch gebundenem Peptid wurde in Anwesenheit von einem 400-fachen Überschuss an nicht-markiertem R9LQK-Peptid bestimmt und die Messwerte entsprechend korrigiert. Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten (K_D) wurden die Messdaten mit Hilfe der Langmuir (1:1)-Bindungsgleichung:

$$B = B_{\max} \times \frac{C}{K_D + C}$$

gefittet. Zur Berechnung der spezifischen Radioaktivität des Peptids (cpm/mol) wurde die Radioaktivität von 1 µl Peptid (cpm/µl) gemessen, um daraus dann auf die Anzahl an Peptid-Bindungsplätze schließen zu können.

3.5.5 Peptidbindungs-Inhibitions-Assay

Für Inhibitionsstudien der Peptidbindung mit 500 µM NEM (*N*-Ethylmaleimid), 250 µM Fluoreszein-5-Maleimid (F-Mal), 250 µM Jodacetamidofluoreszein (IAF), 1 mM MTSET (Methanthiosulfonsäure-5-(2-trimethylammonium)ethylester Bromid), 10 mM MTSES (Methanthiosulfonsäure-5-(2-sulfo)ethylester Na-Salz) und 2,5 mM MTSEA (Methanthiosulfonsäure-5-2-aminoethylester Hydrobromid) wurden Membranen (20 µg Gesamtprotein) in An- und Abwesenheit der jeweiligen Reagenzien 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit PBS gewaschen und in 50 µl eiskaltem PBS mit 1 mM MgCl₂ in 96-Well-Platten resuspendiert. Die weitere Durchführung erfolgte analog zum Peptidbindungs-Assay (siehe 3.5.4).

3.5.6 Peptidtransport-Assay mit semi-permeabilisierten Sf9 Zellen

Zur Untersuchung des TAP-spezifischen Peptidtransports *in vivo* wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Ansatz eingesetzt. Die in Schüttelkultur (20-40 ml, 2×10^6 Zellen/ml) kultivierten Zellen wurden 48 h nach Infektion vorsichtig geerntet, die Zahl lebender bzw. toter Zellen bestimmt und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 0,025% Saponin in HEPES-Puffer (50 mM HEPES, 140 mM NaCl; pH 7,0) 1 min bei RT semi-permeabilisiert und sofort zweimal mit 1 ml HEPES-Puffer gewaschen und 1 min bei 1000 x g und 4°C abzentrifugiert. Nun wurden die Zellen in der entsprechenden Menge AP-Puffer (PBS mit 5 mM MgCl₂) resuspendiert

um $2,5 \times 10^5$ Zellen pro 50 μl zu erhalten. Diese wurden anschließend zusammen mit 10 mM ATP und 0,46 μM Fluoreszenz-markiertem NSTCL-Peptid (RRYQNSTC(Φ)L) in einem Gesamtvolumen von 100 μl für 3 min bei 32°C inkubiert. Als negativ Kontrollen dienten Reaktionsansätze, die 1 min bei 32°C mit 1 U Apyrase vorinkubiert wurden. Die Transportreaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Stopp-Puffer (PBS, 5 mM MgCl_2 , 10 mM EDTA) gestoppt und der Ansatz 5 min bei 1000 x g und 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MnCl_2 und 1 % NP40; pH 7,5) mindestens 1 h auf Eis lysiert und 10 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. N-Core glykosylierte und transportierte Peptide im Überstand wurden danach zu mit Lyse-Puffer äquilibrierten Concanavalin A (ConA)-Sephrose Beads gegeben und bei 4°C mindestens 2 h oder über Nacht inkubiert. Die Beads wurden im Anschluss zweimal mit 1 ml Lyse-Puffer gewaschen und das gebundene Peptid 30 min bei 4°C mit 300 μl 200 mM Methyl- α -D-Mannopyranosid eluiert. Die Fluoreszenz-Emission der Eluate wurde schließlich in Multi-Well Platten mittels ELISA-Reader ($\lambda_{\text{ex/em}} = 485/520$ nm; Polarstar Galaxy, BMG) detektiert. TAP-spezifischer Peptidtransport wurde durch Vorinkubation mit 20 μM des viralen Inhibitors ICP47 inhibiert. Für Kompetitionsassays wurde ein 200-facher Überschuss an kaltem R9LQK-Peptid (RRYQKSTEL) eingesetzt.

3.5.7 Peptidtransport-Assay mit Membranen oder Mikrosomen

Der Peptidtransport-Assay mit Membranen oder Mikrosomen wurde mit ^3H -markiertem NSTEL-Peptid (RRYQNSTEL) durchgeführt. Hierzu wurden Membranen oder Mikrosomen (20-100 μg Gesamtprotein) in einem Ansatz von 50 μl mit 3 mM ATP und 0,46 μM radioaktiv-markiertem Peptid für 3 min bei 32°C inkubiert und die Transportreaktion mit 1 ml Stopp-Puffer gestoppt. Im Folgenden schlossen sich die gleichen Schritte wie oben beschrieben (siehe 3.5.6) an. Mit ConA-Beads assoziierte Peptide wurden anschließend mittels *Gamma-Counting* (Cobra II, Packard) quantifiziert. Als negativ Kontrollen dienten Reaktionsansätze, die mit 1 U Apyrase 1 min bei 32°C vorinkubiert wurden, sowie Proben, bei denen ATP durch 3 mM ADP ersetzt wurde.

3.5.8 Immunpräzipitation

Für eine Co-Immunpräzipitation von TAP1 und TAP2 wurden $2,5 \times 10^6$ *Sf9* Zellen mit PBS gewaschen und in 200 μ l Puffer A (20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$ und 1 % Digitonin; pH 7,6 mit P_i -Mix) resuspendiert und 15 min bei 4°C inkubiert. Nicht-solubilisierbares Material wurde durch eine Zentrifugation für 15 min bei 20.000 x g und 4°C entfernt. Anschließend wurde der Überstand mit 10 μ l des polyklonalen TAP2-spezifischen Antikörpers 2p2 versetzt, 2 h und 4°C im Überkopfschüttler inkubiert und danach mit 60 μ l 50 %iger (v/v) Protein A-Sepharose für weitere 2 h und 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschrritten mit je 500 μ l Waschpuffer A (20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,1 % Digitonin; pH 7,6) wurde die Protein A-Sepharose in SDS-Probenpuffer eluiert. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert.

3.5.9 Fluoreszenz-Markierung von Einzel-Cystein-Mutanten

Für die Fluoreszenz-Markierung von Einzel-Cystein-Mutanten wurden 2×10^7 *Sf9* Zellen in Schüttelkultur 48 h nach Infektion mit rekombinatem Virus vorsichtig geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden das Zellpellet in HEPES-Puffer (50 mM HEPES, 140 mM NaCl; pH 7,0) resuspendiert und mit 0,025 % Saponin für 1 min bei RT inkubiert. Gestoppt wurde die Permeabilisation durch Zugabe von 1 ml eiskaltem HEPES-Puffer. Die Zellen wurden dann für 30 sec bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet in HEPES-Puffer resuspendiert und auf zwei Reaktionsgefäße verteilt. In einem Ansatz (100 μ l) wurde die Fluoreszenz-Markierungsreaktion mit Hilfe von 50 μ M Fluoreszein-5-Maleimid (25 mM Stocklösung in trockenem DMF) 5 min bei 25°C durchgeführt (Bezeichnung der Probe: i.M. = intakte Membran). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 mM β -Mercaptoethanol gestoppt, die Zellen mit 1 ml HEPES-Puffer gewaschen und das Pellet anschließend in 120 μ l Solubilisationspuffer (20 mM NaH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 15 % Glycerin; pH 7,4) mit 35 mM n-Decyl- β -Maltosid (DM) und P_i -Mix für 20 min auf Eis solubilisiert. Der zweite Reaktionsansatz diente als interne Referenz. Hierzu wurden die Zellen in 100 μ l vor der Fluoreszenz-Markierungsreaktion in HEPES-Puffer mit 35 mM DM auf Eis permeabilisiert (Bezeichnung der Probe: per.) und danach mit 50 μ M Fluoreszein-5-Maleimid für 5 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden durch Zugabe von NaCl, Glycerin und P_i -Mix die Pufferbedingungen angeglichen. Nach Zentrifu-

gation für 30 min bei 100.000 x g und 4°C wurde unlösliches Material abgetrennt und der Überstand zu 50 µl (50 % (v/v)) Ni-NTA-Agarose gegeben und für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose dreimal mit je 300 µl Waschpuffer I (PBS, 140 mM NaCl, 15 % Glycerin, 3 mM DM, 20 mM Histidin; pH 7,0) gewaschen und mit 50 µl Elutitionspuffer (PBS, 140 mM NaCl, 15 % Glycerin, 3 mM DM, 100 mM Histidin; pH 7,0) eluiert. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 15 min bei 65°C erhitzt und anschließend in einem 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Die TAP-assoziierte Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Lumi-Imagers F1TM im Gel detektiert und abschließend der TAP-Gehalt mittels Western-Blotting (siehe 3.4.2) überprüft.

3.5.10 Oxidative Quervernetzung von Cysteinen

TAP-haltige Membranen (0,5 mg Gesamtprotein) wurden mit 1,25 µM radioaktiv-markiertem Quervernetzungspeptiden (C1, C2 sowie C4-C9; z.B. CRYQKSTEL = C1; (Herget, 2003)) und CuPhe (1 mM CuSO₄ / 4 mM 1,10-Phenanthrolin) für 5 min bei 4°C in An- und Abwesenheit von 250 µM nicht-markiertem Kompetitorpeptid (RRYQKSTEL) inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion mit 5 mM *N*-Ethylmaleimid wurden die Membranen mit Reaktionspuffer gewaschen und für 8 min bei 20.000 x g und 4°C pelletiert. Anschließend erfolgte die Solubilisierung der Membranen durch 42 mM DM für 20 min und 4°C. Nach Zentrifugation für 30 min bei 100.000 x g und 4°C wurde unlösliches Material abgetrennt und der Überstand zu 50 µl (50 % (v/v)) Ni-NTA-Agarose gegeben und für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Ni-NTA-Beads wurden schließlich mit Waschpuffer (PBS, 140 mM NaCl, 15 % Glycerin, 3 mM DM, 20 mM Histidin; pH 7,0) gewaschen und mit SDS-Probenpuffer erhitzt. Aliquots wurden im SDS-Gel (10 %) aufgetrennt, die gebundene Radioaktivität im Phosphorimager (Storm, Amersham Bioscience) detektiert und der TAP-Gehalt mittels Western-Blotting (siehe 3.4.2) überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung Cystein-freier TAP-Untereinheiten

4.1.1 *De novo* Gensynthese und Klonierung von Cystein-freien TAP-Untereinheiten

Um die strukturelle und funktionelle Organisation des ABC-Transporters TAP zu untersuchen, wurden Cystein-freie Untereinheiten hergestellt. Hierzu wurden *tap1* und *tap2* durch partial-überlappende Oligonukleotide, mit einer Länge von 60 Basenpaaren (Bp) und einer Überlappung von je 15 Bp an den 5'- und 3'-Enden, mittels PCR *de novo* synthetisiert. Durch Einführung uniquer Restriktionsenzymstimmstellen mittels stiller Mutationen wurden die neu synthetisierten *de novo tap1* und *tap2* Gene in Kassetten von 150-250 Bp unterteilt, die späterhin mutiert und ausgetauscht werden können. Zusätzlich wurde die Kodon-Verwendung für eine Expression in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und humanen Zelllinien optimiert. Aus jeweils fünf resultierenden doppel-strängigen DNA-Fragmenten zwischen 400-450 Basenpaaren wurde *de novo tap1* mit einer Sequenzlänge von 2298 Bp und einem C-terminalen His₁₀-Tag und *de novo tap2* mit einer Länge von 2163 Bp und einem C-terminalen Strep-Tag I assembliert und in die Vektoren pGem3Z bzw. pCRScript subkloniert.

Durch die *de novo* Gensynthese wurden alle natürlichen Cysteine, neun in TAP1 und zehn in TAP2, ersetzt. Folgende Cysteine wurden durch Serin-Reste ersetzt: C6S, C12S, C14S, C73S, C179S, C488S, C662S und C735S in TAP1; C70S, C213S, C353S, C362S, C571S und C641S in TAP2. Cysteine im Bereich eines vorhergesagten Transmembransegments wurden gegen Alanin ausgetauscht (C315A in TAP1 sowie C197A und C209A in TAP2). Zwei Cysteine der TAP2-Untereinheiten wurden aufgrund von Sequenz-Vergleichen zwischen TAP-Homologen anderer Spezies durch Histidin (C540H) bzw. Valin (C394V) ausgetauscht. In Abbildung 4.1 sind die Positionen der ausgetauschten Cysteine graphisch dargestellt.

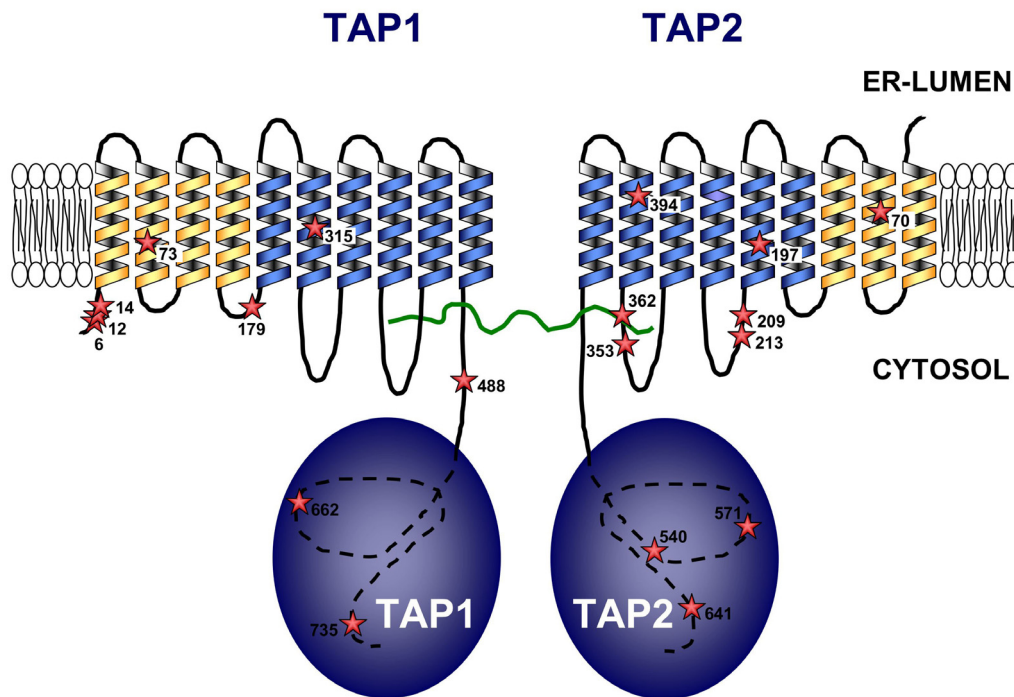


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der strukturellen Organisation des humanen TAP-Komplexes. Die Positionen der ausgetauschten Cysteine beider Untereinheiten sind als Sterne mit der entsprechenden Positionsnummer dargestellt.

4.1.2 Generierung von stabil-transfizierten Zelllinien

Zur Untersuchung des TAP-Komplexes innerhalb des MHC I-Antigenpräsentationswegs wurden TAP-defiziente Zellen verwendet. Diese humanen Haut-Fibroblasten, BRE.TAP1^{-/-} oder STF.TAP2^{-/-} (de la Salle *et al.*, 1999) wurden von einem Patienten mit *bare lymphocyte syndrome* (BLS) gewonnen und sind TAP1- oder TAP2-defizient, besitzen ansonsten aber alle weiteren Komponenten der Antigenpräsentationsmaschinerie. Nach einer Transfektion mit *tap1* oder *tap2* kann deswegen der funktionsfähige MHC I-Antigenpräsentationsweg wieder hergestellt werden.

Zur Expression in humanen Zellen wurden die *de novo* synthetisierten TAP-Untereinheiten in den Expressionsvektor p46 (Arbeitsgruppe Seeliger, Mainz) kloniert und in die TAP1- bzw. TAP2-defizienten humanen Fibroblastenzelllinien BRE.TAP1^{-/-} oder STF.TAP2^{-/-} stabil-transfiziert. Für TAP1-defiziente Fibroblasten

wurden folgende Kombinationen hergestellt: BRE.TAP1^{-/-} (nicht-transfiziert), BRE.TAP1^{wt} und BRE.TAP1^{dn}. Für TAP2-defiziente Zellen ergaben sich analog folgenden Kombinationen STF.TAP2^{-/-} (nicht-transfiziert), STF.TAP2^{wt} und STF.TAP2^{dn}.

Nach der Transfektion wurden G418-resistente Einzelzell-Klone isoliert, kultiviert und mittels PCR auf genomische Integration der *de novo tap1* und *tap2* Gene hin überprüft. Klone mit integriertem *tap1* oder *tap2* wurden weiterhin in Kultur gehalten und die Expression von wildtyp und Cystein-freiem TAP1 oder TAP2 durch SDS-PAGE und Western Blot in Membranpräparationen nachgewiesen. T1-Zellen, welche alle Komponenten der MHC I-vermittelten Antigenpräsentation besitzen, wurden als Positivkontrolle aufgetragen. Wie in Abbildung 4.2 zu erkennen ist, konnte TAP1 mit einem apparenten Molekulargewicht von ~ 71 kDa in allen stabil-transfizierten Klonen, BRE.TAP1^{wt} und BRE.TAP1^{dn}, mittels des monoklonalen TAP1-spezifischen Antikörpers 148.3 detektiert werden, während eine TAP-Bande bei nicht-transfizierten Zellen, BRE.TAP1^{-/-}, fehlte. Die Kontrollzellen T1, die eine vollständige Antigenprozessierungs-Maschinerie besitzen, zeigten ebenfalls eine deutliche TAP-Bande.

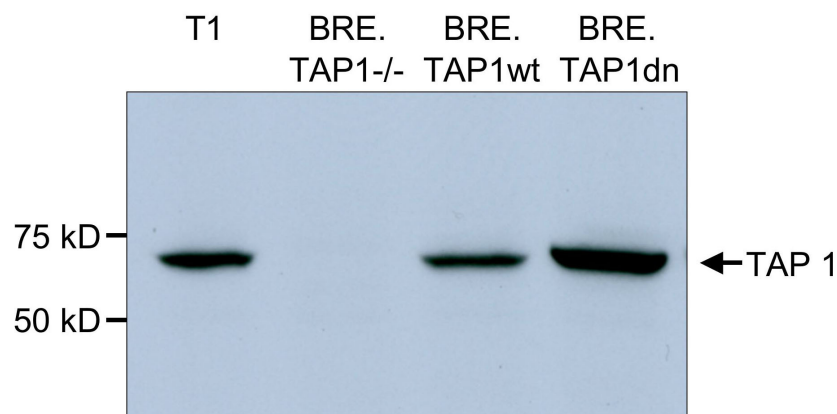


Abbildung 4.2: Expression von Cystein-freiem TAP1. Membranpräparationen (30 µg Gesamtprotein/pro Spur) der T1, BRE.TAP1^{-/-}, BRE.TAP1^{wt} und BRE.TAP1^{dn} Zellen wurde im SDS-Gel (10 %) getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im Western Blot durch den monoklonalen TAP1-spezifischen Antikörper 148.3 detektiert.

Die Expression von TAP2 aller stabil-transfizierten STF-Zellklone, STF.TAP2^{-/-}, STF.TAP2^{wt} und STF.TAP2^{dn} wurden mit Hilfe des monoklonalen TAP2-spezifischen Antikörpers 429.3 im Western Blot analysiert. Es zeigte sich aber, dass

das Expressionslevel der TAP2-Untereinheit sehr gering war und somit eine Detektion im Western Blot fehl schlug. Weiterführende Analysen gaben jedoch Aufschluss über die Heterodimerisierung und Funktion des TAP-Komplexes der untersuchten Zellklone (siehe 4.1.3 und 4.1.4.).

4.1.3 Funktionsanalyse von Cystein-freiem TAP1 und TAP2

Der intrazelluläre Transport von antigenen Peptiden aus dem Cytosol in das ER-Lumen ist ein zentraler Schritt während der Antigenprozessierung. Um zu untersuchen, ob der Austausch von einzelnen Cysteinen einen Effekt auf die Funktion des TAP-Transporters hat, wurden *in vitro* Transportstudien an mit Saponin semi-permeabilisierten TAP-transfizierten BRE- und STF-Zellen durchgeführt. Der ATP-abhängige Transport von radioaktiv-markiertem Peptid (RR(Y¹²⁵)QNSTEL) in das ER wurde in An- und Abwesenheit von MgATP (10 mM) analysiert. Nach Lyse der Zellen wurden N-Core glykosylierte und somit transportierte Peptide an Lektin (Concanavalin; ConA-Beads) gebunden und im *Gamma-Counter* quantifiziert. Wie in Abbildung 4.3 A dargestellt, zeigten mit Cystein-freiem oder wildtyp TAP (BRE.TAP1dn und BRE.TAP1wt) stabil-transfizierte Zellen einen ATP-abhängigen Peptidtransport, wogegen nicht-transfizierten BRE.TAP1^{-/-} Fibroblasten keinen Transport aufwiesen. Die Transporteffizienz von TAP-Komplexen bestehend aus wildtyp oder *de novo* TAP1 und intrinsischem TAP2 war vergleichbar, was deutlich macht, dass ein Austausch aller neun Cysteine der TAP1-Untereinheit keinen Einfluss auf die Transportfunktion des Komplexes hat.

Ein ATP-abhängiger Peptidtransport konnte auch für *de novo* und wildtyp TAP2-Transfektanten (STF.TAP2dn und STF.TAP2wt) beobachtet werden, während nicht-transfizierte STF.TAP2^{-/-} Zellen keinen Transport zeigten (Abbildung 4.3 B). Die Transporteffizienz aller TAP2-Transfektanten lag in einem vergleichbaren Bereich. Ähnliche Ergebnisse konnten für verschiedene Einzelzell-Klone von TAP1- oder TAP2-Transfektanten gemessen werden.

Im Weiteren wurde untersucht, ob der Austausch der Cysteine in TAP1 und TAP2 einen Einfluss auf die Interaktion mit dem Inhibitor ICP47 von Herpes Simplex Virus hat, welcher spezifisch die Peptidbindung und den Transport des TAP-Komplexes blockiert. Wie in Abbildung 4.3 C und D zu erkennen ist, wurde sowohl für TAP1- als

auch für TAP2-Tranfektanten der TAP-abhängiger Peptidtransport vollständig unterbunden. Die gleichen Ergebnisse konnten in Wettbewerbsversuchen mit einem 200-fachen molaren Überschuss an nicht-markiertem Peptid (RRYQKSTEL) erzielt werden.

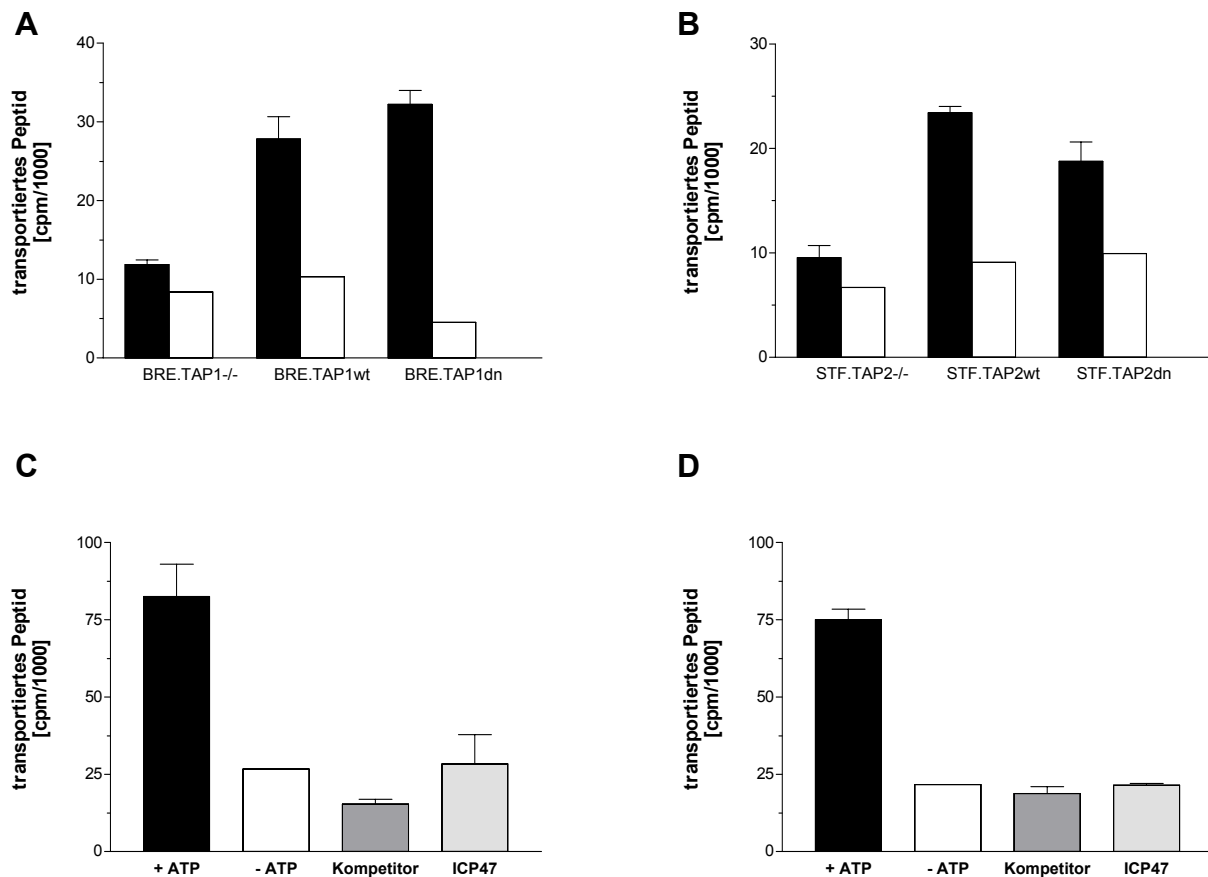


Abbildung 4.3: ATP-abhängiger Peptidtransport von Cystein-freiem TAP1 und TAP2. Der Transport-Assay wurde mit $0,8 \mu\text{M}$ radioaktiv-markiertem Peptid (RR(Y¹²⁵)QNSTEL) für 20 min bei 37°C in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 10 mM MgATP mit $2,5 \times 10^5$ semi-permeabilisierten BRE.TAP1^{-/-}, BRE.TAP1^{wt}, BRE.TAP1^{dn} (A) und STF.TAP2^{-/-}, STFTAP2^{wt} und STF.TAP2^{dn} Zellen (B) durchgeführt. Glykosylierte und somit transportierte Peptide, wurden an ConA-Beads gebunden und mittels *Gamma-Counter* quantifiziert. Analoge Transportexperimente wurden in An- und Abwesenheit von nicht-markiertem Kompetitorpeptid ($160 \mu\text{M}$, RRYQNSTEL, dunkelgraue Balken) oder des viralen TAP-Inhibitors ICP47 ($20 \mu\text{M}$, hellgraue Balken) mit BRE.TAP1^{dn} (C) und STF.TAP2^{dn} (D) Zellklonen durchgeführt.

4.1.4 Wiederherstellung der MHC Klasse I-Oberflächenexpression durch Cystein-freies TAP1 und TAP2

Die von TAP in das ER-Lumen transportierten Peptide werden dort auf MHC Klasse I-Moleküle geladen, treten als Peptid-MHC Komplexe in den Sekretionsweg ein und werden zur Plasmamembran transportiert, wo ihre antigene Fracht von cytotoxischen T-Zellen inspiziert werden kann. Die Oberflächenexpression von MHC I-Molekülen ist dabei ein Indikator für eine funktionsfähige Antigenprozessierungsmaschinerie. TAP-defiziente BRE.TAP1^{-/-} und STF.TAP2^{-/-} Fibroblasten präsentieren nur sehr wenige MHC I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Um zu überprüfen, ob Cystein-freie TAP-Untereinheiten die Reifung und den intrazellulären Transport der MHC I-Moleküle an die Plasmamembran wieder herstellen können, wurden alle Transfektanten mittels FACS-Messungen analysiert. Dabei wurde die Oberflächenexpression der MHC I-Moleküle mit Hilfe des Fluoreszenz-markierten Antikörpers HLA-ABC-FITC bestimmt.

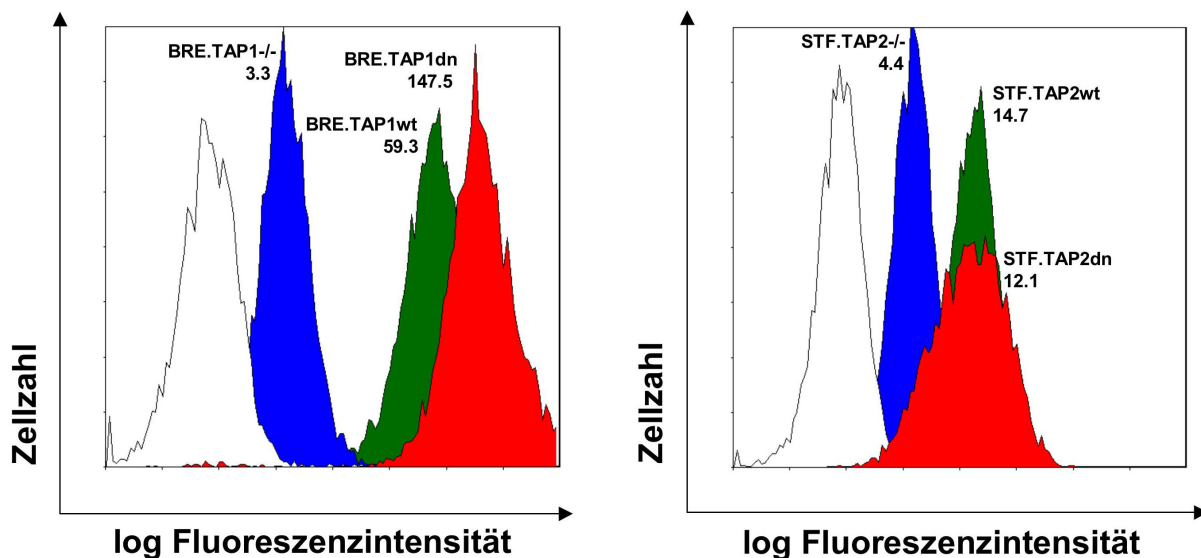


Abbildung 4.4: Wiederherstellung der MHC I-Oberflächenexpression durch Cystein-freie TAP1- und TAP2-Untereinheiten. Zur Untersuchung der Antigenprozessierung in BRE.TAP1^{-/-}, BRE.TAP1^{wt}, BRE.TAP1^{dn} (A), und STF.TAP2^{-/-}, STF.TAP2^{wt}, STF.TAP2^{dn} (B) Zelllinien wurde die Expression von MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche mittels FACS-Analyse bestimmt. Hierzu wurde der MHC Klasse I-spezifische Antikörper HLA-ABC-FITC verwendet. Die Isotypenkontrolle wurde mit Hilfe des anti-IgG2a-FITC Antikörpers durchgeführt (weißer Peak).

Die durchschnittliche, spezifische Fluoreszenzintensität für transfizierte BRE.TAP1wt Zellen lag bei 59,3, wogegen Zellen die mit Cystein-freiem TAP1 transfiziert wurden, BRE.TAP1dn, eine höhere Fluoreszenzintensität von 147,5 aufwiesen. Im Vergleich dazu zeigten nicht-transfizierte BRE.TAP1-/- Kontroll-Zellen eine Fluoreszenzintensität von 3,3.

Für mit der Cystein-freien TAP2-Untereinheit transfizierte Zellen, STF.TAP2dn, lag die Fluoreszenzintensität bei 12,1. während für die stabile Wildtyp-Zelllinie, STF.TAP2.wt, nur eine geringfügig höhere Intensität von 14,7 gemessen wurde. Nicht-transfizierte TAP2-defiziente STF-TAP2-/- Zellen zeigten einen Wert von 4,4, was dem Hintergrund der Messung entsprach.

Dieses Experiment bestätigt eindeutig die Wiederherstellung einer funktionsfähigen Antigenprozessierungsmaschinerie in TAP1- und TAP2-defizienten Zelllinien, wenn diese mit der jeweils fehlenden Cystein-freien TAP-Untereinheit transfiziert wurden.

4.2 Membrantopologie von TAP im funktionalen Peptid-Beladungskomplex

4.2.1 Expression, Heterodimerisierung und Funktion des Cystein-freien TAP Komplex

Zur Analyse der Membrantopologie des humanen Transporters TAP wurden Cystein-freie TAP-Untereinheiten durch *de novo* Gensynthese assembliert (Heintke *et al.*, 2003). Im Folgenden wurde nun untersucht, ob die Substitution aller 19 Cysteine in einem heterodimeren Komplex aus TAP1 und TAP2 die Funktion des Transporters beeinflusst.

Hierzu wurde Cystein-freies *tap1* und *tap2* im Baculovirus-Expressionsvektor pFastBac Dual kombiniert. *Tap1* stand dabei unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors, während *tap2* durch den p10-Promotor reguliert wurde. Der Klonierungserfolg wurde mittels analytischer Restriktion und Sequenzierung überprüft und die Plasmid-DNA anschließend für die Transposition in *E. coli* DH10Bac-Zellen verwendet. Nach Blau-Weiss-Selektion und erneuter Überprüfung der erfolgreichen homologen Rekombination mittels Kolonie-PCR wurde Bacmid-DNA für die nachfolgende Transfektion von *Sf9* Zellen präpariert. Die Expression des Cystein-freien TAP-Komplexes in *Sf9* Zellen wurde durch SDS-PAGE und Western Blotting analysiert.

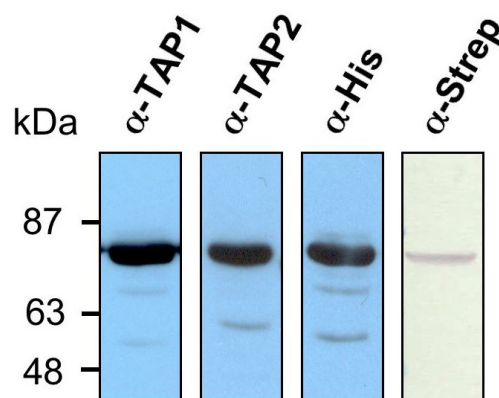


Abbildung 4.5: Expression von cysteine-freiem TAP. Mikrosomen (20 µg Protein pro Spur) von Baculovirus-infizierten *Sf9* Zellen wurden durch SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und im Western Blot mit TAP1- (mAb 148.3, α-TAP1) und TAP2-spezifischen (mAb 435.3, α-TAP2) Antikörpern sowie mit gegen den His₁₀-Tag (α-His) und Strep-Tag I (α-Strep) gerichteten Antikörpern analysiert.

Wie Abbildung 4.5 zu entnehmen ist, konnten alle Konstrukte erfolgreich in *Sf9* Zellen exprimiert und mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Aufgrund des zusätzlichen C-terminalen His₁₀-Tags bzw. Strep-Tag I zeigten Cystein-freie TAP-Untereinheiten im Vergleich zu wildtyp-Konstrukten eine reduzierte elektrophoretische Mobilität.

Um eine Heterodimerisierung von TAP1 und TAP2 zu untersuchen wurde eine Co-Immunpräzipitation aus *Sf9* Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden 72 h nach der Infektion geerntet und mit Digitonin solubilisiert. Anschließend erfolgte die Co-Immunpräzipitation des Komplexes durch Inkubation mit einem polyklonalen TAP2-spezifischen Antikörper und der Nachweis mittels Westen Blot Analyse. Wie in Abbildung 4.6 dargestellt ist konnte die Heterodimerisierung eines Cystein-freien TAP-Komplexes nachgewiesen werden.

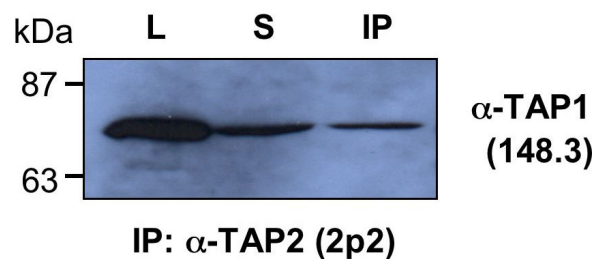


Abbildung 4.6: Co-Immunpräzipitation von Cystein-freiem TAP. Für die Immunpräzipitation wurden $2,5 \times 10^6$ *Sf9* Zellen in PBS resuspendiert (L) und mit 1 % Digitonin solubilisiert (S). Der TAP-Komplex wurde mit Hilfe des polyklonalen TAP2-spezifischen Antikörpers 2p2 immunpräzipitiert, anschließend im SDS-Gel (10 %) aufgetrennt und im Western Blot durch den monoklonalen TAP1-spezifischen Antikörper 148.3 detektiert.

Die funktionale Charakterisierung des Cystein-freien TAP-Komplexes wurde mit Hilfe von Peptidtransport-Assays durchgeführt. Das radioaktiv-markierte Peptid (RR(Y¹²⁵)QNSTEL) diente dabei als Substrat und wurde nach erfolgreichem Transport über die ER-Membran N-Core glykosyliert. Die glykosylierten Peptide wurden an ConA-Beads gebunden und im *Gamma-Counter* quantifiziert.

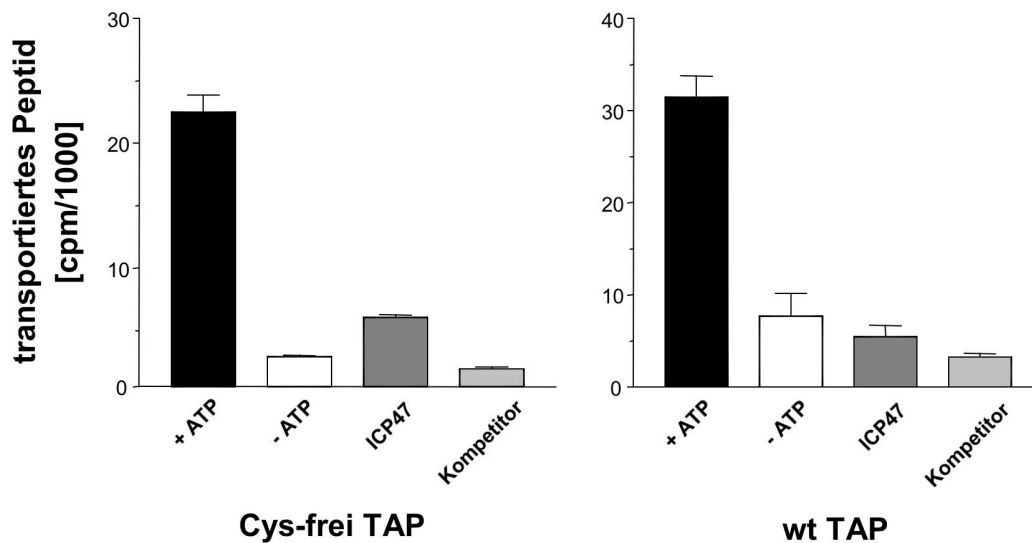


Abbildung 4.7: ATP-abhängiger Peptidtransport durch Cystein-freies und wildtyp TAP. Mikrosomen (100 μg Gesamtprotein) wurden im Transport-Assay mit 0,46 μM radioaktiv-markiertem Peptid (RR(Y¹²⁵)QNSTEL) für 3 min bei 32°C in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 3 mM MgATP inkubiert. Die glykosylierten und somit transportierten Peptide wurden an ConA-Beads gebunden und im *Gamma-Counter* quantifiziert. Analoge Transportexperimente wurden in An- und Abwesenheit von nicht-markiertem Kompetitorpeptid (250 μM , RRYQKSTEL, hellgraue Balken) oder des viralen TAP-Inhibitors ICP47 (20 μM , dunkelgraue Balken) durchgeführt.

Wie in Abbildung 4.7 dargestellt, zeigte das Cystein-freie TAP-Konstrukt im Vergleich zu wildtyp TAP einen analogen ATP-abhängigen Peptidtransport, der spezifisch durch den viralen Inhibitor ICP47 inhibiert werden konnte. Transportstudien in Anwesenheit einer hohen Konzentration von Kompetitorpeptid unterbanden diesen Peptidtransport ebenfalls.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass ein Cystein-freies TAP-Protein in Insektenzellen exprimierbar ist, einen Heterodimer aus TAP1 und TAP2 bildet und die Peptidtransportfunktion nicht beeinflusst ist. Diese Daten bieten daher die Ausgangsbasis, um die Membrantopologie des TAP-Komplexes zu bestimmen.

4.2.2 Generierung von TAP1 Einzel-Cystein-Mutanten

Zur Untersuchung der strukturellen Organisation des humanen TAP Komplexes wurden Einzel-Cystein-Mutanten von TAP1 hergestellt. Zuerst wurde die Lokalisation und Orientierung von Membransegmenten mittels Hydrophobizitätsanalyse unter Verwendung folgender Programme des ExPASy-Servers (<http://www.expasy.org/>) untersucht: TopPred II (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>; (von Heijne, 2002)), SOSUI (<http://www.sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/menu0.html>; (Hirokawa, 1998)), TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html; (Hofmann und Stoffel, 1993)) und TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>; (Krogh, 2001)). Bei allen Programmen wurden die Standardeinstellungen für eukaryotische Membranproteine verwendet. Ausgehend von der Annahme, dass hydrophobe Sequenzabschnitte in Membranproteinen als alpha-helikale Membranstrukturen lokalisiert sein können, wurden durch die Analysealgorithmen Membransegmente für das gesamte Protein auf Basis der Hydrophobizitätswerte für einzelne Aminosäuren vorhergesagt. Die Einführung von einzelnen Cysteinen erfolgte nach zusätzlichen detaillierten Sequenzvergleichen von TAP1 mit P-glycoprotein an folgenden Positionen: S6C, A51C, A87C, S124C, S179C, S220C, F265C, S326C, T399C, S436C, und S488C. Diese wurden so gewählt, dass es sich um Transmembransegment-verbindende Schleifen handelt, die entweder im Cytosol oder im ER-Lumen lokalisiert sind (siehe Abbildung 4.8).

Ausgehend vom Vektor pGem3Z TAP1dn wurden mittels mutagener Primer durch eine ortsspezifische Mutagenese einzelne Basen ausgetauscht, um so die Kodierung für ein Cystein zu erhalten. Nach vollständiger Sequenzierung des Gens wurde die Kassette über *Bam*HI/*Hind*III-Schnittstellen in den Expressionsvektor pFastBac Dual transferiert. Um eine Co-Expression von TAP1 und TAP2 zu gewährleisten, wurde zusätzlich Cystein-freies *tap2* über *Nsi*I/*Xho*I-Schnittstellen in den Vektor inkloniert. Alle generierten Konstrukte konnten mit Hilfe des Baculovirus Expressions Systems in Sf9 Zellen erfolgreich exprimiert werden (siehe Abbildung 4.9). Die im Western Blot zu sehenden Abbauprodukte entstanden aufgrund unterschiedlich hoher Virustiter der einzelnen Konstrukte. Die Expression wurde für spätere Versuche optimiert, um eventuelle Artefakte aufgrund von Überexpression oder des lytischen Zykluses ausschließen zu können.

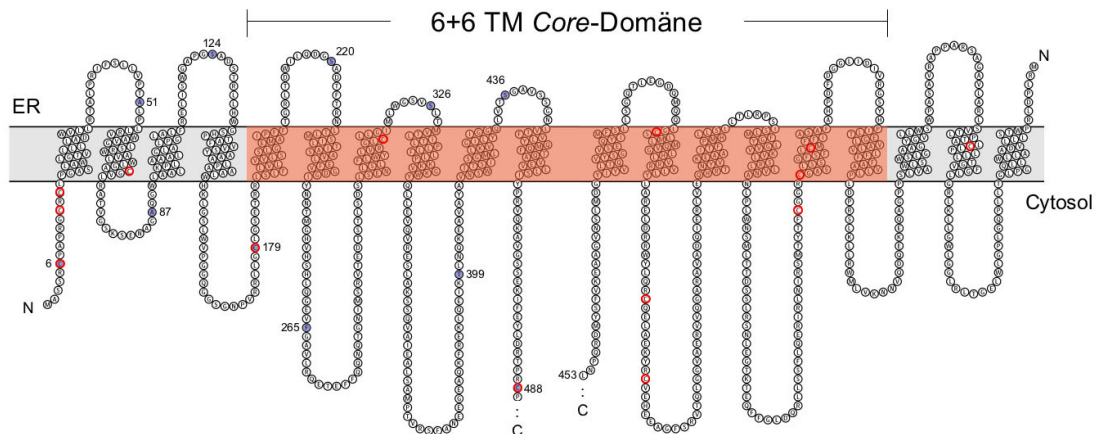
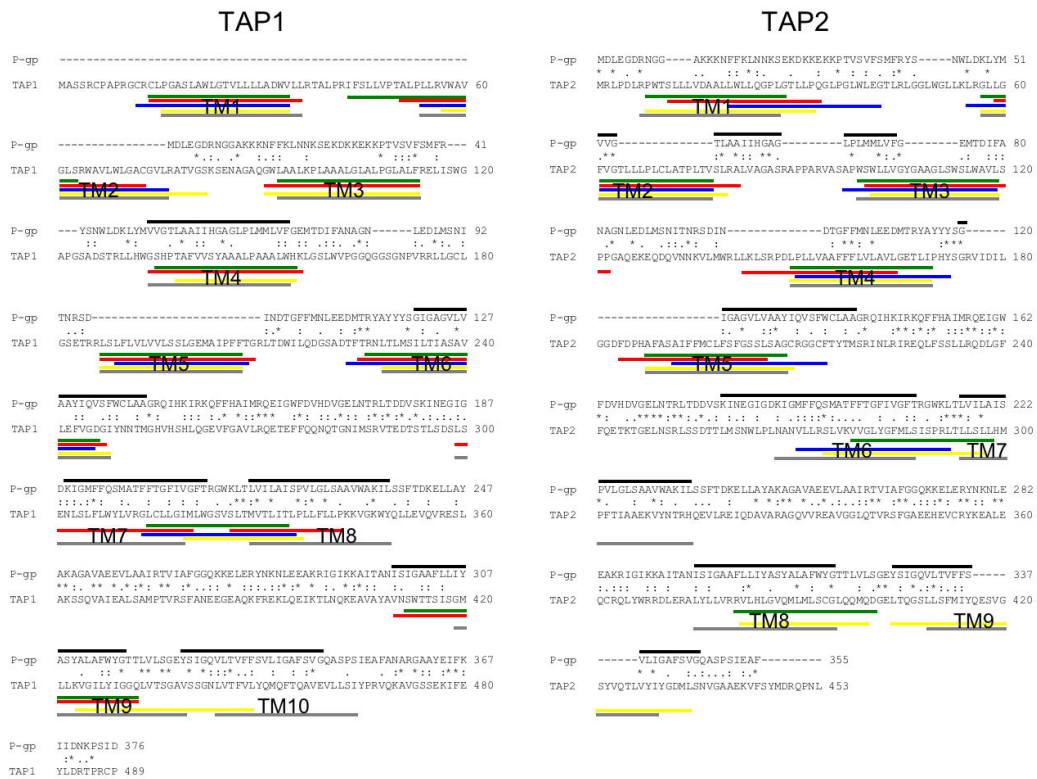


Abbildung 4.8: Membrantopologie von TAP. Die Membrantopologie wurde durch Sequenzanalysen (ClustralW (<http://www.ebk.ac.uk/clustralw/>)) mit P-gp in Kombination mit verschiedenen Topologiealgorithmen ((<http://www.expasy.ch>); TopPred II (grüne Linien ;(von Heijne, 2002)); SOSUI (rote Linien; (Hirokawa, 1998)); TMHMM (blaue Linien; (Krogh, 2001)) und TMPred (gelbe Linien; (Hofmann und Stoffel, 1993))) vorhergesagt. Für alle Algorithmen wurden die Standardeinstellungen für eukaryotische Membranproteine verwendet. Die grauen und schwarzen Linien stellen die unter Swiss-Prot abgelegten, vorhergesagten Daten (<http://www.expasy.uniprot.org/Q03518>, [Q03519](http://www.expasy.uniprot.org/Q03519) und [P08183](http://www.expasy.uniprot.org/P08183)) für die TMs des humanen TAP1, TAP2 und P-gp dar. Der TAP-Komplex besteht aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2, welche zusätzlich in eine TMD und eine NBD (hier nicht gezeigt) gliedert werden können. Jede TMD kann weiterhin in eine unique N-terminale Domäne und eine Core-Domäne (in rot dargestellt) unterteilt werden. Die Positionen der eingeführten Einzel-Cysteine sind in blau dargestellt. Die ausgetauschten intrinsischen Cysteine jeder Cystein-freien TAP-Untereinheit sind durch rote Sterne markiert. Das Topologiemodell wurde mit Hilfe des Programms TeXtopo (Beitz, 2000) aus den Hydrophobizitätsdaten der Swiss-Prot Datenbank erstellt.

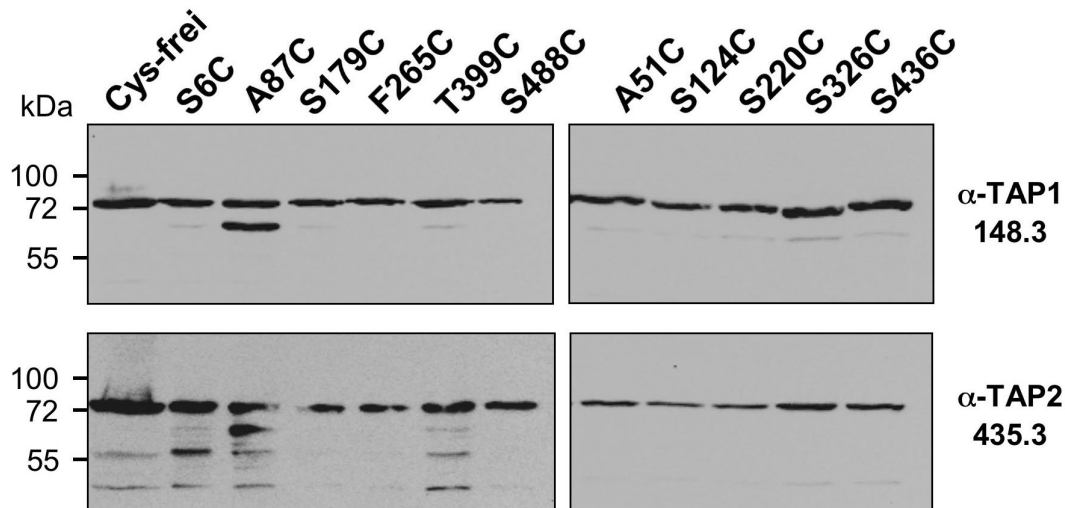


Abbildung 4.9: Expression der Einzel-Cystein-Mutanten von TAP1. Mikrosomen (50 µg Gesamtprotein/pro Spur) aller Einzel-Cystein-Mutanten von TAP1 kombiniert mit Cystein-freiem TAP2 wurden mittels SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und im Western Blot mit TAP1- (mAb 148.3) und TAP2-spezifischen (mAb 435.3) Antikörpern analysiert.

Um zu untersuchen, ob die Einführung von einzelnen Cysteinen in Transmembran-segmente-verbindende Schleifen von TAP1 einen Einfluss auf die Funktion des TAP-Komplexes hat, wurde der ATP-abhängige Peptidtransport von allen Konstrukten in mit Saponin semi-permeabilisierten *Sf9* Zellen analysiert. Hierzu wurde mit Fluoreszein-markiertem Peptid (RRYQNSTC(Φ)L, Φ zeigt die Position an der Fluoreszein über ein Cysteinrest an das Peptid gekoppelt ist) in An- und Abwesenheit von MgATP (10 mM) 3 min bei 32°C inkubiert und anschließend über die Glykosylierung an ConA-Beads gebunden. Nach spezifischer Elution mit Methyl- α -D-Mannopyranosid konnte die Fluoreszenz im ELISA-Reader quantifiziert werden.

Alle elf TAP1 Einzel-Cystein-Konstrukte zeigten in Kombination mit Cystein-freiem TAP2 einen ATP-abhängigen Peptidtransport (siehe Abbildung 4.10). Die Transporteffizienzen der meisten Konstrukte waren mit der eines Cystein-freien TAP-Komplexes vergleichbar. Für die Konstrukte S179C und S326C lagen die Transporteffizienzen etwas höher (130 %), wogegen das Konstrukt F265C eine um 70 % geringere Transporteffizienz zeigte. Die vergleichbare Expression von TAP1 und TAP2 aller Konstrukte wurde anhand von Aliquots des Transport-Assays nach Auftrennung im SDS-Gel (10 %) immunochemisch mittels TAP-spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen.

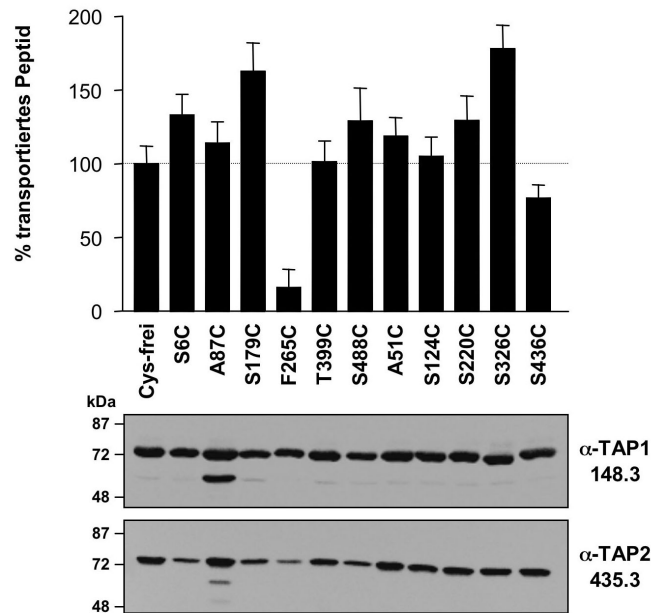


Abbildung 4.10: Peptidtransport von Einzel-Cystein-Mutanten. Der ATP-abhängige Peptidtransport der Einzel-Cystein-Mutanten von TAP1 wurde in mit Saponin semi-permeabilisierten *Sf9* Zellen analysiert. Als Substrat wurde Fluoreszein-markiertes Peptid (0,46 μ M, RRYQNSTC(Φ)L) für 3 min bei 32°C in An- und Abwesenheit von MgATP (10 mM) eingesetzt. Glykosylierte und somit transportierte Peptide wurden an ConA-Beads gebunden und nach spezifischer Elution mit Methyl α -D-Mannopyranosid (200 mM) im ELISA-Reader quantifiziert. Die relativen Transporteffizienzen der Einzel-Cystein-Konstrukte sind im Vergleich zu der von Cystein-freiem TAP dargestellt. Aliquots der Transportproben ($2,5 \times 10^5$ Zellen) wurden mittels SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und im Western Blot mit TAP1- (mAb 148.3) und TAP2-spezifischen (mAb 435.3) Antikörpern analysiert.

4.2.3 Membrantopologie basierend auf Cystein-Zugänglichkeit

Zur Untersuchung der Membrantopologie von TAP1 wurde auf Basis einer thiol-spezifischen Markierung von einzelnen Cysteinen eine Methode entwickelt, die eine Aussage über die Lokalisation des zu markierenden Cysteins ermöglicht. Hierzu wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein-5-Maleimid (siehe Abbildung 4.11 A) verwendet. Dieses Molekül mit einer molaren Masse von 427 g/mol absorbiert blaues Licht mit einer Wellenlänge von 490 nm und emittiert sichtbares grünes Licht von 520 nm. Die Maleimidgruppe erlaubt unter neutralen Bedingungen, wie in Abbildung 4.11 B dargestellt, eine spezifische und kovalente Markierung des freien Cysteins.

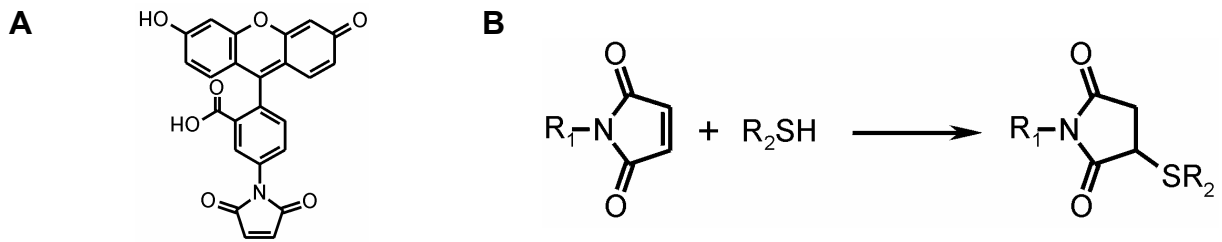


Abbildung 4.11: A, Fluoreszein-5-Maleimid; B, Reaktionsgleichung von thiol-spezifischen Reagenzien. Die Bildung des Thioethers erfolgt durch die Addition des Thiols über die Doppelbindung des Maleimids.

Zur Ermittlung einer optimalen Konzentration an reaktivem Fluorophor für die Markierung der Einzel-Cystein-Mutanten wurden semi-permeabilisierte Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Fluoreszein-5-Maleimid inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von β -Mercaptoethanol gestoppt, und anschließend erfolgte die Solubilisierung der Membranen durch DM. Der heterodimere TAP-Komplex wurde über den C-terminalen His₁₀-Tag an TAP1 durch Ni-NTA-Agarose und im SDS-Gel (10 %) aufgetrennt. Die so behandelten Proben wurden mit i.M. für „intakte Membranen“ bezeichnet. Als Referenzprobe (per. = Permeabilisierung vor der Markierung) wurden Zellen vor der Markierungsreaktion mit DM solubilisiert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen an Fluoreszein-5-Maleimid inkubiert, um so die maximale Markierungseffizienz eines Konstruktes zu bestimmen.

Abbildung 4.12 zeigt das In-Gel Fluoreszenzbild und den dazugehörigen Western Blot mit TAP1- und TAP2-spezifischen Antikörpern der Einzel-Cystein-Konstrukte S6C und S220C. Das Cystein an der Position 6 (S6C) wurde bereits bei einer Konzentration von 5 μ M Fluoreszein-5-Maleimid markiert. Die maximale Markierung wurde zwischen 50 –250 μ M Fluoreszein-5-Maleimid erreicht. Es war kein Unterschied der Markierungseffizienz zwischen intakten Membranen (i.M.) und den vor der Markierung permeabilisierten Membranen (per.) zu erkennen. Proteinproben mit Cystein-freiem TAP wiesen auch bei Einsatz einer hohen Konzentration an Fluoreszein-5-Maleimid (500 μ M, Daten nicht gezeigt) keine Markierung auf, was zeigt, dass die Reaktion thiol-spezifisch ist. Aufgrund der geringen Konzentration an eingesetztem Fluorophor lässt sich daraus schließen, dass das Cystein an Position 6 (S6C) frei vom Cytosol zugänglich ist.

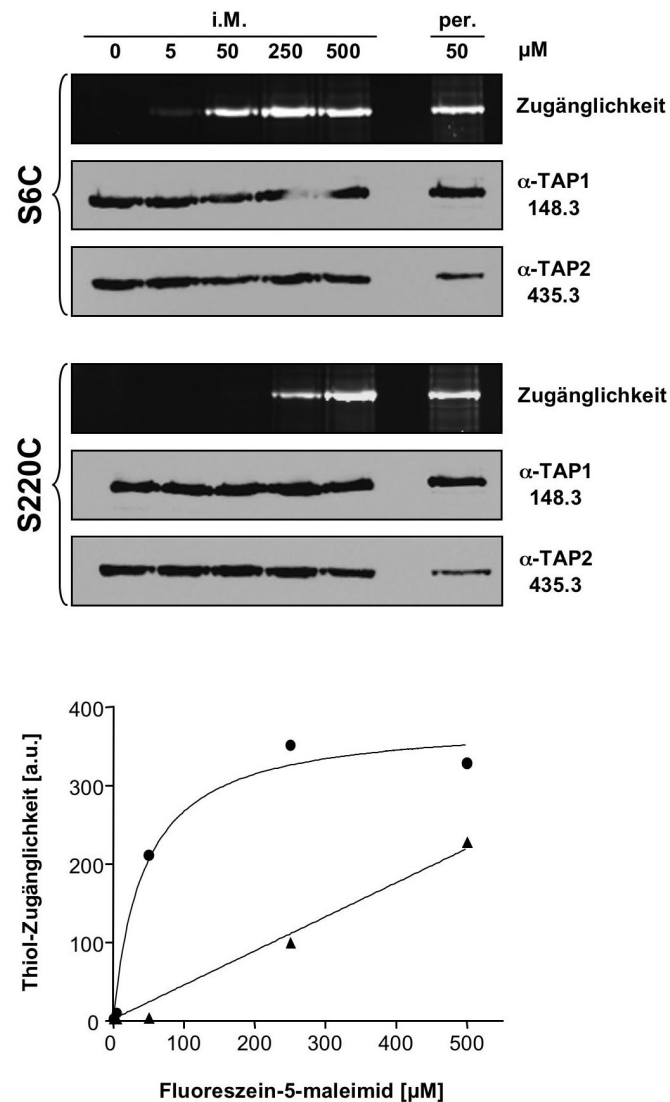


Abbildung 4.12: Fluoreszenz-Markierung von Einzel-Cystein-Mutanten. *Sf9* Zellen, welche die Konstrukte S6C und S220C exprimieren, wurden für 1 min bei 25°C mit Saponin (0,025 %) semi-permeabilisiert und sofort mit HEPES-Puffer (50 mM HEPES, 140 mM NaCl; pH 7,0) gewaschen. Die Markierungsreaktion wurde mit verschiedenen Konzentrationen (0-500 μM) an Fluoreszein-5-Maleimid für 5 min bei 25°C durchgeführt und anschließend mit β -Mercaptoethanol (25 mM) gestoppt. Intrazelluläre Membranen wurden mit n-Decyl- β -Maltosid (DM, 35 mM) solubilisiert. Die Aufreinigung des TAP-Komplexes erfolgte über den C-terminalen His₁₀-Tag von TAP1 an Ni-NTA-Agarose und spezifischer Elution mit 100 mM Histidin. Als interne Referenz wurden Zellen vor der Markierung mit Fluoreszein-5-Maleimid mit DM (35 mM) permeabilisiert und anschließend die Markierungsreaktion mit Fluoreszein-5-Maleimid (50 μM , per.50) durchgeführt. Aliquots aller Proben wurden im SDS-Gel (10 %) aufgetrennt. Die Zugänglichkeit der Cysteine konnte durch In-Gel Fluoreszenzbilder analysiert und die Co-Aufreinigung von TAP1 und TAP2 im Western Blot mit TAP1- (mAb 148.3) und TAP2-spezifischen (mAb 435.3) Antikörpern überprüft werden. Im Graph ist die relative Zugänglichkeit der Einzel-Cysteine gegen die Konzentration des Fluorophors aufgetragen. Der Grad der Zugänglichkeit der Konstrukte S6C (●) und S220C (▲) wurden mittels Intensitätsmessungen durch In-Gel Fluoreszenzanalyse bestimmt.

Im Gegensatz dazu zeigte das Cystein an Position 220 (S220C) ein völlig anderes Verhalten. Es konnte keine spezifische Markierung des Cysteins bei einer Fluoreszein-5-Maleimid Konzentration von 5 bis 50 μM in intakten Membranen (i.M) detektiert werden. Permeabilisierte Membranfraktionen vor der Fluoreszenz-Markierung (per.) reagierten dagegen schon bei einer Konzentration von 50 μM quantitativ mit dem Fluorophor. Unter Verwendung einer sehr hohen Konzentration von Fluoreszein-5-Maleimid (250 μM) konnte eine Markierung des Cysteines S220C detektiert werden, was auf einen Durchtritt des Fluoreszenz-Farbstoffes durch die ER-Membran hindeutet. Die relativen Zugänglichkeiten der Cysteine der Konstrukte S6C und S220C sind im Graph der Abbildung 4.12 zusammengefasst. Um eine Markierung von Cysteinen im ER-Lumen zu vermeiden, wurde in allen nachfolgenden Versuchen die Fluoreszein-5-Maleimid Konzentration auf 50 μM festgelegt.

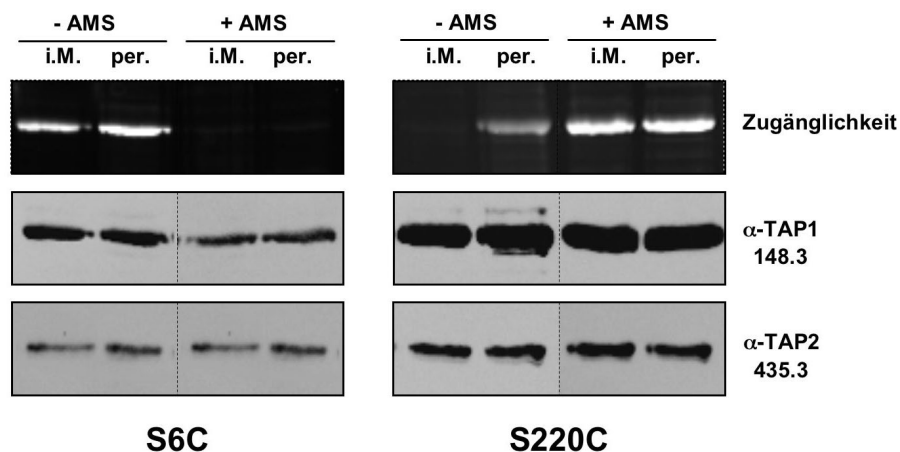


Abbildung 4.13: Vorinkubation der Einzel-Cystein-Konstrukte S6C und S220C mit AMS. Vor der Markierungsreaktion mit Fluoreszein-5-Maleimid (250 μM) wurden beide Konstrukte 15 min mit AMS inkubiert und anschließend mit HEPES-Puffer (50 mM HEPES, 140 mM NaCl; pH 7,0) gewaschen (+ AMS). Parallel dazu wurde die Markierung ohne AMS-Behandlung mit 50 μM Fluoreszein-5-Maleimid unter Standardbedingungen durchgeführt (- AMS). Die TAP-Aufreinigung erfolgte über den C-terminalen His₁₀-Tag von TAP1 mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose. Aliquots wurden im SDS-Gel (10 %) aufgetrennt und die TAP-assoziierte Fluoreszenz durch In-Gel Fluoreszenzanalyse dokumentiert. Die Co-Aufreinigung von TAP1 und TAP2 wurde im Western Blot mit TAP1- (mAb 148.3) und TAP2-spezifischen (mAb 435.3) Antikörpern untersucht.

Zur Bekräftigung der Ergebnisse wurden die Konstrukte S6C und S220C vor der eigentlichen Markierungsreaktion mit dem Membran-impermeablen Reagenz Stilbene-disulfonat Maleimid (4-acetamido-4'-maleimidyl-stilbene-2,2'-disulfonic acid, (AMS)) inkubiert, welches mit vom Cytosol zugänglichen Cysteinen reagiert. Anschließend

erfolgte die Markierung mit Fluoreszein-5-Maleimid nach dem etablierten Protokoll. Um zu zeigen, dass AMS die Membran nicht passieren kann, wurde Fluoreszein-5-Maleimid bei der Markierungsreaktion in einer sehr hohen Konzentration von 250 μM eingesetzt. Die thiol-spezifische Markierung des Cysteines an Position 6 (S6C) wurde durch die Vorinkubation mit AMS unterbunden, wogegen eine Markierung des Einzel-Cysteines S220C bei einer Konzentration von 250 μM Fluoreszein-5-Maleimid möglich war. Abbildung 4.13 zeigt sowohl die In-Gel Fluoreszenzbilder als auch die zugehörigen Western Blot-Analysen mit TAP1- und TAP2-spezifischen Antikörpern.

4.2.4 Die Grösse der TAP1-Transmembrandomäne

Die Grösse der Transmembrandomäne (TMD) und die Anzahl der Transmembransegmente (TMs) von TAP1 ist bis heute nicht bekannt und variiert in den Voraussagen in der Literatur zwischen acht und zehn TMs (Abele und Tampé, 2004; Lankat-Buttgereit und Tampé, 1999; Tampé *et al.*, 1997; Vos *et al.*, 1999). Insbesondere die Region im Sequenzbereich zwischen Aminosäure 344 bis 488 ist schlecht definiert und kontrovers diskutiert (Gileadi und Higgins, 1997; Vos *et al.*, 1999).

Um die strukturelle Organisation von TAP1 zu untersuchen, wurde die Reaktionskinetik von Fluoreszein-5-Maleimid an ausgewählten Einzel-Cysteinen (T399C, S436C und S488C), welche im Sequenzbereich von Aminosäure 344 bis 488 lokalisiert sind, analysiert. Semi-permeabilisierte Zellen wurden für diesen Zweck unterschiedlich lange (0,5–5 min) mit Fluoreszein-5-Maleimid (50 μM) inkubiert und der TAP-Komplex anschließend nach dem etablierten Protokoll aufgereinigt. Als Referenz dienten vor der Markierung permeabilisierte Zellen (*per.*).

Wie in Abbildung 4.14 zu sehen ist, konnten die Cysteine an den Positionen 399 und 488 zu allen Zeitpunkten einheitlich markiert werden und sind somit vom Cytosol für Fluoreszein-5-Maleimid frei zugänglich. Das eingeführte Cystein an Position 436 dagegen war unter den gleichen Reaktionsbedingungen in Proben mit intakten ER-Membranen (*i.M.*) nicht für den Fluorophor zugänglich. Wurden die Membranen jedoch vor der Markierung permeabilisiert, so konnten einheitliche fluoreszierende Banden im SDS-Gel detektiert werden (*per.*).

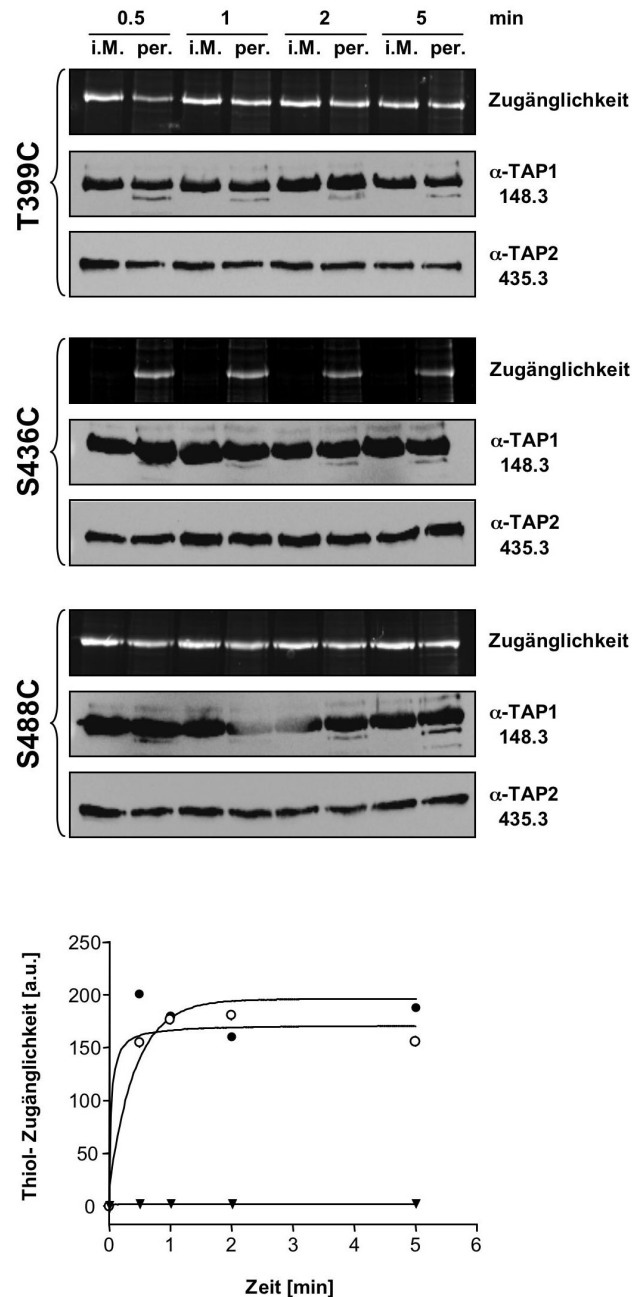


Abbildung 4.14: Reaktionskinetik der Fluoreszein-5-Maleimid Markierung. Reaktionskinetik der Einzel-Cysteine T399C, S436C und S488C mit Fluoreszein-5-Maleimid. Semi-permeabilisierte Zellen wurden mit Fluoreszein-5-Maleimid (50 μ M) markiert und mit β -Mercaptoethanol (25 mM) nach verschiedenen Reaktionszeiten (0,5-5 min) gestoppt. Als interne Referenz wurden Zellen erst mit DM (35 mM) permeabilisiert (per.) und anschließend ebenfalls markiert. Die Aufreinigung des TAP-Komplexes erfolgte mittels Ni-NTA-Agarose über den C-terminalen His₁₀-Tag von TAP1. Aliquots aller Proben wurden im SDS-Gel (10 %) aufgetrennt und die TAP-assoziierte Fluoreszenz durch In-Gel Fluoreszenzbilder dokumentiert. Die Co-Aufreinigung von TAP1 und TAP2 wurde im Western Blot mit TAP1- (mAb 148.3) und TAP2-spezifischen (mAb 435.3) Antikörpern untersucht. Die relativen Zugänglichkeiten der Einzel-Cysteine für die Fluorophormarkierung sind im Graph gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Der Grad der Zugänglichkeit der Konstrukte S488C (●), T399C (○) und S436C (▲) wurde anhand von Intensitätsmessungen durch In-Gel Fluoreszenzanalyse ermittelt.

Der korrespondierende Western Blot mit TAP1- und TAP2-spezifischen Antikörpern zeigte für alle Konstrukte ein gleiches Expressionsniveau.

Die Ergebnisse der zeit-abhängigen Zugänglichkeitsstudien für die drei eingeführten Cysteine (T399C, S436C und S488C) sind im Graph der Abbildung 4.14 zusammengefasst. Die Daten zeigen deutlich, dass das Cystein an Position 436 im ER-Lumen lokalisiert sein muss, während sich die Cysteine 399 und 488 im Cytosol befinden.

4.2.5 TAP1 besitzt sechs zentrale Transmembransegmente

Weitere Experimente sollten Aufschluss über die strukturelle Organisation der Transmembrandomäne (TMD) von TAP1 erbringen und die Existenz von sechs „kanonischen“ Transmembransegmenten experimentell untermauern. Hierzu wurden einzelne Cysteine in den Sequenzbereich von Aminosäure 200-488 eingeführt und deren Zugänglichkeit durch Fluoreszein-5-Maleimid untersucht. Folgende Aminosäurepositionen wurden dabei ausgewählt: S220C, F265C, S326C, T399C, S436C und S488C.

Die Einzel-Cystein-Konstrukte F265C, T399C und S488C zeigten bei der Markierung mit Fluoreszein-5-Maleimid sowohl in Proben mit intakten ER-Membranen (i.M.) als auch in Referenzproben eine deutliche TAP-assoziierte Fluoreszenz, was auf eine freie Zugänglichkeit der Cysteine im Cytosol (siehe Abbildung 4.15 A) hinwies. Die Markierungsreaktion war spezifisch, da für ein Cystein-freies Konstrukt keine Markierung detektiert werden konnte.

Die gegenteilige Situation konnte für die Einzel-Cysteine an den Positionen 220, 326 und 436 beobachtet werden. Wie in Abbildung 4.15 B dargestellt, war in Proben mit intakten ER-Membranen (i.M.) keine TAP-assoziierte Fluoreszenz messbar, während die Referenzproben eine deutliche Markierung mit Fluoreszein-5-Maleimid erkennen ließen, was auf eine Lokalisation der Cysteine im ER-Lumen hindeutet. Eine einheitliche Expression von TAP1 und TAP2 konnte im Western Blot mittels TAP1- und TAP2-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Diese Daten liefern den experimentellen Beweis dafür, dass eine funktionale TAP1-Untereinheit im Sequenzbereich von Aminosäure 200-488 sechs für ABC-Transporter charakteristische Transmembransegmente, die *Core*-Domäne, aufweist.

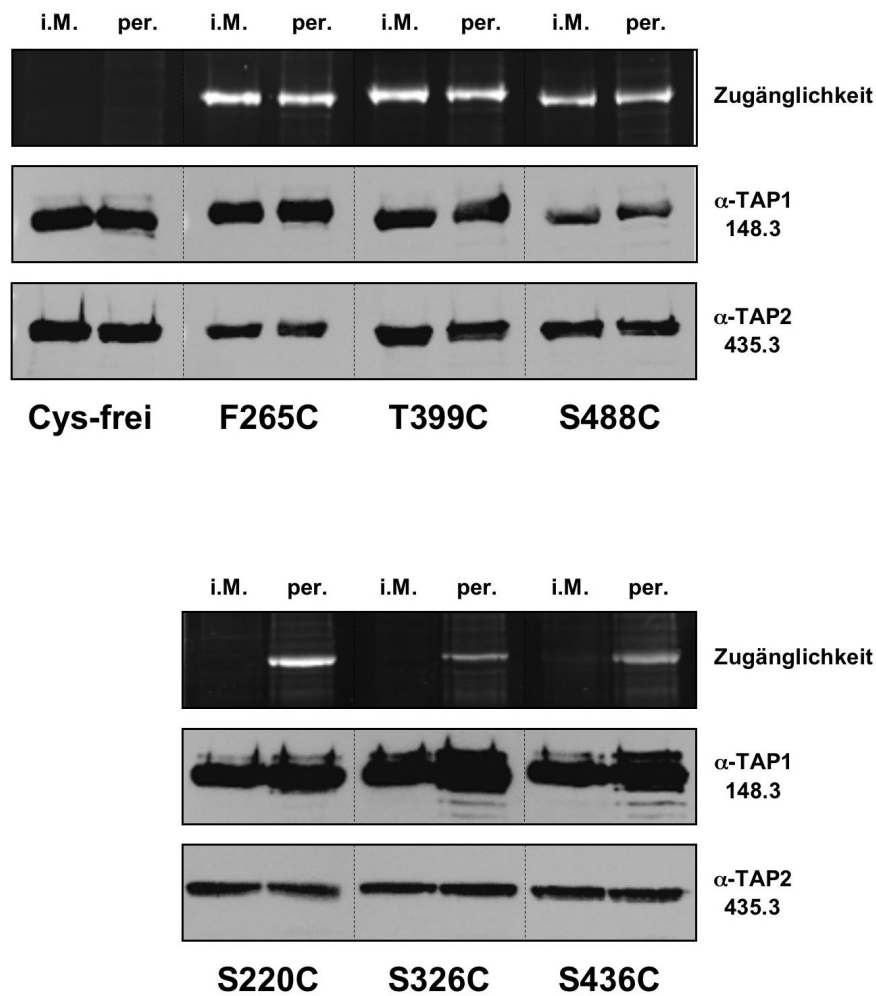


Abbildung 4.15: Markierung der Einzel-Cysteine der Core-Domäne von TAP1. Markierung der Einzel-Cysteine in vorhergesagten cytosolischen (F265C, T399C und S488C) und ER-luminalen Schleifen (S220C, S326C und S436C). S₉ Zellen, welche die einzelnen Cystein-Konstrukte exprimierten, wurden mit Fluoreszein-5-Maleimid (50 μ M) markiert und der TAP-Komplex über den C-terminalen His₁₀-Tag von TAP1 aufgereinigt. Aliquots wurden im SDS-Gel (10 %) aufgetrennt und die TAP-assoziierte Fluoreszenz mittels In-Gel Fluoreszenzanalyse dokumentiert. Die Co-Aufreinigung von TAP1 und TAP2 wurde im Western Blot mit TAP1- (mAb 148.3) und TAP2-spezifischen (mAb 435.3) Antikörpern untersucht.

4.2.6 Die Membrantopologie der N-terminalen Domäne von TAP1

Mitglieder der TAP-Familie besitzen zusätzliche, unique N-terminale Domänen, die kein Pendant in P-gp oder einem anderen ABC-Transporter außer TAP-like (ABCB9) haben. Studien mit verkürzten TAP-Konstrukten weisen darauf hin, dass diese N-

terminalen Regionen (Aminosäurereste 1-175 in TAP1 und 1-140 in TAP2) für die Bindung von Tapasin und die Assemblierung des Peptid-Beladungskomplexes essentiell sind, nicht jedoch für das ER-Targeting, die Membraninsertion, die Heterodimerisierung und den Peptidtransport von TAP benötigt wird (Koch *et al.*, 2004).

Zur Untersuchung der N-terminalen Domäne von TAP1 wurden Einzel-Cysteine an den Positionen 6, 51, 87, 124 und 179 durch ortsspezifische Mutagenese eingeführt.

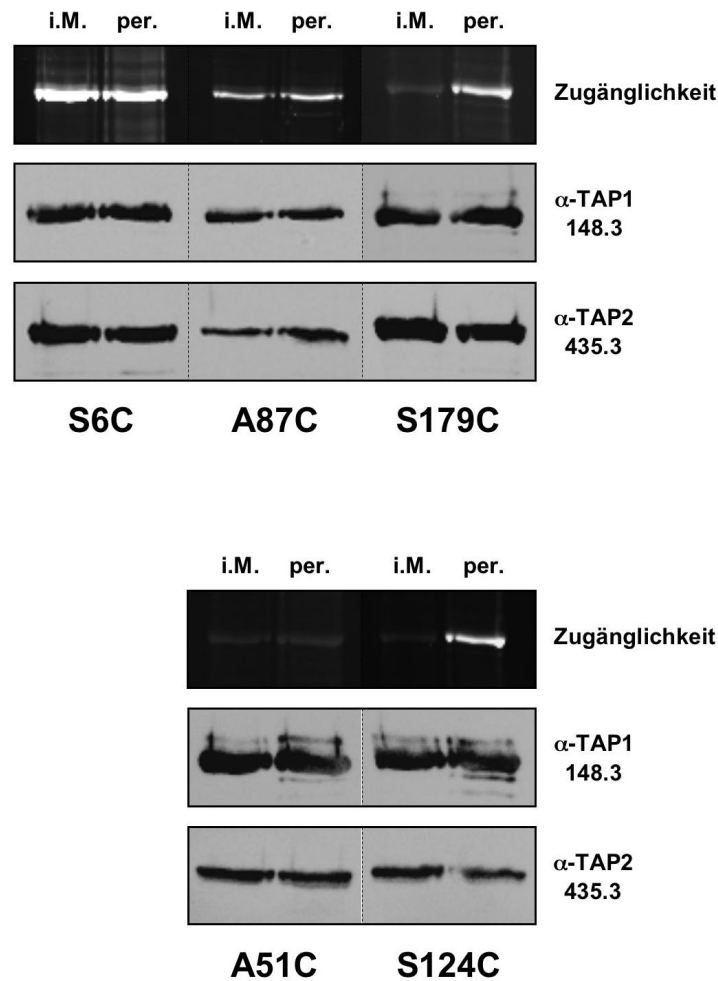


Abbildung 4.16: Markierung von Cysteinen in der N-terminalen Domäne von TAP1. Markierung der Einzel-Cysteine in vorhergesagten cytosolischen (S6C, A87C und S179C) und ER-luminalen Schleifen (A51C und S124C). *Sf9* Zellen, welche die einzelnen Cystein-Konstrukte exprimieren, wurden mit Fluoreszein-5-Maleimid (50 μ M) markiert und der TAP-Komplex über den C-terminalen His₁₀-Tag von TAP1 aufgereinigt. Aliquots wurden im SDS-Gel (10 %) aufgetrennt und die TAP-assoziierte Fluoreszenz mittels In-Gel Fluoreszenzanalyse dokumentiert. Die Co-Aufreinigung von TAP1 und TAP2 wurde im Western Blot mit TAP1- (mAb 148.3) und TAP2-spezifischen (mAb 435.3) Antikörpern untersucht.

Wie in Abbildung 4.16 dargestellt, zeigten die eingeführten Cysteine an den Positionen 6 und 87 im SDS-Gel sowohl intakten ER-Membranen (i.M.) als auch in vor der Markierungsreaktion permeabilisierten Membranen (per.) deutliche Fluoreszenzsignale. Somit sind diese Cysteine frei vom Cytosol zugänglich und dementsprechend dort lokalisiert. Im Gegensatz dazu zeigte das Konstrukt S124C keine Fluoreszenz in intakten ER-Membranen (i.M.) während permeabilisierte Membranen (per.) deutlich durch Fluoreszein-5-Maleimid markierbar waren. Das Cystein an Position 124 ist somit im ER-Lumen lokalisiert. Für die Konstrukte A51C und S179C mit einer vorhergesagten Lokalisation der Cysteine im ER-Lumen bzw. im Cytosol war die Zugänglichkeit für Fluoreszein-5-Maleimid während der Markierungsreaktion nicht gegeben. Das Cystein an Position 179 zeigte in Proben mit intakten ER-Membranen (i.M.) im Vergleich zu Ansätzen mit permeabilisierten Membranen (per.) ein schwächeres Fluoreszenzsignal. Die Markierung des Konstrukts A51 mittels des thiol-spezifischen Fluorophors erwies sich in beiden Proben als sehr schwach. Um weitere Informationen über die Lokalisation beider Cysteine A51C und S179C zu erhalten, wurden diese mit dem Membran-impermeablen Reagenz AMS vorinkubiert und anschließend mit Fluoreszein-5-Maleimid markiert. Diese Experimente lieferten keine weiteren Daten, die zur Aufklärung der Lokalisation beitragen (Daten nicht gezeigt). Die Co-Aufreinigung der verschiedenen Konstrukte wurde durch Western Blot-Analyse mit Hilfe von TAP1- und TAP2-spezifischen Antikörpern bestätigt.

4.2.7 Die Bindung von Tapasin führt zu keiner topologischen Veränderung der N-terminalen Domäne

Um zu untersuchen, ob die Bindung des Chaperons Tapasin an die N-terminale Domäne von TAP1 einen Einfluss auf ihre Membrantopologie hat, wurden die Einzel-Cystein-Konstrukte A51C, A87C, S124C und S179C zusammen mit Tapasin exprimiert (siehe Abbildung 4.17). Die Co-Expression und Co-Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose aller TAP-Konstrukte und Tapasin wurde mittels Western Blot-Analyse mit TAP1-, TAP2 und Tapasin-spezifischen Antikörpern überprüft. Die Zugänglichkeit der einzelnen Cysteine aller vier Konstrukte war in An- und Abwesenheit von Tapasin identisch. Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Bindung von Tapasin keinen Einfluss auf die Membrantopologie von TAP1 hat.

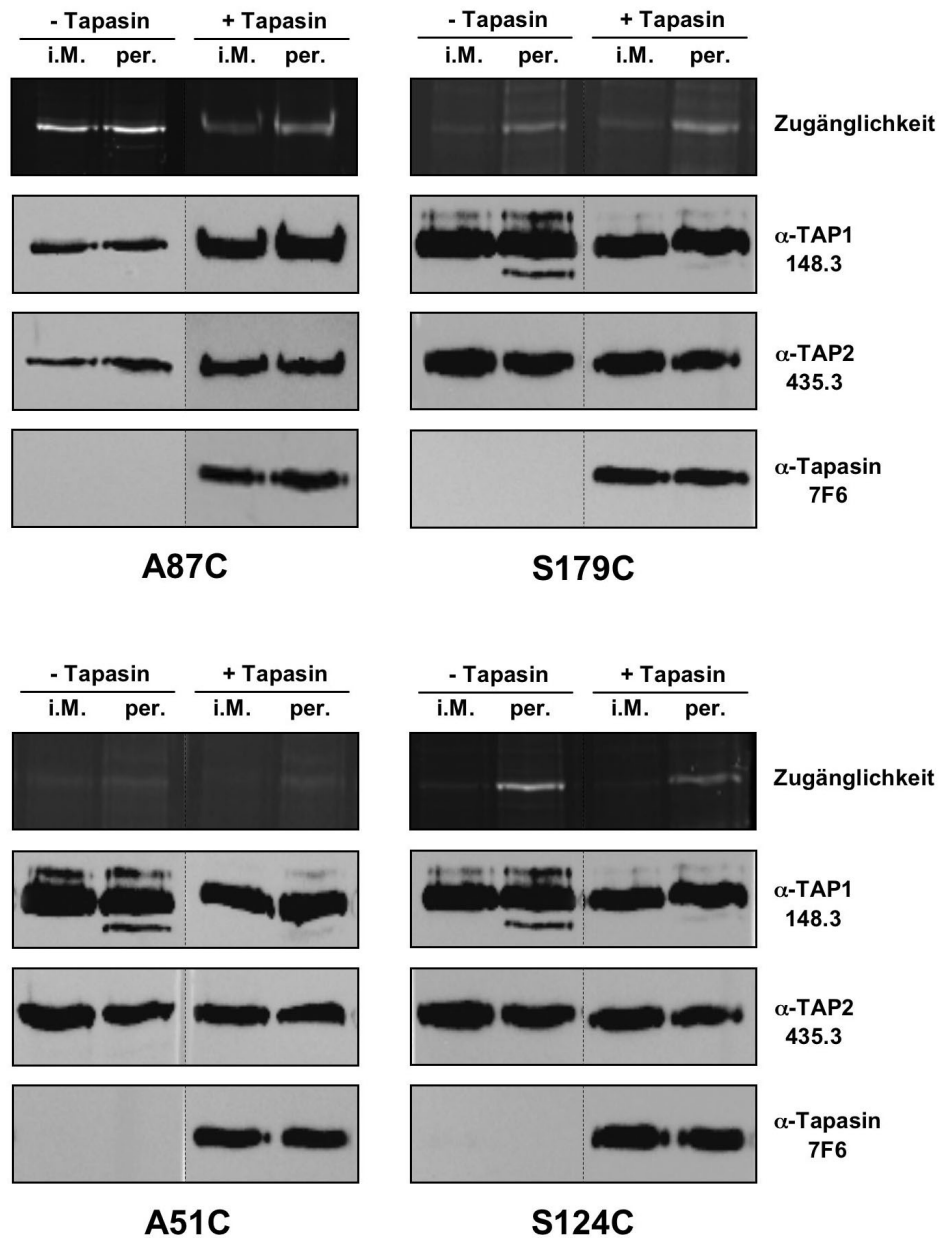


Abbildung 4.17: Markierung von Einzel-Cystein-Konstrukten in einem Komplex aus Tapasin und TAP. Markierung von einzelnen Cysteinen in vorhergesagten cytosolischen (A87C und S179) und ER-luminalen Schleifen (A51C und S124C) in An- und Abwesenheit von Tapasin. Nach der Markierungsreaktion mit Fluoreszein-5-Maleimid (50 μ M) wurde der TAP-Komplex über den C-terminalen His₁₀-Tag von TAP1 an Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und im SDS-Gel (10 %) aufgetrennt. Die TAP-assoziierte Fluoreszenz wurde durch In-Gel Fluoreszenzanalyse detektiert und die Co-Aufreinigung von TAP und Tapasin im Western Blot mit TAP1- (mAb 148.3), TAP2- (mAb 435.3) und Tapasin-spezifischen (7F6) Antikörpern überprüft.

4.3 Cystein 213 in TAP2 – ein Schalter für die Peptidbindung an TAP?

4.3.1 Klonierung und Expression von Kombinationen aus Cystein-freiem und wildtyp TAP in Sf9 Zellen

Anknüpfend an die Experimente mit humanen TAP1- und TAP2-defizienten Fibroblasten, die jeweils mit der fehlenden Cystein-freien TAP-Untereinheit stabil-transfiziert wurden, konnten analoge Konstrukte aus wildtyp TAP1 und Cystein-freiem TAP2 (wt/Cys-frei) bzw. Cystein-freiem TAP1 und wildtyp TAP2 (Cys-frei/wt) für die heterologe Expression in Sf9 Zellen generiert werden. Die heterologe Expression in Sf9 Zellen bietet im Vergleich zu humanen Fibroblastenzelllinien ein höheres Expressionsniveau des Proteins und eine isolierte Betrachtung des TAP-Komplexes ohne einen durch intrinsisches TAP verursachten Hintergrund. Die Herstellung von verschiedenen Mutanten wird durch die einfachere Handhabung der Insektenzellen zusätzlich begünstigt.

Hierzu wurde Cystein-freies *tap1* über *Bam*HI/*Hind*III-Schnittstellen unter Kontrolle des Polyhedrin-Promotors in den Expressionvektor pFastBac Dual eingebracht und mit wildtyp *tap2* über *Xho*I und Klenow-Auffüllreaktion kombiniert. Für die Konstruktion von wt/Cys-frei wurde wildtyp *tap1* mittels *Bam*HI/*Not*I und Cystein-freies *tap2* durch *Xho*I/*Nsi*I-Schnittstellen in den Expressionvektor pFastBac Dual kloniert. Nach Transposition in *E.coli* DH10Bac Zellen, Blau-Weiss-Selektion und Kolonie-PCR-Kontrolle wurde Bacmid-DNA für die Transfektion von Sf9 Zellen präpariert und rekombinate Viren hergestellt.

Wie in Abbildung 4.18 zu sehen ist, war die Expression für alle Konstrukte in Sf9 Zellen erfolgreich. Die unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten im SDS-Gel im Vergleich zu wildtyp TAP lassen sich aufgrund des C-terminalen His₁₀-Tags an TAP1 und des Strep-Tag I an TAP2 der Cystein-freien Untereinheiten erklären.

Die Heterodimerisierung von Cystein-freiem TAP1 bzw. TAP2 mit dem jeweiligen wildtyp-Partner wurde durch Co-Immunpräzipitation untersucht. Hierzu wurden Sf9 Zellen 72 h nach der Infektion geerntet, mit Digitonin solubilisiert und anschließend der TAP-Komplex durch Bindung an einem polyklonalen TAP2-spezifischen Antikörper co-immunpräzipitiert. Die Analyse erfolgte immunochemisch im Western Blot.

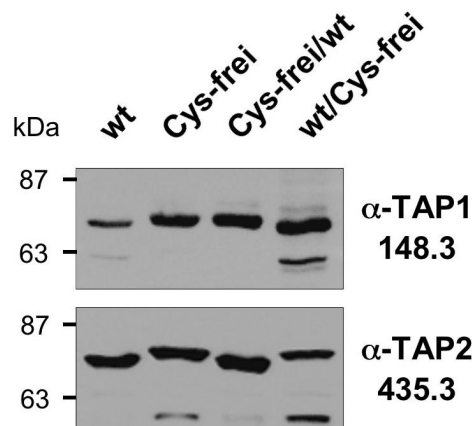


Abbildung 4.18: Expression von Kombinationen aus Cystein-freiem und wildtyp TAP. Mikrosomen (20 µg Protein pro Spur) aus Baculovirus-infizierten *Sf9* Zellen wurden durch SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und im Western Blot mit TAP1- (mAb 148.3) und TAP2-spezifischen (mAb 435.3) Antikörpern analysiert.

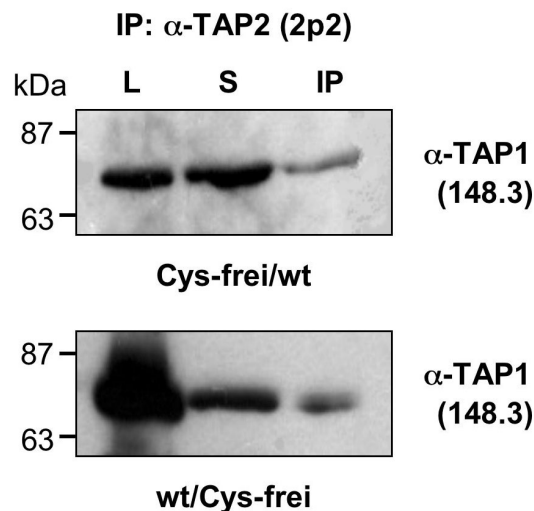


Abbildung 4.19: Co-Immünpräzipitation von Kombinationen aus Cystein-freiem und wildtyp TAP. Für die Immünpräzipitation wurden $2,5 \times 10^6$ *Sf9* Zellen in PBS resuspendiert (L) und mit 1 % Digitonin solubilisiert (S). Der TAP-Komplex wurde mit Hilfe des polyklonalen TAP2-spezifischen Antikörpers 2p2 co-immünpräzipitiert (IP), anschließend im SDS-Gel (10 %) aufgetrennt und im Western Blot durch den monoklonalen TAP1-spezifischen Antikörper 148.3 detektiert.

Die Abbildung 4.19 zeigt die erfolgreichen Co-Immünpräzipitationen der Konstrukte wt/Cys-frei und Cys-frei/wt aus Baculovirus-infizierten *Sf9* Zellen. TAP1 konnte deutlich im Western Blot nachgewiesen werden. Somit wurde der TAP-Komplex aus TAP1 und TAP2 vollständig exprimiert und assembliert. Im Folgenden wurde nun die Funktion des Peptidtransportes im Bezug auf Bindung und Transport von Peptiden untersucht.

4.3.2 Kombinationen aus Cystein-freiem und wildtyp TAP zeigen Unterschiede in der Funktionalität

Die Bindung eines Peptids ist die Grundvoraussetzung für einen erfolgreichen Transport über die ER-Membran durch den TAP-Komplex (Androlewicz und Cresswell, 1994; van Endert *et al.*, 1994). Zur Untersuchung, ob Kombinationen aus Cystein-freien und wildtyp Untereinheiten im TAP-Komplex einen Einfluss auf die Funktionalität des Transporters haben, wurde die maximale Peptidbindungskapazität jedes Konstrukts ermittelt. Hierzu wurden im Western Blot auf TAP1-Expression normierte Mikrosomen mit 2 μM radioaktiv-markiertem Peptid (RR(Y¹²⁵)QKSTEL) für 20 min auf Eis inkubiert. Der Anteil an unspezifischer Bindung wurde durch Einsatz eines Überschusses an nicht-markiertem Peptid (RRYQKSTEL) ermittelt und vom Messwert subtrahiert.

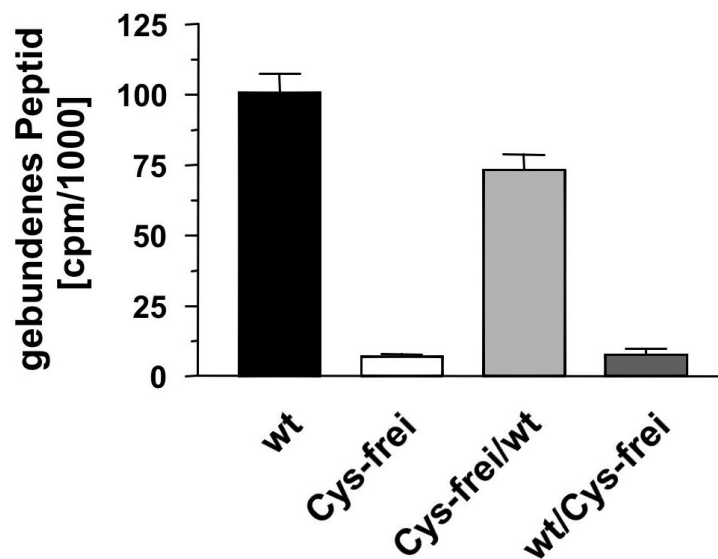


Abbildung 4.20: Peptidbindung an TAP. Für die Bestimmung der maximalen Peptidbindungskapazität (B_{max} -Wert) wurden Mikrosomen (durch Western Blot normalisiert) mit 2 μM des radioaktiv-markierten Peptids (RR(Y¹²⁵)QKSTEL) für 20 min auf Eis inkubiert. Die spezifische Peptidbindung [cpm/1000] wurde nach Abzug der Menge an unspezifischer Bindung aufgetragen.

Wie in Abbildung 4.20 zu sehen ist, zeigten die Konstrukte Unterschiede in der maximalen Peptidbindungskapazität, dem B_{max} -Wert. Für das Konstrukt Cys-frei/wt konnte im Vergleich zu einem wildtyp-Komplex ein auf 85 % verringerter B_{max} -Wert ermittelt werden. Im Gegensatz dazu wurde für den Cystein-freien TAP-Komplex und

der Kombination aus wildtyp TAP1 und mit der Cystein-freien TAP2-Untereinheit (wt/Cys-frei) eine deutlich geringere maximale Peptidbindung (ca. 10 %) bestimmt. Auffallend ist, dass diese Verminderung der maximalen Peptidbindung nur in TAP-Komplexen, die eine Cystein-freie TAP2-Untereinheit besitzen, auftritt. Die zehn Cysteine der TAP2-Untereinheit scheinen somit einen wesentlichen Einfluss auf die Bindung von Peptiden am TAP-Komplex zu haben.

Die Transportaktivität der Konstrukte wurde im Transport-Assay mit radioaktiv-markiertem Peptid (RR(Y¹²⁵)QNSTEL) untersucht. Für alle Konstrukte konnte ein ATP-abhängiger Peptidtransport, der spezifisch durch den viralen Inhibitor ICP47 inhibierbar war, gemessen werden.

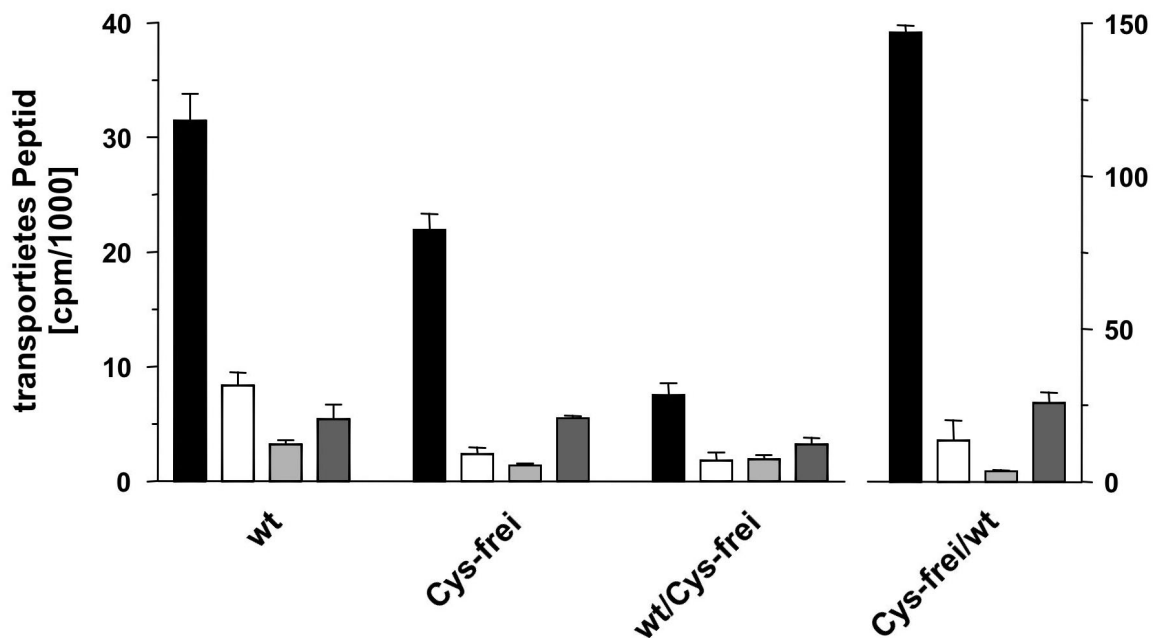


Abbildung 4.21: ATP-abhängiger Peptidtransport der Kombinationen aus Cystein-freiem und wildtyp TAP. Mikrosomen (durch Western Blot normalisiert) wurden im Transport-Assay mit 0,46 μM radioaktiv-markiertem Peptid (RR(Y¹²⁵)QNSTEL) für 3 min bei 32°C in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 3 mM MgATP inkubiert. Die glykosylierten und somit transportierten Peptide wurden an ConA-Beads gebunden und im *Gamma-Counter* quantifiziert. Analoge Transportexperimente wurden in An- und Abwesenheit von nicht-markiertem Kompetitorpeptid (250 μM RRYQKSTEL, hellgraue Balken) oder des viralen TAP Inhibitors ICP47 (20 μM , dunkelgraue Balken) durchgeführt.

Vergleiche zwischen den Transportaktivitäten von wildtyp TAP und Cystein-freiem TAP zeigen eine um ca. 15 % reduzierte Aktivität für den Komplex aus beiden

Cystein-freien Untereinheiten. Erstaunlicherweise ist die Funktionalität des Transports bei einem Konstrukt aus wildtyp TAP1 und der Cystein-freien TAP2-Untereinheit (wt/Cys-frei) im Vergleich zu Cystein-freiem TAP deutlich verringert (60 %). Dieses Ergebnis spiegelt allerdings die Daten der Peptidbindung wieder. Untersuchungen der Transportaktivität des umgekehrten Konstrukts aus Cystein-freiem TAP1 und wildtyp TAP2 (Cys-frei/wt) ergaben dagegen einen im Vergleich zu wildtyp TAP 300-fach besseren ATP-abhängigen Peptidtransport.

In einer Transportkinetikstudie konnten die Unterschiede der Transporteffizienz untermauert werden. Hierfür wurden die TAP-haltigen Membranen unterschiedlich lange (0,5-20 min) mit dem radioaktiv-markierten Peptid (RR(Y¹²⁵)QNSTEL) bei 32°C inkubiert.

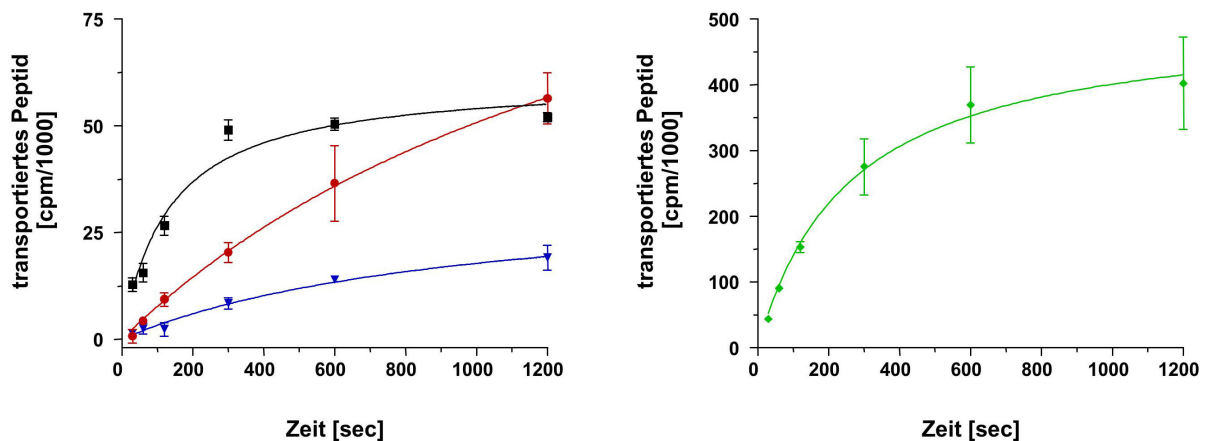


Abbildung 4.22: Transportkinetik der Kombinationen aus Cystein-freiem und wildtyp TAP.

Mikrosomen (durch Western Blot normalisiert) wurden im Transport-Assay mit 0,46 μ M radioaktiv-markiertem Peptid NSTEL (RR(Y¹²⁵)QNSTEL) für 0,5, 1, 2, 5, 10 und 20 min bei 32°C in An- und Abwesenheit von 3 mM MgATP inkubiert. Die glykosylierten und somit transportierten Peptide wurden an ConA-Beads gebunden und im *Gamma-Counter* quantifiziert. Im linken Graphen sind die jeweiligen Werte der Konstrukte wildtyp TAP (■), Cystein-freies TAP (●) und der Kombination aus wildtyp TAP1 und Cystein-freiem TAP2 (▲; wt/Cys-frei) nach Abzug des Hintergrunds gegen die Zeit aufgetragen. Der rechte Graph zeigt die Werte des Konstrukts aus Cystein-freiem TAP1 und wildtyp TAP2 (◆; Cys-frei/wt).

In Abbildung 4.22 sind die Ergebnisse der kinetischen Untersuchung dargestellt. Die initialen Ratenkonstanten sind sehr unterschiedlich. Deutlich zu erkennen ist die sehr langsame Transportkinetik für das Konstrukt wt/Cys-frei (▲), die sogar noch unter der eines Cystein-freien TAP-Komplexes (●) liegt. Wie schon aus den Transportstu-

dien vermutet werden kann, ist die Transportkinetik für das Konstrukt aus Cystein-freiem TAP1 und der wildtyp TAP2-Untereinheit (◆; Cys-frei/wt) besser als die für einen wildtyp TAP-Komplex (■).

4.3.3 Generierung von TAP2 Einzel-Cystein-Konstrukten

Die Sequenzregion von Aminosäure 330 bis 452 der TAP2-Untereinheit ist an der spezifischen Peptidbindung beteiligt (Nijenhuis und Hämmerling, 1996). Die Wiedereinführung einzelner Cysteine in diese Peptidbindungsregion sollte Aufschluss darüber geben, welches der 10 ausgetauschten Cysteine in einer Cystein-freien TAP2-Untereinheit für die eingeschränkte Funktionsfähigkeit verantwortlich ist.

Um die Region der Peptidbindung einzugrenzen, wurden parallel durch ortsspezifische Mutagenese einzelne Cysteine an den Positionen S353C, S362C und V394C wieder eingeführt sowie Varianten aus zwei (S353/362C) oder allen drei Cysteinen (triple Mut, S353/362C, V394C) kloniert. Außerdem erfolgte die Klonierung des Konstrukts aa1-265 wt. Dabei wurde die Cystein-freie Sequenz von TAP2 im Bereich der Aminosäuren 1-265 durch die wildtyp Sequenz ersetzt, so dass vier intrinsische Cysteine, nämlich an den Positionen 70, 197, 209 und 213 wiedereingeführt wurden. Alle Konstrukte wurden in Kombination mit Cystein-freiem *tap1* in den Expressionsvektor pFastBac Dual kloniert. Nach Blau-Weiß-Selektion der Klone konnte Bacmid-DNA für die Transfektion von *Sf9* Zellen präpariert und rekombinate Viren hergestellt werden. Alle Konstrukte konnten erfolgreich in Insektenzellen exprimiert werden (siehe Abbildung 4.23).

Die Variationen der Signale im Western Blot lassen sich durch das unterschiedliche Expressionsniveau der Konstrukte aufgrund von verschiedenen Virustitern erklären. Zur Untersuchung des Einflusses der einzelnen Cysteine auf die Transportaktivität des entsprechenden Konstrukts wurde eine vergleichende Transportstudie aller Mutanten durchgeführt. Hierzu wurde die TAP1-Expression aller Konstrukte im Western Blot normiert (Daten nicht gezeigt) und die jeweilige Menge an Membranen im Transport-Assay mit radioaktiv-markiertem Peptid (RR(Y¹²⁵)QNSTEL) in An- und Abwesenheit von MgATP (3 mM) für 3 min bei 32°C inkubiert. Glykosylierte Peptide wurden an ConA-Beads gebunden und im *Gamma-Counter* quantifiziert.

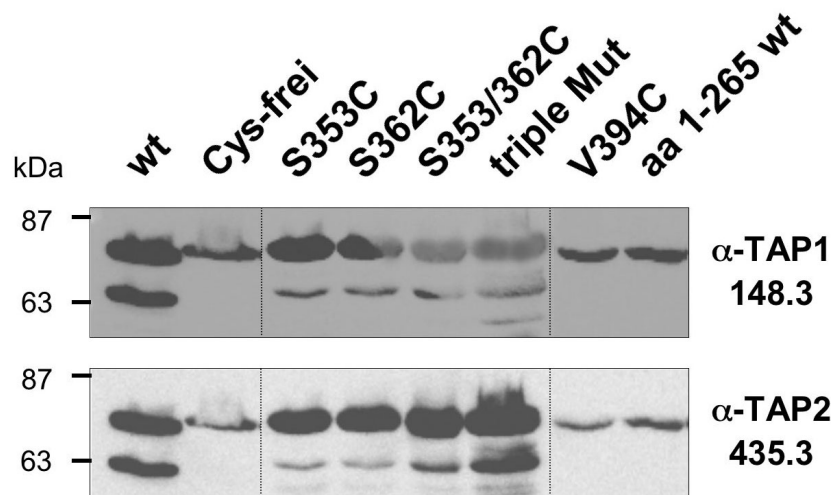


Abbildung 4.23: Expression der Einzel-Cystein-Konstrukte von TAP2. Membranen (50 µg Gesamtprotein/Spur) der Einzel-Cystein-Mutanten wurden mittels SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und immunochemisch im Western Blot mit TAP1- (mAb 148.3) und TAP2-spezifischen (mAb 435.3) Antikörpern analysiert.

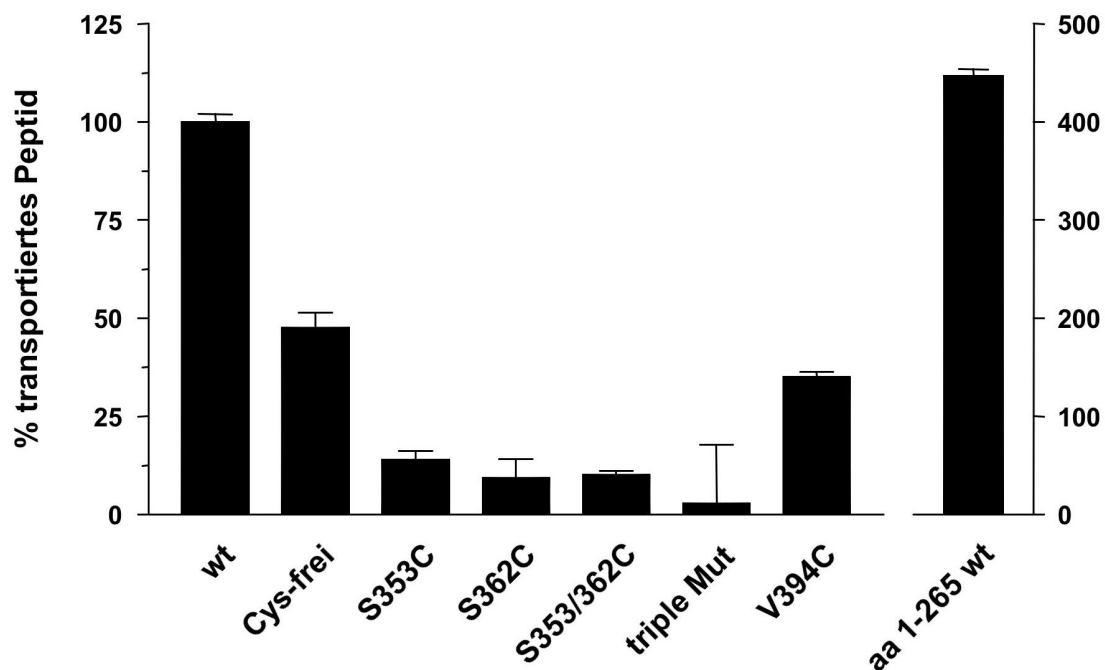


Abbildung 4.24: Transportstudien der Einzel-Cystein-Konstrukte von TAP2. Zur Untersuchung der Transportaktivität der verschiedenen Konstrukte wurden von Baculovirus-infizierten *Sf9* Zellen Membranen präpariert und deren TAP1-Konzentration anschließend im Western Blot normiert. Für den Transport-Assay wurden gleiche Mengen an TAP eingesetzt und mit 0,46 µM radioaktiv-markiertem Peptid (RR(Y¹²⁵)QNSTEL) für 3 min bei 32°C in An- und Abwesenheit von 3 mM MgATP inkubiert. Glykosylierte und somit transportierte Peptide wurden an ConA-Beads gebunden und im *Gamma-Counter* quantifiziert. Die relativen Transporteffizienzen von drei unabhängigen Transportstudien (Mittelwerte) sind im Vergleich zu der von wildtyp TAP dargestellt.

In Abbildung 4.1 sind die verschiedenen Transporteffizienzen der Cystein-Mutanten von TAP2 sowie die von wildtyp und Cystein-freien TAP-Komplexen dargestellt. Für die Konstrukte S353C, S362C, S353/362C und triple Mut konnten verglichen mit wildtyp TAP um 80-85 % verminderte Transporteffizienzen ermittelt werden. Im Vergleich zu einem Konstrukt aus Cystein-freiem TAP wurde eine maximale Transporteffizienz der oben beschriebenen Konstrukte von 20 % erreicht. Das Konstrukt V394C dagegen wies eine Transporteffizienz von annähernd der des Cystein-freien Komplexes auf. Überraschenderweise konnte die höchste Transportaktivität für das Konstrukt aa1-265 wt gemessen werden. Hier sind vier der 10 Cysteine von TAP2 an den Positionen 70, 197, 209 und 213 durch Klonierung einer wildtyp-Sequenz wieder eingeführt worden und scheinen essentiell für die Transporteffizienz des Konstrukts zu sein. Abgeleitet von Untersuchungen am mini6TAP (Koch *et al.*, 2004), einer um 166 (TAP1) bzw. 122 (TAP2) Aminosäuren N-terminal verkürzten uneingeschränkt aktiven TAP-Variante, könnten die Cysteine an den Positionen 197, 209 und 213 für die sehr gute Transporteigenschaft des Konstrukts aa1-265 wt verantwortlich sein. Das Cystein an Position 70 ist im mini6TAP-Konstrukt nicht mehr vorhanden und kann somit ausgeschlossen werden. Basierend auf diesen Daten wurden weitere Konstrukte zur Untersuchung der Funktionalität des TAP-Komplexes generiert.

4.3.4 Konstruktion ergänzender Einzel-Cystein-Mutanten von TAP2

Die folgenden drei Konstrukte, A197C, A209C und S213C wurden zur weiteren Untersuchung der Peptidbindungsregion aufgrund der vorausgegangenen Ergebnisse kloniert. Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurden an den Positionen 197, 209 und 213 einzelnen Cysteine in *tap2* wiedereingeführt und in Kombination mit Cystein-freiem *tap1* im Expressionsvektor pFastBac Dual kombiniert. Alle Klone wurden mittels PCR und Sequenzierung überprüft. Nach Blau-Weiß-Selektion wurde Bacmid-DNA für die Transfektion von Sf9 Zellen präpariert und rekombinate Viren hergestellt. Wie in Abbildung 4.25 zu sehen ist, konnten die Konstrukte erfolgreich in Sf9 Zellen exprimiert und mittels Western Blot-Analyse durch TAP-spezifische Antikörper detektiert werden. Von allen Konstrukten wurden Membranen für die folgenden Untersuchungen präpariert und über den Gehalt an TAP1 im Western Blot normiert.

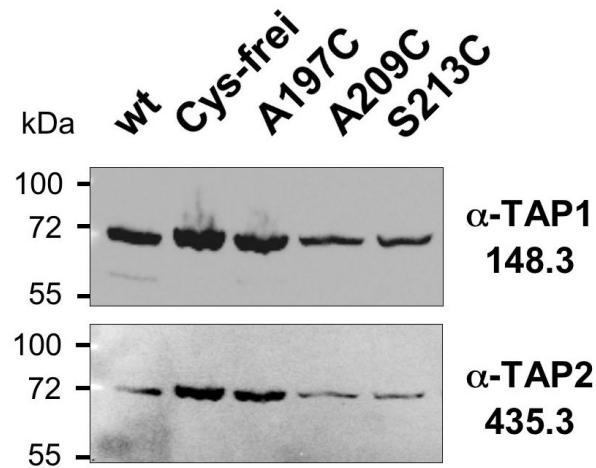


Abbildung 4.25: Expression von TAP2 Einzel-Cystein-Konstrukten. Membranen (50 µg Gesamtprotein/Spur) der Einzel-Cystein-Mutanten wurden mittels SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und immunochemisch im Western Blot durch TAP1- (mAb 148.3) und TAP2-spezifische (mAb 435.3) Antikörper detektiert.

4.3.5 Das Cystein 213 in TAP2 ist für die Peptidbindung essentiell

Zur Untersuchung der Peptidbindungskapazität des TAP-Komplexes wurde die maximale Peptidbindung (B_{\max} -Wert) der drei Konstrukte A197C, A209C und S213C analog zu 4.3.2 bestimmt.

Wie in Abbildung 4.26 zu entnehmen ist, konnte für das Konstrukt S213C überraschenderweise die gleiche maximale Peptidbindungskapazität für das radioaktiv-markierte Peptid (RR(Y¹²⁵)QKSTEL) wie für wildtyp TAP gemessen werden. Das wiedereingeführte Cystein in unmittelbarer Nachbarschaft in Position 209 sowie das Konstrukt A197C zeigten jedoch eine mit Cystein-freiem TAP vergleichbare Peptidbindungskapazität. Dieser drastische Unterschied der Konstrukte spiegelt sich auch im K_D -Wert für das Peptid (RR(Y¹²⁵)QKSTEL) wieder. Für das Konstrukt S213C konnte ein K_D -Wert von 240 ± 28 nM und für wildtyp TAP ein Wert von 250 ± 46 nM (Literaturwert: 213 ± 21 nM; (Koch *et al.*, 2004)) bestimmt werden (siehe Abbildung 4.26). Somit wurde für das Konstrukt S213C sowohl eine mit wildtyp TAP identische maximale Peptidbindungskapazität (B_{\max} -Wert), als auch ein im Rahmen des Fehlers identischer K_D -Wert gemessen.

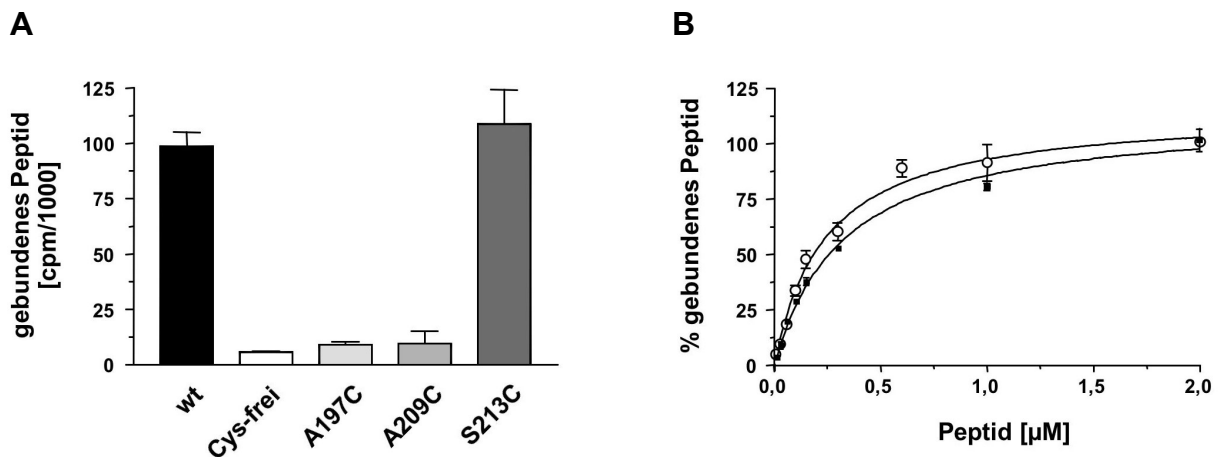


Abbildung 4.26: Peptidbindung an TAP. **A**, Für die Bestimmung der maximalen Peptidbindungskapazität (B_{max} -Wert) wurden Mikrosomen (durch Western Blot normalisiert) mit $2 \mu\text{M}$ des radioaktiv-markierten Peptids (RR(Y^{125})QKSTEL) 20 min auf Eis inkubiert. Die spezifische Peptidbindung wurde nach Abzug der Menge an unspezifischer Bindung aufgetragen. **B**, Zur Bestimmung des K_D -Wertes von wildtyp TAP (■) und dem Konstrukt S213 (○) wurden normalisierte Mikrosomen mit verschiedenen Konzentrationen an radioaktiv-markiertem Peptid ($10 \text{ nM} - 2 \mu\text{M}$; RR(Y^{125})QKSTEL) 20 min auf Eis inkubiert. Die spezifische Peptidbindung an TAP wurde durch Abzug der Menge an unspezifischer Bindung ermittelt. Es wurden die prozentualen Peptidbindungswerte des Konstrukts S213C und wildtyp TAP aufgetragen.

Ausgehend von den Ergebnissen der Peptidbindungsanalysen wurden Transportstudien zur Untersuchung der Konstrukte A197C, A209C und S213C durchgeführt. Hierzu wurden durch Western Blot-Analyse normierte Membranen mit $0,46 \mu\text{M}$ radioaktiv-markiertem Peptid (RR(Y^{125})QNSTEL) in An- und Abwesenheit von MgATP (3 mM) für 3 min bei 32°C inkubiert. Glykosylierte und somit transportierte Peptide wurden mittels ConA-Beads gebunden und anschließend im *Gamma-Counter* quantifiziert.

Abbildung 4.27 zeigt die Ergebnisse der Transportstudie. Deutlich zu erkennen ist der wiederhergestellte ATP-abhängige Transport des Konstruktes S213C, der vergleichbar mit wildtyp TAP ist und spezifisch durch den viralen Inhibitor ICP47 inhibiert werden konnte. Transportstudien in Anwesenheit einer hohen Konzentration von Kompetitorpeptid unterbanden den Peptidtransport ebenfalls. Die beiden anderen Konstrukte, A197C und A209C, wiesen dagegen einen geringen, jedoch ebenfalls spezifisch-inhibierbaren und kompetitierbaren Transport des Peptides auf, der vergleichbar mit dem eines Cystein-freien Konstruktes war.

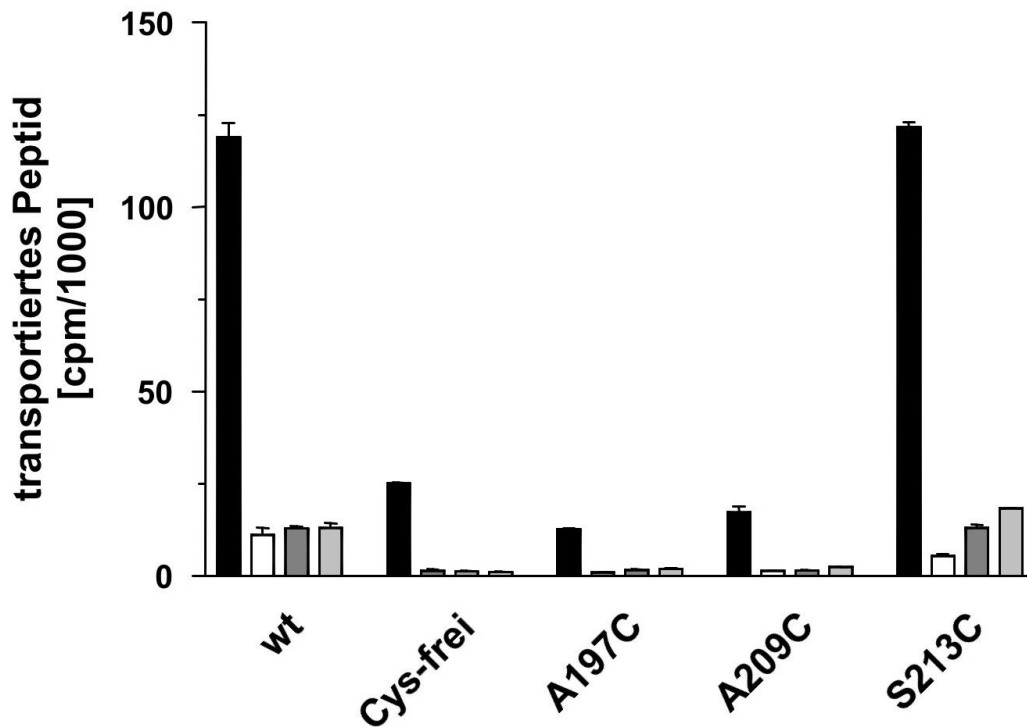


Abbildung 4.27: ATP-abhängiger Peptidtransport der Einzel-Cystein-Konstrukte A197C, A209C und S213C. Membranen (durch Western Blot normalisiert) wurden im Transport-Assay mit 0,46 μM radioaktiv-markiertem Peptid (RR(Y¹²⁵)QNSTEL) für 3 min bei 32°C in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 3 mM MgATP inkubiert. Die glykosylierten und somit transportierten Peptide wurden an ConA-Beads gebunden und im *Gamma-Counter* quantifiziert. Analoge Transportexperimente wurden in An- und Abwesenheit des viralen TAP Inhibitors ICP47 (20 μM , dunkelgraue Balken) oder von nicht-markiertem Kompetitorpeptid (250 μM RRYQKSTEL, hellgraue Balken) durchgeführt.

4.3.6 Die Peptidbindung des Konstruktes S213C ist durch thioispezifische Reagenzien inhibierbar

Ob das Cystein 213 in direktem Kontakt mit dem Peptid steht und inwiefern eine Peptidbindung durch Modifikation der Thiol-Gruppe beeinflusst werden kann, wurde in den folgenden Experimenten untersucht. Hierzu wurden Membranen in Peptidbindungsstudien in An- und Abwesenheit von verschiedenen thioispezifischen Reagenzien, wie NEM, Fluoreszein-5-Maleimid, Jodacetamidofluoreszein, MTSET, MTSES und MTSEA für 15 min auf Eis vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit

radioaktiv-markiertem Peptid (RR(Y¹²⁵)QKSTEL) für 20 min auf Eis. Der Anteil an unspezifischer Bindung wurde durch Einsatz eines Überschusses an nicht-markiertem Peptid (RRYQKSTEL) ermittelt und vom Messwert subtrahiert.

Wie in Abbildung 4.28 zu erkennen ist, konnte die Peptidbindung des Konstrukts S213C durch Vorinkubation mit allen verwendeten thiol-spezifischen Reagenzien deutlich inhibiert werden. Die stärkste Inhibition konnte dabei durch das positiv geladene Reagenz MTSEA erzielt werden. Die beiden anderen MTS-Reagenzien, MTSES (negativ geladen) und MTSET (positiv geladen) zeigten ebenfalls eine deutliche Inhibition der Peptidbindung. Weiterhin konnten die Fluorophore Fluoreszein-5-Maleimid und Jodactamidofluoreszein sowie NEM durch kovalente Bindung an das Cystein 213 die Bindung des Peptides an TAP verhindern.

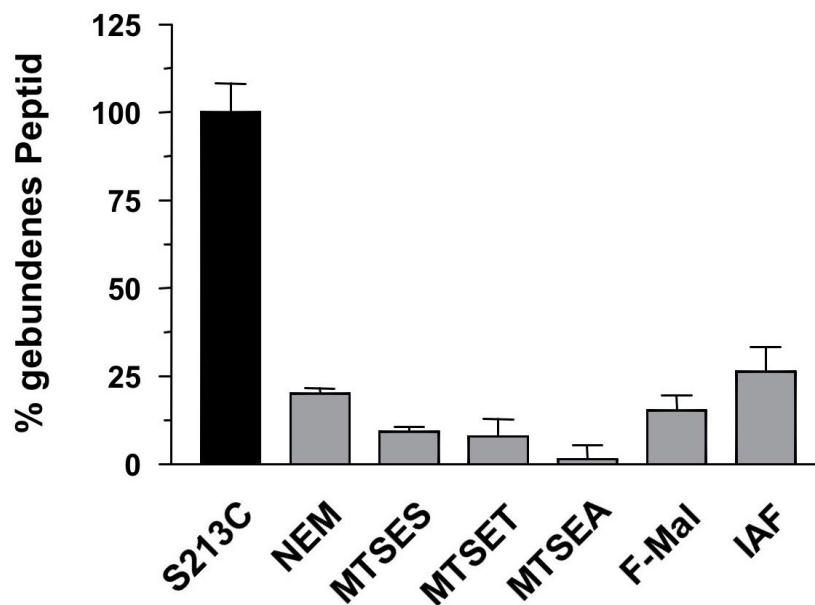


Abbildung 4.28: Inhibition der Peptidbindung des Konstruktes S213C. Für die Inhibitionsstudien wurden Membranen (20 µg Gesamtprotein) des Einzel-Cystein-Konstrukts S213C in An- und Abwesenheit von verschiedenen thiol-spezifischen Reagenzien (NEM, 500 µM; MTSES, 10 mM; MTSET, 1 mM; MTSEA, 2,5 mM (Konzentrationsangaben der MTS-Reagenzien nach (Loo *et al.*, 2004b)); Fluoreszein-5-Maleimid (F-Mal), 250 µM und Jodacetamidofluoreszein (IAF), 250 µM) für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der maximalen Peptidbindung (B_{max} -Wert) mit 2 µM des radioaktiv-markierten Peptids (RR(Y¹²⁵)QKSTEL) für 20 min auf Eis. Die spezifische Peptidbindung wurde nach Abzug der Menge an unspezifischer Bindung aufgetragen.

Desweiteren wurde von allen thiol-spezifischen Reagenzien der IC_{50} bestimmt, der die für eine 50 %ige Inhibition der Peptidbindung notwendige Konzentration des Reagenz, angibt. Hierzu wurden Membranen des Konstrukts S213C mit verschiedenen Konzentrationen (0,003-100 mM) an thiol-spezifischen Reagenzien, wie MTSES, MTSET, MTSEA und NEM vorinkubiert. Anschließend erfolgte ein Peptidbindungs-Assay mit radioaktiv-markiertem Peptid (RR(Y¹²⁵)QKSTEL).

In Abbildung 4.29 ist die Inhibitionskurve des negativ geladenen Reagenz MTSES dargestellt. Es konnte ein IC_{50} -Wert von $210 \pm 30 \mu\text{M}$ für die halbmaximale Inhibition des Konstrukts S213C gemessen werden. Für alle weiteren untersuchten Reagenzien, wie die positiv geladenen Moleküle MTSET und MTSEA sowie für NEM, konnten keine auswertbaren Daten ermittelt werden.

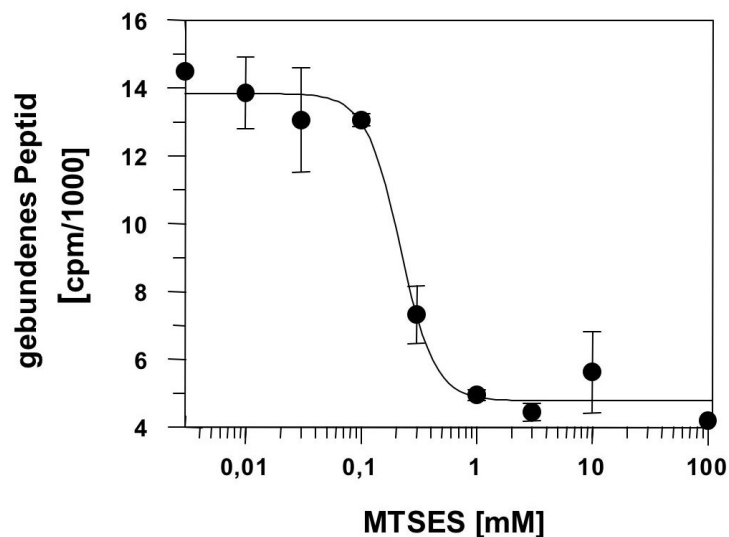


Abbildung 4.29: Bestimmung des IC_{50} -Wertes von MTSES. In Inhibitionsstudien zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes von MTSES wurden Membranen (20 μg Gesamtprotein) des Einzel-Cystein-Konstrukts S213C in An- und Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen (0,003-100 mM) an MTSES für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der maximalen Peptidbindung (B_{max} -Wert) mit 2 μM des radioaktiv-markierten Peptids (RR(Y¹²⁵)QKSTEL) für 20 min auf Eis.

4.3.7 Nonapeptide können spezifisch mit dem Konstrukt S213C quervernetzt werden

Zur Untersuchung einer direkten Interaktion zwischen den zu transportierenden Peptiden und dem wieder eingeführten Cystein an Position 213 wurden Quervernetzungsexperimente in Anwesenheit von Kupferphenanthrolin (CuPhe) mit acht verschiedenen Nonapeptiden (C1, C2 sowie C4-C9) durchgeführt, die jeweils ein Cystein an den Positionen 1, 2 und 4-9 (z.B. CRYQKSTEL = C1) besitzen. Kupferphenanthrolin ist in der Lage, durch Oxidation von zwei freien Cysteinen ein Disulfidbrücke zu bilden und somit das Peptid und den TAP-Komplex mit einem einzelnen Cystein kovalent miteinander zu verknüpfen.

TAP-haltige Membranen wurden mit den radioaktiv-markierten Quervernetzungspeptiden (z. B. CR(Y¹²⁵)QKSTEL) und CuPhe in An- und Abwesenheit von nicht-markiertem Kompetitorpeptid (RRYQKSTEL) auf Eis inkubiert und die Reaktion nach 15 min mit NEM gestoppt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des TAP-Komplexes mittels Ni-NTA-Agarose und die Auftrennung im SDS-Gel (10 %). Die mit TAP-assoziierte Radioaktivität wurde im Phosphoimager detektiert und der TAP-Gehalt immunochemisch durch TAP1- und TAP2-spezifische Antikörper im Western Blot analysiert.

Wie in Abbildung 4.30 zu sehen ist, konnten die Peptide C4-C9 mit einem Cystein an den Positionen 4-9 spezifisch mit dem Einzel-Cystein-Konstrukt S213C quervernetzt werden. Die Autoradiographie zeigte jeweils eine deutliche Bande, die durch die anschließende Western Blot-Analyse TAP zugeordnet werden konnte und durch Zugabe eines Überschusses an nicht-markiertem Peptid kompetitierbar war. Dabei konnte beobachtet werden, dass, je näher das Cystein im Nonapeptid in Richtung C-Terminus rückte, die Signalintensität der Autoradiographie geringer wurde. Die Peptide, C1 und C2, mit Cysteinen an den Positionen 1 und 2 dagegen zeigten keine Quervernetzung zu dem Einzel-Cystein-Konstrukt S213C. Es konnte keine spezifische TAP-assoziierte Radioaktivität nachgewiesen werden, was daraufhin deutet, dass der N-Terminus der verwendeten Peptide C1 und C2 bei der Bindung an TAP nicht in unmittelbarer Nähe des wieder eingeführten Cysteins 213 lokalisiert ist.

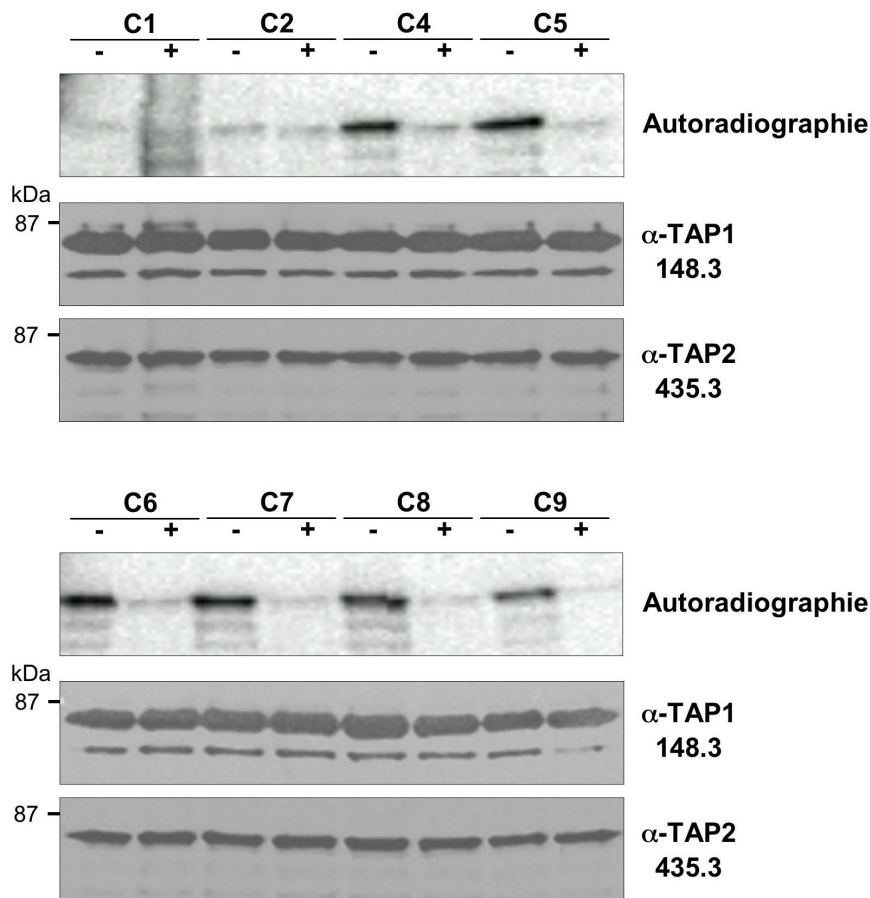


Abbildung 4.30: Quervernetzungsexperimente mit dem Einzel-Cystein-Konstrukt S213C. Membranen (0,5 mg Gesamtprotein) wurden mit 1,25 μ M radioaktiv-markierten Quervernetzungspeptiden (z. B. CR(Y¹²⁵)QKSTEL), die jeweils an den Positionen 1 und 2 sowie 4 bis 9 ein Cysteine in der Sequenz aufweisen, und CuPhe (1 mM CuSO₄ / 4 mM 1,10-Phenanthrolin) für 5 min bei 4°C in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von nicht-markiertem Kompetitorpeptid (RRYQKSTEL) inkubiert. Die Reaktion wurde mit NEM gestoppt, die Membranen mit DM solubilisiert und der TAP-Komplex über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt, die TAP-assoziierte Radioaktivität im Phosphoimager detektiert und der TAP-Gehalt anschließend immunochemisch im Western Blot mit TAP1- (mAb 148.3) und TAP2-spezifischen (mAb 435.3) Antikörpern analysiert.

5 Diskussion

ABC-Transporter bilden eine der größten Proteinfamilien, die in allen Organismen von Archaeen und Bakterien bis hin zu Eukaryoten vorkommen. Ihre unterschiedlichen intrazellulären Funktionsweisen und diverse Substratspezifitäten sind dabei von besonderer Bedeutung. Im humanen Organismus führen Defekte dieser ABC-Transporter zu gravierenden Erkrankungen, wie zum Beispiel der Mukoviszidose, für deren Entstehung eine Punktmutation im Gen des CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) verantwortlich ist. Um die komplexe Funktionsweise von ABC-Transportern verstehen zu können, ist die Aufklärung der strukturellen Organisation der Proteine von entscheidender Bedeutung.

In der Literatur werden zur Untersuchung der Proteinorganisation erfolgreich Cystein-freie Varianten verwendet, da diese durch Wiedereinführung von einzelnen Cysteinen spezifisch modifiziert werden können, ohne jedoch die Gesamtorganisation des Proteins dabei zu beeinflussen. So konnte mittels der Cystein-freien Variante von P-glycoprotein die Membrantopologie (Loo und Clarke, 1995; Loo und Clarke, 2000) und der Mechanismus der Substratbindung (Loo *et al.*, 2004a) aufgeklärt werden. Die Grundlage für die Bestimmung der Kristallstruktur der Lactose-Permease LacY (Abramson *et al.*, 2003; Kaback, 2005) lieferten biochemische Untersuchungen einer Einzel-Cystein-Variante des Proteins (Kaback *et al.*, 2001).

In den vergangenen Jahren konnten große Fortschritte bei der funktionalen und strukturellen Untersuchung des ABC-Transports TAP gemacht werden. Nichtsdestotrotz blieben einige Fragestellungen bezüglich der Funktionalität und der strukturellen Organisation bis heute unbeantwortet. Die Herstellung und Modifikationen einer Cystein-freien Variante des Transporters TAP bietet daher eine gute Ausgangsbasis zur Aufklärung der Membrantopologie oder der Untersuchung der Peptidbindungsregion von TAP.

5.1 Funktionale Cystein-freie TAP-Untereinheiten

5.1.1 Herstellung und Funktionsanalyse von Cystein-freien TAP-Untereinheiten

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung von Cystein-freien Untereinheiten des heterodimeren ABC-Transporters TAP. TAP besitzt 19 intrinsische Cysteine, von denen neun in TAP1 und 10 in TAP2 lokalisiert sind. Diese Cysteine wurden gegen andere Aminosäuren wie Serin oder Alanin ausgetauscht. An speziellen Positionen in TAP2 (C394 und C540) wurden aufgrund der Homologie zu TAP-Komplexen anderer Organismen beide Cysteine durch Valin bzw. Histidin ersetzt. Mittels *de novo* Gensynthese konnten so aus fünf doppelsträngigen DNA-Fragmenten mit einer Länge von 400-450 Basenpaaren die Cystein-freien Gene von *tap1* und *tap2* assembliert und in einen Expressionsvektor für die Transfektion in humanen Zelllinien kloniert werden. TAP1- (BRE.TAP1-/-) und TAP2- (STF.TAP2-/-) defiziente humane Fibroblasten (de la Salle *et al.*, 1999), die ansonsten alle weiteren Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie besitzen, wurden mit der jeweils fehlenden Cystein-freien bzw. wildtyp Untereinheit von TAP stabil-transfiziert. Nach genomischer PCR konnten Klone mit integriertem Cystein-freien *tap1* oder *tap2* weiter kultiviert werden und nach Membranpräparation im SDS-Gel analysiert werden. Nach der stabilen Transfektion von TAP1-defizienten BRE.TAP1-/- Zellen mit Cystein-freiem (BRE.TAP1dn) oder wildtyp (BRE.TAP1wt) TAP1 konnte eine Expression von TAP1 mit Hilfe eines monoklonalen TAP1-spezifischen Antikörpers im Western Blot nachgewiesen werden. T1-Kontroll-Zellen, die eine vollständige Antigenprozessierungsmaschinerie besitzen, wiesen ebenfalls ein Bande bei ~ 71 kDa auf, während bei nicht-transfizierten Zellen keine Bande detektierbar war. Die Expression von Cystein-freiem (STF.TAP2dn) bzw. wildtyp (STF.TAP2wt) TAP2 in stabil-transfizierten STF.TAP2-/- Zellen wurde mittels eines monoklonalen TAP2-spezifischen Antikörpers 429.3 im Western Blot analysiert. Das Expressionsniveau der jeweils stabil-integrierten Cystein-freien und wildtyp TAP2-Untereinheit war so gering, dass ein Nachweis im Western Blot fehlschlug. Auch der Einsatz von weiteren monoklonalen und polyklonalen TAP2-spezifischen Antikörpern brachte keine Verbesserung der Western Blot-Qualität. Die genomische Integration

der Gene konnte jedoch durch PCR bestätigt werden. Obwohl die TAP2-Expression und -Stabilität ein limitierender Faktor eines funktionalen Komplexes aus TAP1 und TAP2 sind, konnten nachfolgende Studien des ATP-hängigen Peptidtransports und die Wiederherstellung der MHC I-Oberflächenexpression die Funktionalität des TAP-Komplexes aus Cystein-freiem TAP2 und intrinsischem TAP1 in STF.TAP2dn-Transfektanten zeigen (siehe unten).

Der Transport von antigenen Peptiden aus dem Cytosol in das ER-Lumen ist einer der zentralen Schritte der MHC I-vermittelten Antigenpräsentation. Der ABC-Transporter TAP spielt dabei die entscheidende Rolle. Ob der Austausch der neun bzw. 10 Cysteine der TAP1- und TAP2-Untereinheit einen Einfluss auf die Funktionalität des heterodimeren Komplexes hat, sollte in Peptidtransportstudien analysiert werden. Die Transportaktivität der mit Cystein-freiem TAP1 oder TAP2 stabil-transfizierten BRE.TAP1dn und BRE.TAP1wt sowie STF.TAP2dn und STF.TAP2wt Zelllinien wurde in Experimenten an semi-permeabilisierten Zellen untersucht. Für alle Konstrukte aus Cystein-freiem TAP1 und intrinsischem TAP2 (BRE.TAP1dn und BRE.TAP1wt) sowie für TAP2-transfizierte Zellen (STF.TAP2dn und STF.TAP2wt) konnte ein ATP-abhängiger Peptidtransport gemessen werden, der im Bereich der Transporteffizienz eines Komplexes aus wildtyp TAP lag (siehe Abbildung 4.3). Interessanterweise zeigten BRE.TAP1dn oder BRE.TAP1wt Zelllinien im Vergleich zu STF-Transfektanten eine leicht gesteigerte Transportaktivität, was jedoch auch auf eine leicht erhöhte Expression von TAP1 zurückzuführen ist. Nicht-transfizierte Zellen (BRE.TAP1^{-/-} oder STF.TAP2^{-/-}) wiesen keine Transportaktivität auf. In Kompetitionsstudien mit nicht-markiertem Peptid und Versuchen mit ICP47, einem TAP-spezifischen viralen Inhibitor (Ahn *et al.*, 1996), konnte desweiteren die Spezifität des Transportes bewiesen werden. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass die ausgetauschten Cysteine in TAP1 und TAP2 nicht essentiell für die Transportfunktion des ABC-Transporters TAP sind.

5.1.2 Wiederherstellung der MHC Klasse I-Oberflächenexpression durch Cystein-freies TAP1 und TAP2

Die ersten Indizien für einen Peptidtransporter innerhalb der Antigenprozessierungsmaschinerie lieferten Studien an mutierten Zelllinien, die eine Reduktion der MHC I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche aufwiesen (Hosken und Bevan, 1990). Wurden diese Zellen mit cDNA von *tap1* und *tap2* transfiziert, so konnte die Oberflächenexpression der MHC I-Moleküle wieder hergestellt werden (Spies und DeMars, 1991).

Die Untersuchung der Cystein-freien TAP1- und TAP2-Untereinheiten basierte auf dem gleichen Prinzip. TAP1- (BRE.TAP1^{-/-}) und TAP2- (STF.TAP2^{-/-}) defiziente humane Fibroblasten (de la Salle *et al.*, 1999) wurden mit der jeweiligen Cystein-freien TAP-Untereinheit stabil-transfiziert und Zellklone aller Konstrukte mittels FACS-Analyse bezüglich der Oberflächenexpression von MHC I-Molekülen untersucht. Es stellte sich heraus, dass sowohl Cystein-freie TAP1- als auch TAP2-Untereinheiten in Kombination mit der entsprechenden wildtyp Untereinheit (BRE.TAP1^{dn} bzw. STF.TAP2^{dn}) ein funktionales Heterodimer bilden können und in der Lage sind, Peptide in das ER-Lumen zu transportieren, die anschließend durch MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die Oberflächenexpression der MHC I-Moleküle ist dabei mit der von mit wildtyp Untereinheiten (BRE.TAP1^{wt} oder STF.TAP2^{wt}) transfizierten Zellen vergleichbar (siehe Abbildung 4.4). Die Anzahl der exprimierten MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche von TAP1-Transfektanten war um eine Größenordnung höher als bei TAP2-Transfektanten, was jedoch auf die geringere Expression von TAP2 zurückzuführen ist. Nicht-transfizierte Zellen (BRE.TAP1^{-/-} und STF.TAP2^{-/-}) zeigten dagegen eine im Bereich des Hintergrunds der Messung liegende, sehr geringe Expression der MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche.

Diese Ergebnisse belegen, dass durch Transfektion der TAP-defizienten Zelllinien mit der jeweiligen TAP-Untereinheit die vorher defekte Antigenprozessierungsmaschinerie wieder vollständig hergestellt werden kann. Heterodimere TAP-Komplexe aus wildtyp und Cystein-freien TAP-Untereinheiten sind somit in transfizierten humanen Fibroblasten in ihrer Funktionalität nur kaum von wildtyp TAP-Komplexen zu unterscheiden.

5.2 Membrantopologie von TAP im funktionalen Peptid-Beladungskomplex

5.2.1 Expression und Funktion des Cystein-freien TAP-Komplexes und Einzel-Cystein-Mutanten von TAP1

Die Analyse und die Kristallisation von Membranproteinen, insbesondere von eukaryotischen Membrankomplexen, ist sehr schwierig. Eine initiale Methode bietet der Einsatz von verschiedenen Algorithmen in Hydrophobizitätsanalysen, durch die für eine Proteinsequenz die Aufenthaltswahrscheinlichkeit einer Transmembranhelix berechnet werden kann. Basierend auf Sequenzvergleichen von ABC-Transportern der Subfamilie B in Kombination mit Hydrophobizitätsanalysen konnten für den TAP-Komplex zehn bzw. neun Transmembransegmente für TAP1 bzw. TAP2 vorhergesagt werden (Lankat-Buttgereit und Tampé, 1999; Tampé *et al.*, 1997). Nichtsdestotrotz ist die Vorhersage solcher Programme für ABC-Transporter fehlerbehaftet, da die Länge und die Hydrophobizität der Transmembransegmente stark variiert.

Experimentelle Ansätze zur Aufklärung der Membrantopologie des Transporters TAP wurden an nicht-funktionalen verkürzten, oder mit Reporterproteinen fusionierten TAP-Untereinheiten durchgeführt (Vos *et al.*, 2000; Vos *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, ohne jedoch einen Beweis für die Funktionalität des Transporters zu haben, dass die Translokationspore für antigene Peptide durch die sechs bzw. fünf N-terminalen Transmembransegmente von TAP1 und TAP2 gebildet wird (Vos *et al.*, 2000; Vos *et al.*, 1999). Um eine Aussage über die Membrantopologie treffen zu können, darf der Transporter in seiner Membranlokalisation nicht beeinflusst werden und die Funktionalität des Komplexes sollte erhalten bleiben. Konsequenterweise konnte durch neuere Untersuchungen des ABC-Transportes TAP (Koch *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2005) das Modell einer N-terminalen Translokationspore widerlegt werden. Es wurde gezeigt, dass für einen Transport von antigenen Peptiden über die ER-Membran eine minimale Funktionseinheit von sechs C-terminalen Transmembransegmenten notwendig ist, welche für TAP1 die Aminosäuren 167-488 umfasst und für TAP2 auf die Sequenzregion von Position 123-454 eingegrenzt werden konnte.

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Untersuchungen an primären und sekundären Transportern vorgenommen, um deren Membrantopologie aufzuklären.

Eine Methode, die bereits gute Ergebnisse geliefert hat, ist die ortsspezifische Mutagenese in Kombination mit der thiol-spezifischen Markierung von eingeführten Cysteinen. Ihr Vorteil liegt in einer geringen Beeinträchtigung der strukturellen Gesamtorganisation des Proteins durch den gezielten Austausch einzelner Aminosäuren durch Cysteine. Mit Hilfe dieser Methode konnten schon eine Reihe von Membrantopologien von Proteinen, zum Beispiel die der Lactose-Permease LacY (Kaback *et al.*, 2001), des Multidrogentransporters P-glycoprotein (P-gp, (Loo und Clarke, 1995), des GAT-1 Transporters (Bennett und Kanner, 1997), des Glutamat-Transporters GLT-1 (Grunewald *et al.*, 1998) und des MotA-Proteins (Zhou *et al.*, 1995) untersucht und gelöst werden.

Zur Analyse der Membrantopologie von TAP wurden die beiden durch *de novo* Gen-synthese generierten Cystein-freien TAP-Untereinheiten heterolog in Sf9 Zellen exprimiert. Die Cystein-freien Untereinheiten TAP1 und TAP2 bilden ein funktionsfähiges Heterodimer, dessen ATP-abhängiger Peptidtransport spezifisch durch den viralen Inhibitor ICP47 unterdrückt werden konnte. Ausgehend von diesem Konstrukt wurden nach Sequenzvergleichen mit TAP-Komplexen anderer Spezies in Kombination mit Hydrophobizitätsanalysen einzelne Cysteine durch ortsspezifische Mutagenese an definierten Positionen (siehe Abbildung 4.8) in die TAP1-Untereinheit eingefügt. Dabei handelt es sich um Positionen in vorhergesagten Schleifen zwischen benachbarten Helices, die entweder im ER-Lumen oder im Cytosol lokalisiert sind. Alle TAP1-Konstrukte wurden nach Kombination mit der Cystein-freien TAP2-Untereinheit erfolgreich in Sf9 Zellen exprimiert und zeigten in Transportstudien mit radioaktiv-markiertem Peptid einen ATP-abhängigen Peptidtransport, der bei fast allen Konstrukten im Bereich dessen von Cystein-freiem TAP lag (siehe Abbildung 4.10). Die Transporteffizienzen der Konstrukte S179C und S326C lagen im Vergleich zu der von Cystein-freiem TAP um ca. 30 % höher. Das Konstrukt F265C zeigte dagegen eine um ungefähr 70 % reduzierte Transportaktivität. Durch Mutation und Deletion der Position F265 in TAP1 konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass diese Aminosäure einen Einfluss auf die Transporteffizienz, nicht jedoch auf die Peptidbindung von TAP hat (Ritz *et al.*, 2003).

Zusammengefasst zeigen die Funktionsanalysen der Einzel-Cystein-Konstrukte, dass nach Einführung der Cysteine in die Proteinsequenz von TAP1 für alle TAP-Varianten ein ATP-abhängiger Transport gemessen werden konnte. Es handelt sich also bei allen Konstrukten, im Gegensatz zu früheren Studien (Vos *et al.*, 2000; Vos

et al., 1999), um funktionsfähige TAP-Komplexe, deren funktionale Integrität nicht beeinflusst ist.

Die Membrantopologie der TAP1-Untereinheit wurde im Folgenden durch Zugänglichkeitsstudien mit einem thiol-spezifischen Fluorophor in semi-permeabilisierten Zellen untersucht.

5.2.2 Cystein-Zugänglichkeitsstudien zur Bestimmung der Membrantopologie der TAP1-Untereinheit

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Membrantopologie der TAP1-Untereinheit des ABC-Transporters TAP. Hierfür wurde durch Markierung mit einem thiol-spezifischen Fluorophor die Zugänglichkeit der einzelnen in TAP1 eingeführten Cysteine in einem funktionalen TAP-Komplex untersucht. Hierzu wurden semi-permeabilisierte Zellen mit Fluoreszein-5-Maleimid markiert und anschließend der TAP-Komplex über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und die mit TAP assoziierte Fluoreszenz in In-Gel Fluoreszenzanalysen bestimmt. Es konnte zum ersten Mal die Membrantopologie von TAP1 in einem funktionalen TAP-Komplex aufgeklärt werden. Wie in Abbildung 4.8 zusammengefasst, sind die Cysteine der Konstrukte S220C, S326C und S436C im ER-Lumen lokalisiert, während für die Konstrukte F265C, T399C und S488C eine cytosolische Lokalisation bestimmt werden konnte. Alle eingeführten Cysteine befinden sich in einer Region von TAP, die essentiell für die Heterodimerisierung, die Peptidbindung und den Transport des TAP-Komplexes ist (Koch *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2005). Ausgehend von den beschriebenen Ergebnissen (siehe auch Abbildung 4.14) kann somit für den Transporter TAP die Existenz von 6+6 Transmembransegmenten, der sogenannten *Core*-Domäne, die für eine Vielzahl von ABC-Transportern charakteristisch ist, bekräftigt werden. Die in früheren Studien postulierte N-terminale Translokationspore (Vos *et al.*, 2000; Vos *et al.*, 1999) konnte folglich ein weiteres Mal experimentell widerlegt werden. Dies zeigt, dass die falsche Membrantopologie auf nicht-funktionale TAP-Varianten zurückzuführen ist.

Die TMDs von TAP1 und TAP2 setzen sich aus der *Core*-Domäne und den zusätzlichen, unique N-terminale Domänen, die für die Bindung des Chaperons Tapasin und die Assemblierung des Peptidbeladungskomplexes (PLC) essentiell sind, zusammen (Koch *et al.*, 2004). Zur Untersuchung der Membrantopologie der N-

terminalen Domäne von TAP1, die durch die Aminosäuren 1-175 gebildet wird, wurden die Einzel-Cystein-Konstrukte S6C, A51C, A87C, S124C und S179C analysiert. Die deutliche Markierung des Einzel-Cystein-Konstrukts S6C (siehe Abbildung 4.12) zeigt eine klare cytosolische Lokalisation des N-Terminus, was in Kombination mit den oben dargestellten Ergebnisse eine gerade Anzahl von Transmembransegmenten für TAP1 bedingt, da ebenfalls die NBD von TAP im Cytosol zu finden ist (Gorbulev *et al.*, 2001) (vergleiche Abbildung 5.1). Hydrophobizitätsanalysen liefern für den N-terminalen Bereich, im Gegensatz zu anderen Sequenzbereichen, gut definierte Transmembransegmente für TAP1. Die cytosolische Lokalisation der Cysteine an den Positionen 6 und 87 konnte experimentell bewiesen werden (siehe Abbildung 4.16), wogegen für das Konstrukt S124C eine Lokalisation im ER-Lumen erhalten wurde.

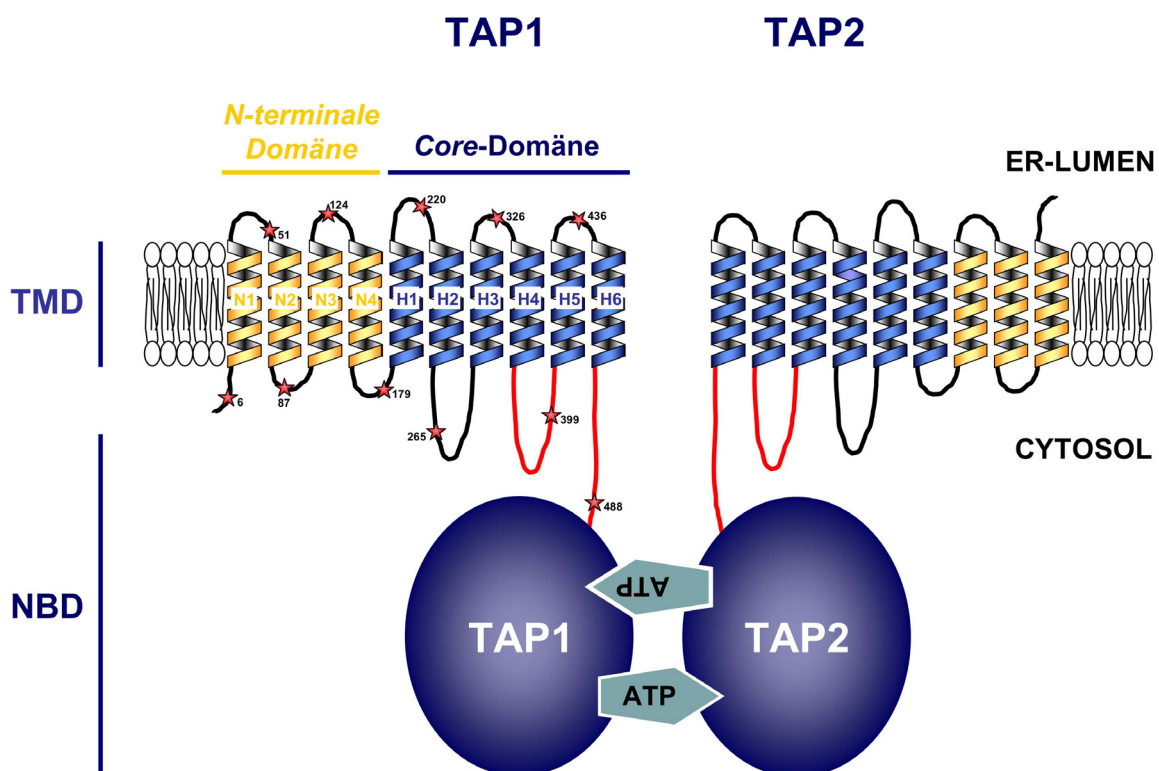


Abbildung 5.1: Strukturelle Organisation des TAP-Komplex. Eine TAP-Untereinheit besteht aus der Transmembrandomäne (TMD) und einer Nukleotidbindungsdomäne (NBD). Die TMD kann weiterhin in die Core-Domäne (H1-H6) und eine N-terminale Domäne (N1-N4) unterteilt werden. Die Positionen der zur Untersuchung der Membrantopologie eingeführten Cysteine sind durch rote Sterne dargestellt.

Nach den durchgeführten Markierungsversuchen ist es schwierig über die Lokalisation der Cysteine an den Positionen A51C und S179C eine eindeutige Aussage zu treffen. Selbst nach Variation der Versuchsbedingungen und dem Einsatz von verschiedenen thiol-spezifischen Reagenzien konnte die Markierungseffizienz der beiden Konstrukte A51C und S179C nicht verbessert werden. Andere, nicht in dieser Arbeit gezeigte Daten einer mit einem kurzen N-terminalen durch Proteasen schneidbaren Epitop-tag versehenen miniTAP-Variante (Aminosäuren 167-748), bekräftigen jedoch die Topologie der N-terminalen Domäne. Aufgrund der Abtrennung des Epitop-tags durch cytosolische Proteasen, muss das benachbarte Cystein in TAP1 an Position 179 im Cytosol lokalisiert sein. Desweiteren berechnen erstaunlicherweise zwei der gängigen Hydrophobizitäts-Algorithmen (TopPred II (von Heijne, 2002) und SOSUI (Hirokawa, 1998)) für das Cystein A51C eine Position zu Beginn der zweiten Transmembranhelix (siehe Abbildung 4.8). Aus diesem Grunde ist es sehr wahrscheinlich, dass beide Cysteine in einem funktionalen Komplex an unzugänglichen Positionen lokalisiert sind, die daher nicht mit einem Fluorophor markiert werden können.

Die N-terminale Domäne spielt als Bindungsregion für Tapasin bei der Assemblierung des PLCs eine entscheidende Rolle (Koch *et al.*, 2004). Ob es durch diese Bindung zu einer Veränderung in der strukturellen Organisation des assemblierten Komplexes aus TAP1, TAP2 und Tapasin und somit auch in der thiol-spezifischen Zugänglichkeit von einzelnen Cysteinen kommt, sollte durch weitere Experimente geklärt werden. Hierfür wurde in Markierungsversuchen mit Fluoreszein-5-Maleimid die Zugänglichkeit der Konstrukte S6C, A51C, A87C, S124C und S179C in An- und Abwesenheit von Tapasin untersucht. Überraschenderweise zeigen alle Konstrukte (siehe Abbildung 4.17) keine Veränderungen der Markierungseffizienzen von TAP1 im Vergleich zu Markierungsexperimenten in Abwesenheit von Tapasin. Die lässt darauf schließen, dass die N-terminale Domäne während der Bindung durch den PLC keine gravierenden Umstrukturierungen erfährt und somit in der Membrantopologie nicht entscheidend verändert wird.

Wie in Abbildung 4.8 dargestellt, stimmen die verschiedenen, eingesetzten Algorithmen (TopPred II, SOSUI, TMHMM und TMPred) bei ihren Vorhersagen der Membrantopologie der ersten sechs Transmembransegmente von TAP1, mit einer kleinen Abweichung für Helix 2, weitestgehend überein. Nahezu alle Algorithmen scheitern jedoch bei der Vorhersage der vier C-terminalen Helices (H3-H6), was durch deren hydrophilen Charakter und die sehr kurzen ER-luminalen Schleifen erklärbar ist. Nur

durch eine Kombination aus detaillierten Sequenzvergleichen und dem Einsatz der Algorithmen zur Bestimmung der Membrantopologie lassen sich zehn Transmembransegmente für TAP1 beschreiben, die durch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse experimentell bestätigt werden konnten (siehe Abbildung 4.8, graue Linien).

Für die Membrantopologie der TAP2-Untereinheit können unter Berücksichtigung der hohen Sequenzidentität zwischen TAP1 und TAP2 von 38 % (TMD 25 %) und in Kombination mit Hydrophobizitäts-Algorithmen neun Transmembransegmente vorhergesagt werden (siehe Abbildung 4.8). Diese neun Helices lassen sich weiterhin in die aus sechs Helices bestehende *Core*-Domäne und die unique N-terminale Domäne, bestehend aus den restlichen drei Transmembransegmenten, unterteilen. Im Gegensatz zur TAP1-Untereinheit des Transporters ist der N-Terminus dabei im ER-Lumen lokalisiert. Auffallend bei dieser Betrachtung ist, dass die Positionen der letzten fünf Transmembransegmente von TAP1 und TAP2 in Vergleichen mit denen von P-gp nahezu identisch sind und somit eine Übereinstimmung der strukturelle Organisation der ABC-Transporter *Core*-Domäne beider Proteine impliziert.

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit konnte die Membrantopologie von TAP1 in einem vollständig assoziierten funktionalen Komplex in der ER-Membran aufgeklärt werden.

5.3 Cystein 213 in TAP2 – ein Schalter für die Peptidbindung an TAP?

5.3.1 Kombinationen aus Cystein-freiem und wildtyp TAP

Im Zuge der Untersuchungen des Cystein-freien TAP-Komplexes stellte sich heraus, dass das funktionale Heterodimer vergleichbare Transporteffizienzen zu einem wildtyp Konstrukt zeigte, es jedoch zu einer Veränderung der maximalen Peptidbindung kommt. Die Peptidbindungsregion von TAP befindet sich in den cytosolischen Schleifen der *Core*-Domäne. In früheren Quervernetzungsstudien mit radioaktiv-markierten Peptiden konnten Sequenzbereiche der Schleifen zwischen Helix 4 und 5 sowie ein ca. 15 Aminosäuren langer Bereich nach Helix 6 für die Bindung von Peptiden identifiziert werden (Nijenhuis und Hämmerling, 1996; Nijenhuis *et al.*, 1996). Drei der 19 ausgetauschten Cysteine der Cystein-freien TAP-Untereinheiten, nämlich C488 in TAP1 und C353 und C362 in TAP2, sind genau im Bereich der Peptidbindungsregion lokalisiert.

Um zu untersuchen, ob ausgetauschte Cysteine für die Verminderung der maximalen Peptidbindung der Cystein-freien Untereinheiten verantwortlich sind, wurden analog zu den in humanen Fibroblasten untersuchten Kombinationen Konstrukte für die heterologe Expression in *Sf9* Zellen entwickelt. Dabei wurde jeweils eine Cystein-freie mit einer wildtyp TAP-Untereinheit kombiniert, so dass die folgenden Konstrukte Cys-frei/wt und wt/Cys-frei entstanden. Im ersten Schritt konnte deren Expression im Western Blot nachgewiesen werden und Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität aufgrund der jeweilig gekoppelten Epitop-tags (C-terminaler His₁₀-Tag an TAP1 und C-terminaler Strep-Tag I an TAP2) gezeigt werden. Die Heterodimerisierung beider Kombinationen aus Cystein-freiem TAP und wildtyp TAP (Cys-frei/wt und wt/Cys-frei) wurde durch Co-Immunpräzipitationen (siehe Abbildung 4.19) nachgewiesen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Konstrukte Cys-frei/wt und wt/Cys-frei in ihrer Assemblierung zu einem funktionsfähigen Transporter nicht durch die jeweils fehlenden Cysteine beeinflusst werden.

Desweiteren wurde die maximale Peptidbindung der Kombinationen aus Cystein-freien und wildtyp Untereinheiten analysiert. Erstaunlicherweise zeigte sich zwischen dem Konstrukt Cys-frei/wt und der umgekehrten Variante wt/Cys-frei in der maxima-

len Peptidbindung ein deutlicher Unterschied. Während für das Konstrukt wt/Cys-frei vergleichbare Werte wie für Cystein-freies TAP gemessen werden konnten, spiegelte das Konstrukt Cys-frei/wt annähernd die Werte für einen wildtyp TAP-Komplex wieder. Scheinbar wird die maximale Peptidbindung durch die Cysteine in der TAP2-Untereinheit beeinflusst. Transportstudien zeigten ebenfalls diese Tendenz. Für die Kombination Cys-frei/wt konnte ein mit wildtyp TAP vergleichbarer, durch ICP47 inhibierbarer ATP-abhängiger Peptidtransport gemessen werden, während der Transport für das Konstrukt wt/Cys-frei noch unter dem für einen völlig Cystein-freien TAP-Komplex lag. Dieses Transportverhalten spiegelte sich auch in der untersuchten Transportkinetik des Konstrukts wt/Cys-frei wieder. Das Gesamtbild aller Daten der Kombinationen wt/Cys-frei und Cys-frei/wt weist somit darauf hin, dass der Grund für die veränderten Peptidbindungseigenschaften bei TAP2, bzw. den Cysteinen in dieser Untereinheit zu suchen ist.

5.3.2 Generierung von TAP2 Einzel-Cystein-Konstrukten

Im Folgenden wurden die Cysteine 353, 362 und 394 der Peptidbindungsregion von TAP2 durch ortsspezifische Mutagenese wieder eingeführt und die entsprechenden TAP2-Varianten mit der Cystein-freien TAP1-Sequenz kombiniert. Ergänzt wurden die Konstrukte durch eine TAP-Variante (aa1-265 wt), die vier N-terminale Cysteine (C70, C197, C209 und C213) durch Kombination der wildtyp Sequenz von Aminosäure 1-265 mit der Cystein-freien TAP-Untereinheit, enthielt. Nach erfolgreicher Expression konnte in einer vergleichenden Transportstudie für alle Einzel-Cystein-Konstrukte (S353C, S362C, S353/362C und triple Mut), deren Cysteine in der beschriebenen Peptidbindungsregion von TAP2 lokalisiert sind, ein Transport von maximal 25 % im Vergleich zu dem eines Cystein-freien Konstrukts gemessen werden. Erstaunlicherweise zeigte das Konstrukt aa 1-265 wt eine Transporteffizienz, die um 400 % höher als die von wildtyp TAP lag. Diese Tatsache lässt sich trotz wiederholter Normierung der Membranen auf TAP1-Expression und mehrfachen Transportexperimenten zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig erklären. Inwieweit die in diesem Sequenzabschnitt 1-265 lokalisierten Cysteine an den Positionen 70, 197, 209 und 213 des Konstrukts aa 1-265 wt an der Peptidbindung beteiligt sind, wurde durch Wiedereinführung dieser Cysteine untersucht. Das Cystein an Position 70 konnte von vornherein ausgeschlossen werden, da in Studien mit einer um 166 (TAP1) bzw. 122

(TAP2) Aminosäuren verkürzten TAP-Variante, mini6TAP, ein mit wildtyp TAP vergleichbarer ATP-abhängiger Peptidtransport gezeigt werden konnte (Koch *et al.*, 2004).

Bei Untersuchungen der Peptidbindung in Ratten-TAP konnte eine Veränderung der Substratspezifität beider funktionaler Allele (rTAP2-A und rTAP2-B) festgestellt werden, was zu einer unterschiedlichen Peptidbeladung der RT1A^a Klasse I-Moleküle führt (Howard, 1995; Powis *et al.*, 1992b). RTAP2-B transportiert vorzugsweise Peptide mit hydrophoben C-terminalen Aminosäureresten, während rTAP2-A darüber hinaus auch Peptide mit polaren oder geladenen Aminosäuren am C-Terminus transportieren kann. Zwei Paare von polymorphen Aminosäuren in rTAP2, nämlich an den Positionen 217 und 218 sowie 374 und 380 konnten als Ursache für die unterschiedlichen Substratspezifitäten identifiziert werden (Momburg *et al.*, 1996). Übereinstimmend dazu konnten die Aminosäuren 1-362 in humanem TAP2 als die Region identifiziert werden, die den Transport von Peptiden mit kleinen polaren/hydrophoben und positiv geladenen Aminosäureresten am C-Terminus beeinflusst. Die Sequenzregion ab Position 362 scheint allerdings nur in einem geringeren Maße den Transport von Peptiden mit positiv geladenen Resten, wie R und K, zu modifizieren (Armandola *et al.*, 1996). Eine Veränderung der Substratspezifität und somit der ATPase Funktion des Multidrogentransporters P-gp konnte nach Mutation des Glycins an der Position 185 (korrespondierend zu Tryptophan 264 in TAP2) beobachtet werden (Choi *et al.*, 1988; Rao, 1995).

Zur Untersuchung der Peptidbindung von TAP wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese die Cysteine an den Positionen A197C, A209C und S213C wieder eingeführt und mit der Cystein-freien TAP1-Untereinheit kombiniert. Die erfolgreiche Expression wurde im Western Blot nachgewiesen und die Membranen konnten für alle folgenden Versuche auf TAP1-Expression normalisiert werden (vergleiche Abbildung 4.25).

Für den Cystein-freien TAP-Komplex konnte ein K_D -Wert (größer 1 μM) gemessen werden, allerdings war ein Wert für die maximale Peptidbindung (B_{max} -Wert) nicht bestimmbar. Für die das Cystein-freie Konstrukt erreicht die konzentrationsabhängige Bindungskurve nicht die Sättigung. Aufgrund der experimentellen Erfordernisse kann keine höhere Peptidkonzentration (max. 8 μM) angeboten werden. Daher kann für die Einschränkung der Peptidbindung von Cystein-freiem TAP sowohl eine Erhöhung des K_D -Wertes als auch eine Erniedrigung der maximalen Peptidbindung verantwortlich sein, die allerdings experimentell voneinander nicht unterschieden wer-

den können. Erstaunlicherweise konnte allerdings für das Konstrukt S213C ein K_D -Wert (240 ± 28 nM) für das im Versuch eingesetzte Peptid R9LQK ermittelt werden, der identisch mit dem des wildtyp TAP-Komplexes (250 ± 46 nM) war. Auch die maximale Peptidbindung (B_{\max} -Wert) beider Konstrukte war identisch. Darüber hinaus konnte der „wildtyp Charakter“ des Einzel-Cystein-Konstrukts S213C in Transportstudien bestätigt werden.

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen wurden mit Peptiden mit annähernd identischen Grundgerüsten durchgeführt. Denkbar ist allerdings auch eine Änderung der Substratspezifität des Konstrukts S213C. Ob es zu einer Veränderung der Aminosäurepräferenzen des Konstrukts kommt, könnte in Experimenten mit verschiedenen Peptidbibliotheken untersucht werden.

Inwieweit die Bindung eines Peptids an das Konstrukt S213C durch Modifikation des Cysteins 213 mit Hilfe von thioispezifischen Reagenzien beeinflusst werden kann, wurde in Inhibitionsstudien der Peptidbindung untersucht. Die eingesetzten Reagenzien (NEM, MTSES, MTSET, MTSEA, Fluoreszein-5-Maleimid und Jodacetamidofluoreszein) gehen alle kovalente Bindungen mit dem Thiol-Rest des einzelnen Cysteins ein und konnten in verschiedenen Studien zur Aufklärung von Proteinumgebungen, zum Beispiel der Substratbindungsregion von P-gp (Loo *et al.*, 2004b) oder des Chloridkanals von CFTR (Akabas *et al.*, 1994) verwendet werden. Es konnte gezeigt werden, dass alle Reagenzien die Peptidbindung an TAP inhibieren. Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes, das heißt der Konzentration, die zu einer 50 %igen Inhibition der Peptidbindung führt, gestaltete sich allerdings schwierig. Es konnte nur für das Reagenz MTSES eine IC_{50} -Konzentration ($210 \mu\text{M} \pm 30$) ermittelt werden. Dieses negativ geladene Molekül reagiert konzentrationsabhängig mit dem Thiol-Rest des Cysteins, so dass eine Bindung des Peptids nicht mehr möglich ist. Für die beiden positiv geladenen MTS-Reagenzien und NEM konnte keine IC_{50} -Konzentration bestimmt werden.

Die Peptidbindungsregion von TAP scheint ein sehr flexibler Bereich des Komplexes zu sein, da sowohl Peptide mit einer Länge von 8-40 Aminosäuren (Koopmann *et al.*, 1996) als auch Peptide mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten gebunden und transportiert werden können (Neumann und Tampé, 1999; Uebel *et al.*, 1995). Das postulierte Modell der Peptidbindung geht von einer schnellen, möglicherweise diffusionskontrollierten Bindung über die N- und C-terminalen Bereiche des Peptids aus, die von einem langsameren Isomerisationsschritt des Proteins gefolgt wird. Diese

strukturelle Umorganisation führt wahrscheinlich zur Aktivierung der ATP-Hydrolyse, die schließlich die Translokation des Peptids katalysiert (Neumann und Tampé, 1999; Uebel *et al.*, 1995).

Inwieweit das Cystein 213 in TAP2 direkt mit einem gebundenen und zu transportierenden Peptid interagiert, wurde in Quervernetzungsstudien mit Kupferphenanthrolin untersucht. Hierzu wurden Membranen mit radioaktiv-markierten Quervernetzungspeptiden (C1, C2 und C4-C9 (Herget, 2003)) mit einzelnen Cysteinen an den Positionen 1, 2, 4 bis 9 und Kupferphenanthrolin in An- und Abwesenheit von nicht-markiertem Kompetitorpeptid inkubiert. Es zeigte sich ein direkter Kontakt zu den jeweiligen Cysteinen der Quervernetzungspeptide C4-C9. Diese Interaktion konnte deutlich in der Autoradiographie anhand einer TAP-spezifischen Bande detektiert werden. Die Banden für die Positionen 4-7 des Cysteins im Peptid zeigten jedoch im Vergleich zu denen der Positionen 8 und 9 ein stärkeres Signal. Peptide (C1 und C2), deren Cystein an Position 1 oder 2 der Sequenz lokalisiert war, wiesen in der Autoradiographie keine Bande auf (siehe Abbildung 4.30). Somit ist eine Regioselektivität für den mittleren Abschnitt des Peptids gegeben und eine Quervernetzung mit dem N-Terminus der Peptide und dem Konstrukt S213C nicht möglich. Die Orientierung des gebundenen Peptids kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht genau festgestellt werden. Es ist jedoch vorstellbar, dass das Peptid über den N- und C-Terminus an TAP gebunden wird und durch die Flexibilität mit dem in TAP2 lokalisierten Cystein 213 in Kontakt treten kann. Allerdings muss das Cystein 213 nicht maßgeblich an der Verankerung des Peptids beteiligt sein, da für die Quervernetzung nur eine räumliche Nähe der beteiligten Aminosäurereste gewährleistet sein muss.

Die Peptidbindungsregion des TAP-Komplexes konnte in früheren Quervernetzungsstudien bestimmt werden (Nijenhuis und Hämmerling, 1996; Nijenhuis *et al.*, 1996). Die Geometrie der Peptidbindungstasche von TAP ist allerdings komplexer als vermutet und kann nicht durch eine lineare Bindung der Peptide erklärt werden. Denkbar ist allerdings eine Strukturstabilisation dieser Region, die durch eine mögliche Wasserstoffbrückenbildung zwischen dem Peptid und dem Cystein 213 vermittelt werden könnte. Weiterhin kann eine direkte Interaktion der SH-Gruppe des einzigen Cysteins an Position 213 in TAP2 nicht ausgeschlossen werden. Eine direkte Interaktion und somit die räumliche Nähe eines Peptids zu dem Cystein 213 könnte in wei-

terführenden Peptidbindungsstudien zum Beispiel mit radioaktiv-markiertem NEM untersucht werden.

Erstaunlich ist allerdings die Tatsache, dass eine einzige Aminosäure, nämlich ein Cystein an Position 213 in TAP2, für die Wiederherstellung der Peptidbindungseigenschaften des TAP-Komplexes, welchem ansonsten alle anderen Cysteine fehlen, verantwortlich gemacht werden kann. Ein komplizierter ABC-Transporter wie TAP kann somit durch einfache Modifikationen des Cysteins in seiner Peptidbindungseigenschaft geschaltet werden und bietet folglich ein spannendes Feld für weiterführende Untersuchungen.

6 Literatur

- Abele, R. and Tampé, R. (1999) Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim. Biophys. Acta*, **1461**, 405-419.
- Abele, R. and Tampé, R. (2004) The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology (Bethesda)*, **19**, 216-224.
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R. and Iwata, S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*, **301**, 610-615.
- Ahn, K., Meyer, T.H., Uebel, S., Sempe, P., Djaballah, H., Yang, Y., Peterson, P.A., Früh, K. and Tampé, R. (1996) Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *EMBO J.*, **15**, 3247-3255.
- Akabas, M.H., Kaufmann, C., Cook, T.A. and Archdeacon, P. (1994) Amino acid residues lining the chloride channel of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14865-14868.
- Alberts, P., Daumke, O., Deverson, E.V., Howard, J.C. and Knittler, M.R. (2001) Distinct functional properties of the TAP subunits coordinate the nucleotide-dependent transport cycle. *Curr. Biol.*, **11**, 242-251.
- Allikmets, R. (2000) Simple and complex ABCR: genetic predisposition to retinal disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **67**, 793-799.
- Ambagala, A.P., Solheim, J.C. and Srikumaran, S. (2005) Viral interference with MHC class I antigen presentation pathway: the battle continues. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **107**, 1-15.
- Androlewicz, M.J. and Cresswell, P. (1994) Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide binding site. *Immunity*, **1**, 7-14.

- Armandola, E.A., Momburg, F., Nijenhuis, M., Bulbuc, N., Früh, K. and Hämmerling, G.J. (1996) A point mutation in the human transporter associated with antigen-processing (TAP2) alters the peptide-transport specificity. *Eur. J. Immun.*, **26**, 1748-1755.
- Bauer, D. and Tampé, R. (2002) Herpes viral proteins blocking the transporter associated with antigen processing TAP--from genes to function and structure. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **269**, 87-99.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F. and Seemüller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, **92**, 367-380.
- Beinert, D., Neumann, L., Uebel, S. and Tampé, R. (1997) Structure of the viral TAP-inhibitor ICP47 induced by membrane association. *Biochemistry*, **36**, 4694-4700.
- Beismann-Driemeyer, S. and Tampé, R. (2004) Function of the antigen transport complex TAP in cellular immunity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **43**, 4014-4031.
- Beitz, E. (2000) T(E)Xtopo: shaded membrane protein topology plots in LAT(E)X2epsilon. *Bioinformatics*, **16**, 1050-1051.
- Belich, M.P., Glynn, R.J., Senger, G., Sheer, D. and Trowsdale, J. (1994) Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr. Biol.*, **4**, 769-776.
- Bennett, E.R. and Kanner, B.I. (1997) The membrane topology of GAT-1, a (Na⁺ + Cl⁻)-coupled gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain. *J. Biol. Chem.*, **272**, 1203-1210.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Brooks, P., Murray, R.Z., Mason, G.G., Hendil, K.B. and Rivett, A.J. (2000) Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, **352**, 611-615.

- Chang, G. (2003) Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J. Mol. Biol.*, **330**, 419-430.
- Chang, G. and 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, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A.L. and Quioco, F.A. (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol. Cell*, **12**, 651-661.
- Chen, M. (2004) Mechanistic insights into ATP hydrolysis of the ABC-transporter TAP. PhD thesis, *Institut für Biochemie*, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Chen, M., Abele, R. and Tampé, R. (2004) Functional non-equivalence of ATP-binding cassette signature motifs in the transporter associated with antigen processing (TAP). *J. Biol. Chem.*, **279**, 46073-46081.
- Choi, K.H., Chen, C.J., Kriegler, M. and Roninson, I.B. (1988) An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene. *Cell*, **53**, 519-529.
- Daumke, O. and Knittler, M.R. (2001) 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.
- de la Salle, H., Hanau, D., Fricker, D., Urlacher, A., Kelly, A., Salamero, J., Powis, S.H., Donato, L., Bausinger, H. and Laforet, M. (1994) Homozygous human tap peptide transporter mutation in HLA class-I deficiency. *Science*, **265**, 237-241.
- de la Salle, H., Zimmer, J., Fricker, D., Angenieux, C., Cazenave, J.P., Okubo, M., Maeda, H., Plebani, A., Tongio, M.M., Dormoy, A. and Hanau, D. (1999) HLA class I deficiencies due to mutations in subunit 1 of the peptide transporter TAP1. *J. Clin. Invest.*, **103**, R9-R13.

- Dean, M. and Annilo, T. (2005) Evolution of the Atp-Binding Cassette (Abc) Transporter Superfamily in Vertebrates *. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **6**, 123-142.
- Dick, T.P., Bangia, N., Peaper, D.R. and Cresswell, P. (2002) Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity*, **16**, 87-98.
- Elliott, T. (1997) How does TAP associate with MHC class I molecules? *Immunol Today*, **18**, 375-379.
- Engelhard, V.H. (1994) How cells process antigens *Scientific American* **271**, 54-61.
- Früh, K., Ahn, K., Djaballah, H., Sempe, P., van Endert, P.M., Tampe, R., Peterson, P.A. and Yang, Y. (1995) A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature*, **375**, 415-418.
- Früh, K., Gossen, M., Wang, K., Bujard, H., Peterson, P.A. and Yang, Y. (1994) Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO J.*, **13**, 3236-3244.
- Gileadi, U. and 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.
- Goldberg, A.L., Cascio, P., Saric, T. and Rock, K.L. (2002) The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol. Immunol.*, **39**, 147-164.
- Gorbulev, S., Abele, R. and Tampé, R. (2001) Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 3732-3737.
- Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R. and Kloetzel, P.M. (1996) A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur. J. Immunol.*, **26**, 863-869.

- Grommé, M. and Neefjes, J. (2002) Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol. Immunol.*, **39**, 181-202.
- Grunewald, M., Bendahan, A. and Kanner, B.I. (1998) Biotinylation of single cysteine mutants of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain reveals its unusual topology. *Neuron*, **21**, 623-632.
- Hanahan, D. (1985) *DNA-Cloning*, **1**, 109-136.
- Heintke, S., Chen, M., Ritz, U., Lankat-Buttgereit, B., Koch, J., Abele, R., Seliger, B. and Tampé, R. (2003) Functional cysteine-less subunits of the transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) by de novo gene assembly. *FEBS Lett.*, **533**, 42-46.
- Herget, M. (2003) Lokalisation der Peptidbindungsstelle des Peptidtransporters TAP auf molekularer Ebene mittels einer artifiziellen Protease. Diplomarbeit, *Institut für Biochemie*, Johann Wolfgang Goeth-Universität, Frankfurt am Main.
- Hewitt, E.W., Gupta, S.S. and Lehner, P.J. (2001) The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *EMBO J.*, **20**, 387-396.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**, 67-113.
- Higgins, C.F. (1993) The multidrug resistance P-glycoprotein. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5**, 684-687.
- Higgins, C.F. (1995) The ABC of channel regulation. *Cell*, **82**, 693-696.
- Hirokawa, T. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics Applications Note*, **14**, 378-379.
- Hofmann, K. and Stoffel, W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem.*, **374**, 166.
- Hosken, N.A. and Bevan, M.J. (1990) Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules. *Science*, **248**, 367-370.

- Howard, J.C. (1995) Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr. Opin. Immunol.*, **7**, 69-76.
- Hughes, E.A. and Cresswell, P. (1998) The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr. Biol.*, **8**, 709-712.
- Hughes, E.A., Hammond, C. and Cresswell, P. (1997) Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 1896-1901.
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F. and Kim, S.H. (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, **396**, 703-707.
- Hunter, W.M. and Greenwood, F.C. (1964) A radio-immunoelectrophoretic assay for human growth hormone. *Biochem J.*, **91**, 43-56.
- Janeway, C.A. and Travers, P. (2001) *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Kaback, H.R. (2005) Structure and mechanism of the lactose permease. *C. R. Biology*, **328**, 557-567.
- Kaback, H.R., Sahin-Toth, M. and Weinglass, A.B. (2001) The kamikaze approach to membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 610-620.
- Karttunen, J.T., Lehner, P.J., Gupta, S.S., Hewitt, E.W. and Cresswell, P. (2001) Distinct functions and cooperative interaction of the subunits of the transporter associated with antigen processing (TAP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 7431-7436.
- Kelly, A., Powis, S.H., Kerr, L.A., Mockridge, I., Elliott, T., Bastin, J., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Trowsdale, J. and Townsend, A. (1992) Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature*, **355**, 641-644.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M. and Goldberg, A.L. (1999) The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Imphi-

- cations for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3363-3371.
- Kleijmeer, M., Kelly, A., Geuze, H.J., Slot, J.W., Townsend, A. and Trowsdale, J. (1992) Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and *cis*-golgi. *Nature*, **357**, 342-344.
- Kloetzel, P.M. (2001) Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 179-187.
- 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.
- Koch, J., Guntrum, R. and Tampé, R. (2005) Exploring the minimal functional unit of the transporter associated with antigen processing. *FEBS Lett.*, **579**, 4413-4416.
- Koopmann, J.O., Post, M., Neefjes, J.J., Hämmerling, G.J. and Momburg, F. (1996) Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur. J. Immunol.*, **26**, 1720-1728.
- Koppers-Lalic, D., Reits, E.A., Rensing, M.E., Lipinska, A.D., Abele, R., Koch, J., Marcondes Rezende, M., Admiraal, P., van Leeuwen, D., Bienkowska-Szewczyk, K., Mettenleiter, T.C., Rijsewijk, F.A., Tampé, R., Neefjes, J. and Wiertz, E.J. (2005) Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 5144-5149.
- Koppers-Lalic, D., Rychlowski, M., van Leeuwen, D., Rijsewijk, F.A., Rensing, M.E., Neefjes, J.J., Bienkowska-Szewczyk, K. and Wiertz, E.J. (2003) Bovine herpesvirus 1 interferes with TAP-dependent peptide transport and intracellular trafficking of MHC class I molecules in human cells. *Arch. Virol.*, **148**, 2023-2037.
- Krogh, A. (2001) Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes. *J. Mol. Biol.*, **305**, 567-580.

- Kupfer, A. and 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.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **10**, 203-209.
- Kyritsis, C., Gorbulev, S., Hutschenreiter, S., Pawlitschko, K., Abele, R. and 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.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lankat-Buttgereit, B. and Tampé, R. (1999) The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function. *FEBS Lett.*, **464**, 108-112.
- Lapinski, P.E., Raghuraman, G. and Raghavan, M. (2003) Nucleotide interactions with membrane-bound transporter associated with antigen processing proteins. *J. Biol. Chem.*, **278**, 8229-8237.
- Lehner, P.J., Karttunen, J.T., Wilkinson, G.W. and 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.
- Li, S., Paulsson, K.M., Chen, S., Sjogren, H.O. and Wang, P. (2000) Tapasin is required for efficient peptide binding to transporter associated with antigen processing. *J. Biol. Chem.*, **275**, 1581-1586.
- Lindquist, J.A., Jensen, O.N., Mann, M. and Hämmerling, G.J. (1998) ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J.*, **17**, 2186-2195.
- Loch, S. and Tampé, R. (2005) Viral evasion of the MHC class I antigen-processing machinery. *Pflugers Arch.*

- Locher, K.P., Lee, A.T. and Rees, D.C. (2002) The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**, 1091-1098.
- Loo, T.W., Bartlett, M.C. and Clarke, D.M. (2004a) Disulfide cross-linking analysis shows that transmembrane segments 5 and 8 of human P-glycoprotein are close together on the cytoplasmic side of the membrane. *J. Biol. Chem.*, **279**, 7692-7697.
- Loo, T.W., Bartlett, M.C. and Clarke, D.M. (2004b) The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium. *Biochemistry*, **43**, 12081-12089.
- Loo, T.W. and Clarke, D.M. (1995) Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **270**, 843-848.
- Loo, T.W. and Clarke, D.M. (2000) The packing of the transmembrane segments of human multidrug resistance P-glycoprotein is revealed by disulfide cross-linking analysis. *J. Biol. Chem.*, **275**, 5253-5256.
- Lottspeich, F., Zorbas, F. (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon T. acidophilum at 3.4 Å resolution. *Science*, **268**, 533-539.
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A. and Mathur, E.J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, **108**, 1-6.
- Madden, D.R. (1995) The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.*, **13**, 587-622.
- Meyer, T.H., van Endert, P.M., Uebel, S., Ehring, B. and 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. and Hämmerling, G.J. (1996) Residues in TAP2 peptide transporters controlling substrate specificity. *J. Immunol.*, **156**, 1756-1763.
- Mosser, J., Douar, A.M., Sarde, C.O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A.M., Mandel, J.L. and Aubourg, P. (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature*, **361**, 726-730.
- Neefjes, J.J., Dierx, J. and Ploegh, H.L. (1993a) The effect of anchor residue modifications on the stability of major histocompatibility complex class I-peptide interactions. *Eur. J. Immunol.*, **23**, 840-845.
- Neefjes, J.J., Momburg, F. and Hämmerling, G.J. (1993b) Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*, **261**, 769-771.
- Neumann, L., Kraas, W., Uebel, S., Jung, G. and Tampé, R. (1997) The active domain of the herpes simplex virus protein ICP47: a potent inhibitor of the transporter associated with antigen processing. *J. Mol. Biol.*, **272**, 484-492.
- Neumann, L. and Tampé, R. (1999) Kinetic analysis of peptide binding to the TAP transport complex: evidence for structural rearrangements induced by substrate binding. *J. Mol. Biol.*, **294**, 1203-1213.
- Nijenhuis, M. and Hämmerling, G.J. (1996) Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J. Immunol.*, **157**, 5467-5477.
- Nijenhuis, M., Schmitt, S., Armandola, E.A., Obst, R., Brunner, J. and Hämmerling, G.J. (1996) Identification of a contact region for peptide on the TAP1 chain of the transporter associated with antigen processing. *J. Immunol.*, **156**, 2186-2195.
- Ortmann, B., Androlewicz, M.J. and Cresswell, P. (1994) MHC class I/β2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature*, **368**, 864-867.

- Paulsson, K.M. and Wang, P. (2004) Quality control of MHC class I maturation. *FASEB J.*, **18**, 31-38.
- Paulsson, K.M., Wang, P., Anderson, P.O., Chen, S., Pettersson, R.F. and Li, S. (2001) Distinct differences in association of MHC class I with endoplasmic reticulum proteins in wild-type, and beta 2-microglobulin- and TAP-deficient cell lines. *Int. Immunol.*, **13**, 1063-1073.
- Pfänder, R., Neumann, L., Zweckstetter, M., Seger, C., Holak, T.A. and Tampé, R. (1999) Structure of the active domain of the herpes simplex virus protein ICP47 in water/sodium dodecyl sulfate solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, **38**, 13692-13698.
- Powis, S.H., Mockridge, I., Kelly, A., Kerr, L.A., Glynne, R., Gileadi, U., Beck, S. and Trowsdale, J. (1992a) Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1463-1467.
- Powis, S.J., Deverson, E.V., Coadwell, W.J., Ciruela, A., Huskisson, N.S., Smith, H., Butcher, G.W. and Howard, J.C. (1992b) Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class I molecule. *Nature*, **357**, 211-215.
- Powis, S.J., Townsend, A.R., Deverson, E.V., Bastin, J., Butcher, G.W. and Howard, J.C. (1991) Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature*, **354**, 528-531.
- Rao, U.S. (1995) Mutation of glycine 185 to valine alters the ATPase function of the human P-glycoprotein expressed in Sf9 cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 6686-6690.
- Reyes, C.L. and Chang, G. (2005) Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP.vanadate and lipopolysaccharide. *Science*, **308**, 1028-1031.
- Riordan, J.R. (2005) Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu. Rev. Physiol.*, **67**, 701-718.
- Ritz, U., Drexler, I., Sutter, D., Abele, R., Huber, C. and Seliger, B. (2003) Impaired transporter associated with antigen processing (TAP) function attributable to a

- single amino acid alteration in the peptide TAP subunit TAP1. *J. Immunol.*, **170**, 941-946.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis T. (1989) "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*".
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schmitz, G., Kaminski, W.E. and Orso, E. (2000) ABC transporters in cellular lipid trafficking. *Curr. Opin. Lipidol.*, **11**, 493-501.
- Schölz, C. (2005) Inhibitionsmechanismus des Genproduktes UL49.5 von Herpesviren. Diplomarbeit, *Institut für Biochemie*, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J. and Hunt, J.F. (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell*, **10**, 139-149.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
- Spies, T., Cerundolo, V., Colonna, M., Cresswell, P., Townsend, A. and DeMars, R. (1992) Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature*, **355**, 644-646.
- Spies, T. and DeMars, R. (1991) Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature*, **351**, 323-324.
- Sudhop, T. and von Bergmann, K. (2004) Sitosterolemia--a rare disease. Are elevated plant sterols an additional risk factor? *Z. Kardiol.*, **93**, 921-928.

- Suh, W.K., Cohen-Doyle, M.F., Früh, K., Wang, K., Peterson, P.A. and Williams, D.B. (1994) Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science*, **264**, 1322-1326.
- Tampé, R., Urlinger, S., Pawlitschko, K. and Uebel, S. (1997) The transporters associated with antigen processing (TAP). In Kuchler, K., Rubartelli, A. and Holland, B. (eds.), *Unusual Secretory Pathways: From Bacteria to Man*. Springer, New York, pp. 115-136.
- Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A. and Kelly, A. (1990) Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature*, **348**, 741-744.
- Uebel, S., Kraas, W., Kienle, S., Wiesmüller, K.H., Jung, G. and Tampé, R. (1997) Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 8976-8981.
- Uebel, S., Meyer, T.H., Kraas, W., Kienle, S., Jung, G., Wiesmüller, K.H. and 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.
- Urlinger, S., Kuchler, K., Meyer, T.H., Uebel, S. and Tampé, R. (1997) Intracellular location, complex-formation, and function of the transporter associated with antigen processing in yeast. *Eur. J. Biochem.*, **245**, 266-272.
- van der Heide, T. and Poolman, B. (2002) ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep.*, **3**, 938-943.
- van Endert, P.M., Tampé, R., Meyer, T.H., Tisch, R., Bach, J.F. and McDevitt, H.O. (1994) A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity*, **1**, 491-500.
- Velarde, G., Ford, R.C., Rosenberg, M.F. and Powis, S.J. (2001) Three-dimensional structure of transporter associated with antigen processing (TAP) obtained by single Particle image analysis. *J. Biol. Chem.*, **276**, 46054-46063.

- Verdon, G., Albers, S.V., Dijkstra, B.W., Driessen, A.J. and Thunnissen, A.M. (2003) Crystal structures of the ATPase subunit of the glucose ABC transporter from *Sulfolobus solfataricus*: nucleotide-free and nucleotide-bound conformations. *J. Mol. Biol.*, **330**, 343-358.
- Vitetta, E.S., Fernandez-Botran, R., Myers, C.D. and Sanders, V.M. (1989) Cellular interactions in the humoral immune response. *Adv. Immunol.*, **45**, 1-105.
- von Heijne, G. (2002) Membrane Protein Structure Prediction: Hydrophobicity Analysis and the "Positiv-Inside" Rule. *J. Mol. Biol.*, **225**, 487-494.
- Vos, J.C., Reits, E.A., Wojcik-Jacobs, E. and 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.
- Vos, J.C., Spee, P., Momburg, F. and Neefjes, J. (1999) Membrane topology and dimerization of the two subunits of the transporter associated with antigen processing reveal a three-domain structure. *J. Immunol.*, **163**, 6679-6685.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**, 945-951.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. and Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3469-3478.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I.B. and Schmitt, L. (2005) H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J.*, **24**, 1901-1910.
- Zhou, J., Fazio, R.T. and Blair, D.F. (1995) Membrane topology of the MotA protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **251**, 237-242.

7 Abkürzungen

ABC	ATP Bindekassette (<i>ATP binding cassette</i>)
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CD4/8	<i>cluster of differentiation</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
CTL	zytotoxische T-Zelle
Cys-frei	Cystein-frei
DM	n-Decyl- β -maltosid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FCS _i	inaktiviertes, fötales Kälberserum
F-Mal	Fluoreszein-5-Maleimid
HC	schwere Kette (<i>heavy chain</i>)
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HEPES	N- (2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>
HSV-1	Herpes simplex Virus-1
IAF	Jodacetamidofluoreszein
ICD	intrazelluläre Domäne
ICP47	<i>infected cell peptide 47</i>

IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kBp	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LCR	<i>ligase chain reaction</i>
LMP2	<i>low molecular weight protein</i>
Mdl1p	<i>multidrug resistance like</i>
MECL-1	<i>multicatalytic endopeptidase complex-like protein-1</i>
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MTSEA	Methanthiosulfonsäure-5-2-aminoethylester Hydrobromid
MTSES	Methanthiosulfonsäure-5-(2-sulfo)ethylester Na-Salz
MTSET	Methanthiosulfonsäure-5-(2-trimethylammonium)ethylester Bromid
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pfu	<i>plaque forming unit</i>
P _i -Mix	Proteaseinhibitor-Mix
PLC	Peptidbeladungskomplex (<i>peptide loading complex</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
<i>Sf9</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline – Tween20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan

U	<i>unit</i>
US6	<i>unique short region 6</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
wt	wildtyp

8 Anhang

8.1 Plasmid-Karten

8.1.1 pGEM3Z TAP1dn und pCRScript TAP2dn XN

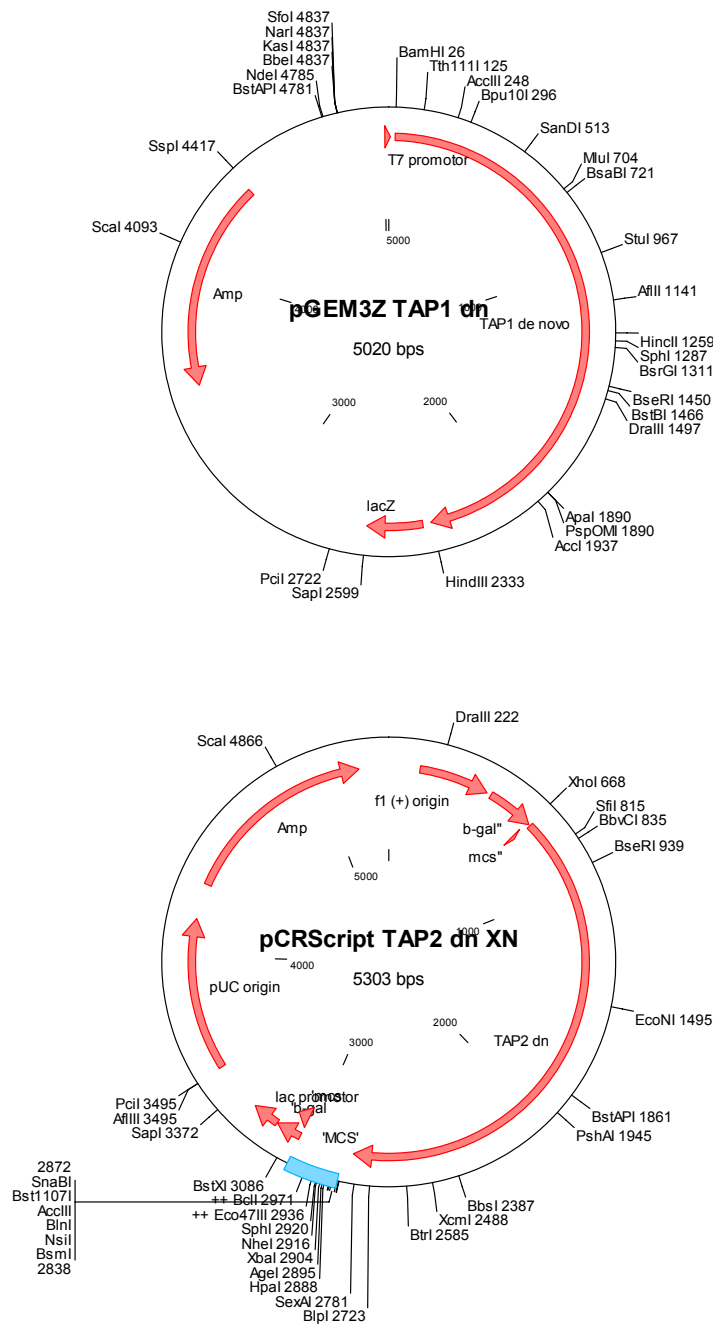


Abbildung 8.1: Plasmidkarten der Klonierungsvektoren der Cystein-freien TAP-Varianten.

8.1.2 p46 TAP1dn und p46 TAP2dn

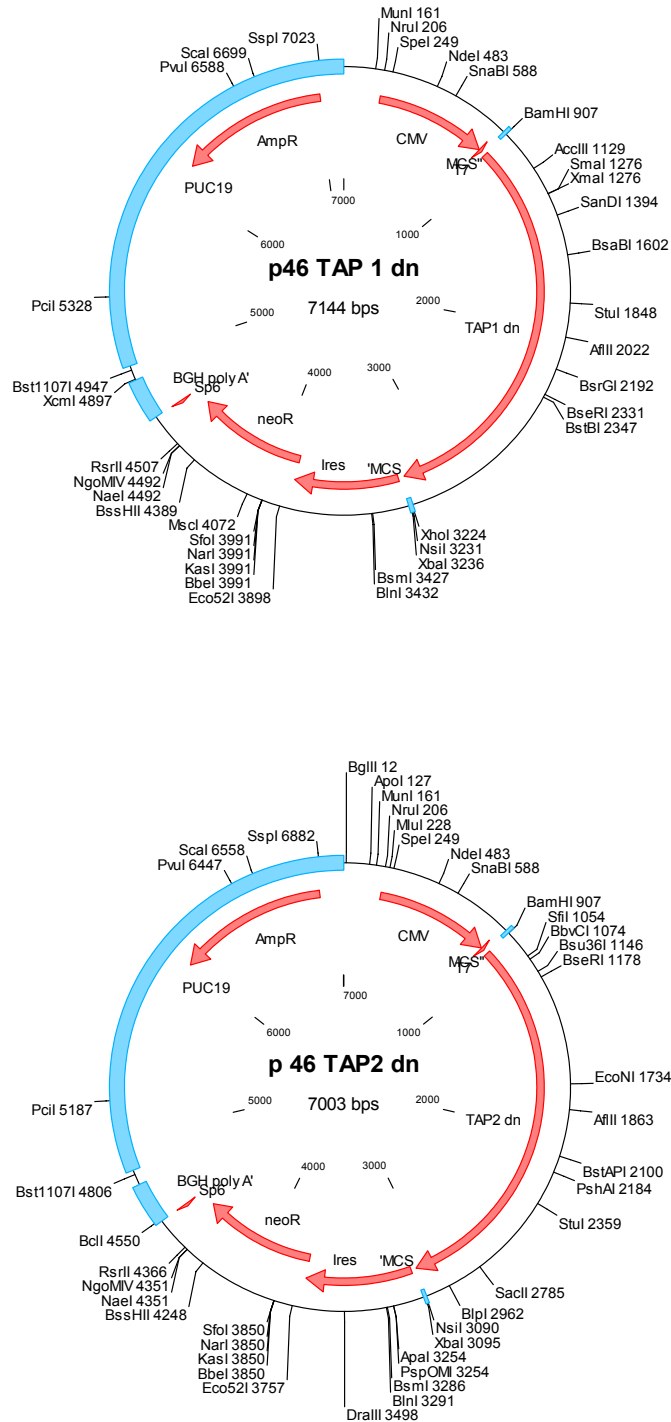
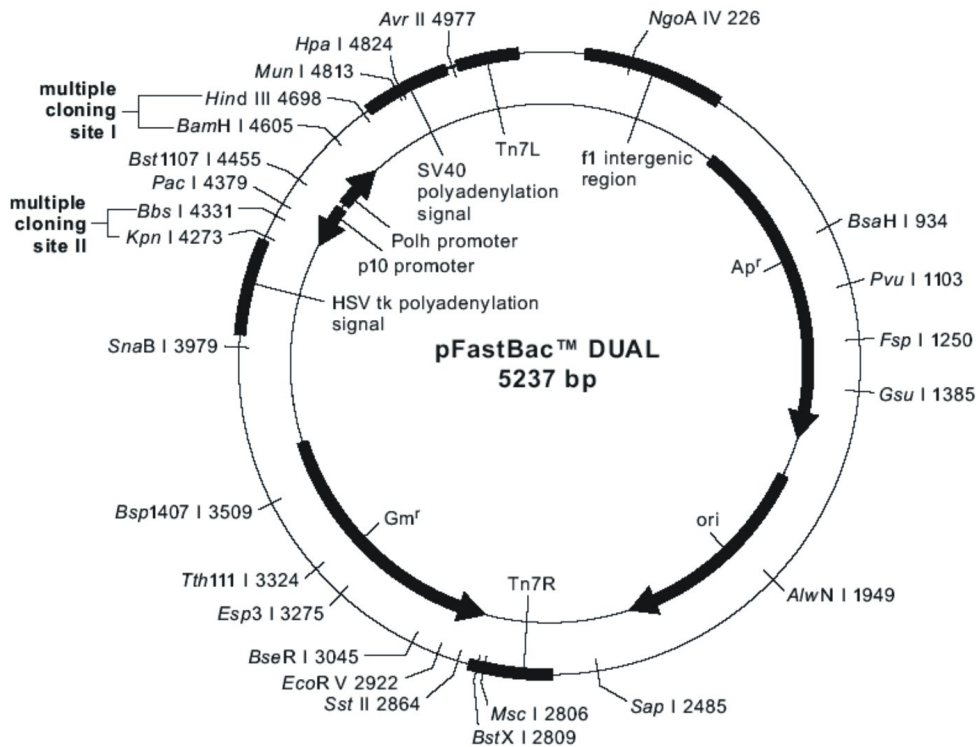


Abbildung 8.2: Plasmidkarten der humanen Expressionsvektoren der Cystein-freien TAP-Varianten.

8.1.3 pFastBac Dual Expressionsvektor



pFastBac™ DUAL polyhedrin promoter region and MCS I:

4515 | ▶ +1
 5' - -AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT AAAT**ATT**CCG GATTATTCAT
 polyhedrin promoter
 BamHI | Rsr II | BssHI II | EcoRI | Stu I | Sal I | Sst I | Spe I | Not I | Nsp V | Xba I
 ACCGTCCAC CATCGGGCGC GGATCCCGGT CCGAAGCGCG CGGAATCAA AGGCCTACGT CGACGAGCTC ACTAGTCGCG GCCGCTTCC AATCTAGAGC
 Pst I | Hind III

CTGCAGTCTC GACAAGCTTG TCGAGAAGTA CTAGAGGATC ATAATC 3'

+1 corresponds to the transcriptional start for the polyhedrin promoter.
ATT corresponds to the original translational start codon. The ATG was mutated to an ATT.
 An in-frame ATG codon must be provided by the cloned gene to initiate translation.
 Stop codons are shown in bold.

pFastBac™ DUAL p10 promoter region and MCS II:

4417 | ▶ +1
 5' - AAA TAAGAATTAT TATCAAATCA TTTGTATATT AATTAATAA CTATACTGTA AATTACATTT TATTTACAAT
 p10 promoter
 Bbs I | Sma I | Xho I | Nco I | Nhe I | Pvu I | Nsi I | Sph I | Kpn I

CACTCGACGA AGACTTGATC ACCCGGGATC TCGAGCCATG GTGCTAGCAG CTGATGCATA GCATGCGGTA CCGGGAGATG GGGGAGGCTA **ACTGAAACAC** 3'

+1 corresponds to the transcriptional start for the p10 promoter and corresponds to position 4420 on the map.
 Digestion at the *Bbs* I site generates a *Bam*HI compatible overhang. An in-frame ATG codon must be provided by the cloned gene to initiate translation when the *Bbs* I, *Sma* I or *Xho* I sites are used for cloning. When cloning into the *Nco* I site, or sites downstream of the *Nco* I site, make sure the reading frame of the cloned gene is in frame relative to the ATG sequence of the *Nco* I site.
 Stop codons are shown in bold.

Abbildung 8.3: Plasmidkarte des pFastBac Dual Vektors für die Expression in Sf9 Zellen.

8.1.4 Plasmidkarten von Cystein-freiem TAP und der Kombinationen aus wild- typ und Cystein-freiem TAP

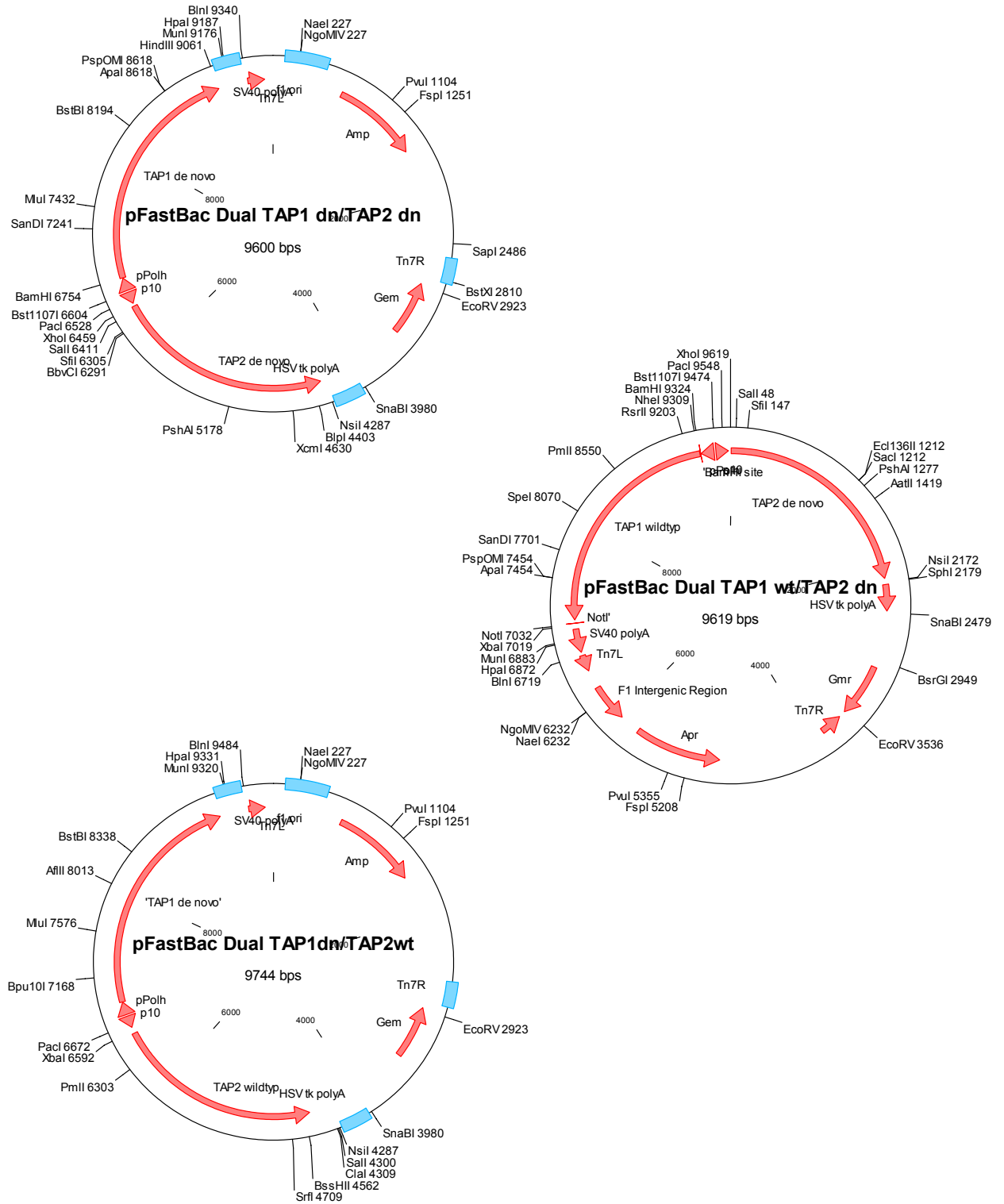


Abbildung 8.4: Plasmidkarten von Cystein-freiem TAP und der Kombinationen aus wildtyp und Cystein-freiem TAP zur Expressioen in SF9 Zellen.

8.1.5 Klonierungsvektor pSL1180

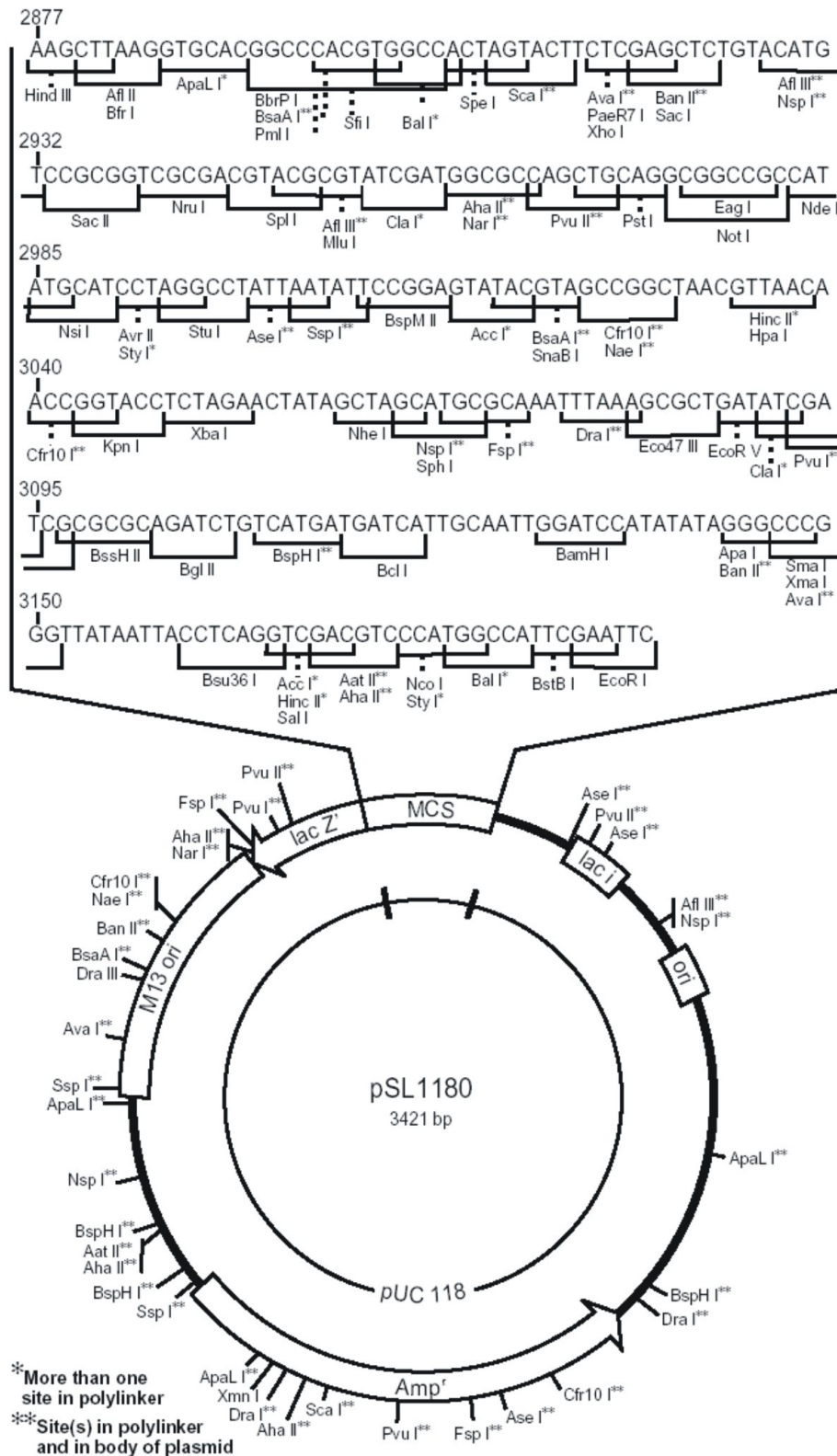


Abbildung 8.5: Plasmidkarte des Klonierungsvektors pSL1180.

8.2 Plasmid-Liste

Liste aller in dieser Arbeit klonierten Plasmide (Chronologisch nach Datum ihrer Entstehung)

	Name	Eigenschaften			
		Plasmid	Insert	Schnittstellen	Klonierungsstrategie
1	pGEM3Z TAP1 dn	pGEM3Z	TAP1 dn		Bereits vorhandenes Ausgangsplasmid
2	pCRScript TAP2 dn	pCRScript	TAP2 dn		Bereits vorhandenes Ausgangsplasmid
3	p46 TAP1 dn	p46	TAP1 dn	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III blunt	Das TAP1 dn Fragment wurde aus Stock 1 ausgeschnitten und in p46 kloniert.
4	p46 TAP1 wt	p46	TAP1 wt		Bereits vorhandenes Ausgangsplasmid (Arbeitsgruppe Seeliger, Mainz)
5	p46 TAP2 dn	p46	TAP2 dn	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III blunt	Das TAP2 dn Fragment wurde aus Stock 2 ausgeschnitten und in p46 kloniert.
6	p46 TAP2 wt	p46	TAP2 wt		Bereits vorhandenes Ausgangsplasmid (Arbeitsgruppe Seeliger, Mainz)
7	pSL1180 TAP1 dn	pSL1180	TAP1 dn	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Das TAP1 dn Fragment wurde aus Stock 3 ausgeschnitten und in pSL1180 kloniert.
8	pSL1180 TAP2 dn	pSL1180	TAP2 dn		Das TAP2 dn Fragment wurde aus Stock 5 ausgeschnitten und in pSL1180 kloniert.
9	pSL1180 TAP2 dn XN	pSL1180	TAP2 dn	<i>Xho</i> I & <i>Nsi</i> I	TAP2 dn wurde durch PCR aus p46 TAP2 dn amplifiziert und in pSL1180 kloniert.

10	pSL1180 TAP1 wt	pSL1180	TAP1 wt	<i>BamHI & NotI</i>	Das TAP1 wt Fragment wurde aus Stock 4 ausgeschnitten und in pSL1180 kloniert.
11	pSL1180 TAP2 wt	pSL1180	TAP2 wt	<i>XhoI & SphI</i>	Plasmid erhalten von Min Chen
12	pCRScript TAP2 dn XN	pCRScript	TAP2 dn XN	<i>EcoRI & XhoI</i>	Das TAP2 dn XN Fragment wurde aus Stock 9 ausgeschnitten und in pCRScript kloniert.
13	pFastBac Dual TAP1 dn	pFastBac Dual	TAP1 dn	<i>BamHI & HindIII</i>	Das TAP1 dn Fragment wurde aus Stock 7 ausgeschnitten und in pFBDual kloniert.
14	pFastBac Dual TAP2 dn	pFastBac Dual	TAP2 dn	<i>BamHI & HindIII</i>	Das TAP2 dn Fragment wurde aus Stock 8 ausgeschnitten und in pFBDual kloniert.
15	pFastBac Dual TAP1 dn / TAP2 dn XN	pFastBac Dual TAP1 dn	TAP2 dn XN	<i>XhoI & NsiI</i>	Das TAP2 dn XN Fragment wurde aus Stock 9 ausgeschnitten und in pFBDual TAP 1 dn kloniert.
16	pFastBac Dual TAP1 dn / TAP2 wt	pFastBac Dual TAP1 dn	TAP2 wt	<i>NotI / Klenow & NsiI</i>	Das TAP2 wt Fragment wurde aus Stock 6 ausgeschnitten und in pFBDual TAP1 dn kloniert.
17	pFastBac Dual TAP1 wt / TAP2 dn XN	pFastBac Dual TAP1 wt (von Min Chen)	TAP2 dn XN		Das TAP2 dn XN Fragment wurde aus Stock 9 ausgeschnitten und in pFBDual TAP1 wt kloniert.
18	pCRScript TAP2 dn (aa 1-265 wt)	pCRScript	802 Bp Fragment TAP2wt + 1374 Bp Fragment TAP2dn XN	<i>XhoI & NsiI</i>	Das TAP2 wt Fragment wurde aus Stock 11 und das TAP2 dn XN Fragment aus Stock 9 ausgeschnitten und in pCRScript kloniert.

19	pFastBac Dual TAP1 dn / TAP2 dn (aa 1-265 wt)	pFastBac Dual TAP1 dn	TAP2 dn (aa 1-265 wt)	<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Das TAP2 dn (aa 1-265 wt) Fragment wurde aus Stock 18 ausgeschnitten und in pFBDual TAP1 dn kloniert.
20	pCRScript TAP2 dn (V394C)	pCRScript		<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Mutagenese
21	pFastBac Dual TAP1 dn / TAP2 dn (V394C)	pFastBac Dual TAP1 dn	TAP2 dn (V394C)	<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Das TAP2 dn (V394C) Fragment wurde aus Stock 20 ausgeschnitten und in pFBDual TAP1 dn kloniert.
22	pCRScript TAP2 dn (S353C)	pCRScript		<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Mutagenese
23	pFastBac Dual TAP1 dn / TAP2 dn (S353C)	pFastBac Dual TAP1 dn	TAP2 dn (S353C)	<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Das TAP2 dn (S353C) Fragment wurde aus Stock 22 ausgeschnitten und in pFBDual TAP1 dn kloniert.
24	pCRScript TAP2 dn (S362C)	pCRScript		<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Mutagenese
25	pFastBac Dual TAP1 dn / TAP2 dn (S362C)	pFastBac Dual TAP1 dn	TAP2 dn (S362C)	<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Das TAP2 dn (S362C) Fragment wurde aus Stock 24 ausgeschnitten und in pFBDual TAP1 dn kloniert.
26	pCRScript TAP2 dn (S353/362C)	pCRScript		<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Mutagenese
27	pFastBac Dual TAP1 dn / TAP2 dn (S353/362C)	pFastBac Dual TAP1 dn	TAP2 dn (S353/362C)	<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Das TAP2 dn (S353/362C) Fragment wurde aus Stock 26 ausgeschnitten und in pFBDual TAP1 dn kloniert.

28	pCRScript TAP2 dn (Triple Mut)	pCRScript		<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Mutagenese
29	pFastBac Dual TAP1 dn / TAP2 dn (Triple Mut)	pFastBac Dual TAP1 dn	TAP2 dn (Triple Mut)	<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Das TAP2 dn (Triple Mut) Fragment wurde aus Stock 28 ausgeschnitten und in pFBDual TAP1 dn kloniert.
30	pCRScript TAP2 dn (A209/213C)	pCRScript		<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Mutagenese
31	pFastBac Dual TAP1 dn / TAP2 dn (A209/213C)	pFastBac Dual TAP1 dn	TAP2 dn (A209/213C)	<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Das TAP2 dn (A 209/213C) Fragment wurde aus Stock 30 ausgeschnitten und in pFBDual TAP1 dn kloniert.
32	pCRScript TAP2 dn (S213C)	pCRScript		<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Mutagenese
33	pFastBac Dual TAP1 dn / TAP2 dn (S213C)	pFastBac Dual TAP1 dn	TAP2 dn (S213C)	<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Das TAP2 dn (S213C) Fragment wurde aus Stock 32 ausgeschnitten und in pFBDual TAP1 dn kloniert.
34	pCRScript TAP2 dn (A209C)	pCRScript		<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Mutagenese
35	pFastBac Dual TAP1 dn / TAP2 dn (A209C)	pFastBac Dual TAP1 dn	TAP2 dn (A209C)	<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Das TAP2 dn (A209C) Fragment wurde aus Stock 34 ausgeschnitten und in pFBDual TAP1 dn kloniert.
36	pCRScript TAP2 dn (A197C)	pCRScript		<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Mutagenese

37	pFastBac Dual TAP1 dn / TAP2 dn (A197C)	pFastBac Dual TAP1 dn	TAP2 dn (A197C)	<i>XhoI</i> & <i>NsiI</i>	Das TAP2 dn (A197C) Fragment wurde aus Stock 36 ausgeschnitten und in pFBDual TAP1 dn kloniert.
38	pGem 3Z TAP1 dn (S488C)	pGem 3Z		<i>BamHI</i> & <i>HindIII</i>	Mutagenese
39	pFastBac Dual TAP1 dn (S488C) / TAP2 dn	pFastBac Dual TAP2 dn	TAP1 dn (S488C)	<i>BamHI</i> & <i>HindIII</i>	Das TAP1 dn (S488C) Fragment wurde aus Stock 38 ausgeschnitten und in pFBDual TAP2 dn kloniert.
40	pGem 3Z TAP1 dn (S436C)	pGem 3Z		<i>BamHI</i> & <i>HindIII</i>	Mutagenese
41	pFastBac Dual TAP1 dn (S436C) / TAP2 dn	pFastBac Dual TAP2 dn	TAP1 dn (S436C)	<i>BamHI</i> & <i>HindIII</i>	Das TAP1 dn (S436C) Fragment wurde aus Stock 40 ausgeschnitten und in pFBDual TAP2 dn kloniert.
42	pGem 3Z TAP1 dn (T399C)	pGem 3Z		<i>BamHI</i> & <i>HindIII</i>	Mutagenese
43	pFastBac Dual TAP1 dn (T399C) / TAP2 dn	pFastBac Dual TAP2 dn	TAP1 dn (T399C)	<i>BamHI</i> & <i>HindIII</i>	Das TAP1 dn (T399C) Fragment wurde aus Stock 42 ausgeschnitten und in pFBDual TAP2 dn kloniert.
44	pGem 3Z TAP1 dn (S326C)	pGem 3Z		<i>BamHI</i> & <i>HindIII</i>	Mutagenese
45	pFastBac Dual TAP1 dn (S326C) / TAP2 dn	pFastBac Dual TAP2 dn	TAP1 dn (S326C)	<i>BamHI</i> & <i>HindIII</i>	Das TAP1 dn (S326C) Fragment wurde aus Stock 44 ausgeschnitten und in pFBDual TAP2 dn kloniert.

46	pGem 3Z TAP1 dn (F265C)	pGem 3Z		<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Mutagenese
47	pFastBac Dual TAP1 dn (F265C) / TAP2 dn	pFastBac Dual TAP2 dn	TAP1 dn (F265C)	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Das TAP1 dn (F265C) Fragment wurde aus Stock 46 ausgeschnitten und in pFBDual TAP2 dn kloniert.
48	pGem 3Z TAP1 dn (S220C)	pGem 3Z		<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Mutagenese
49	pFastBac Dual TAP1 dn (S220C) / TAP2 dn	pFastBac Dual TAP2 dn	TAP1 dn (S220C)	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Das TAP1 dn (S220C) Fragment wurde aus Stock 48 ausgeschnitten und in pFBDual TAP2 dn kloniert.
50	pGem 3Z TAP1 dn (S179C)	pGem 3Z		<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Mutagenese
51	pFastBac Dual TAP1 dn (S179C) / TAP2 dn	pFastBac Dual TAP2 dn	TAP1 dn (S179C)	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Das TAP1 dn (S179C) Fragment wurde aus Stock 50 ausgeschnitten und in pFBDual TAP2 dn kloniert.
52	pGem 3Z TAP1 dn (S124C)	pGem 3Z		<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Mutagenese
53	pFastBac Dual TAP1 dn (S124C) / TAP2 dn	pFastBac Dual TAP2 dn	TAP1 dn (S124C)	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Das TAP1 dn (S124C) Fragment wurde aus Stock 52 ausgeschnitten und in pFBDual TAP2 dn kloniert.
54	pGem 3Z TAP1 dn (A87C)	pGem 3Z		<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Mutagenese

55	pFastBac Dual TAP1 dn (A87C) / TAP2 dn	pFastBac Dual TAP2 dn	TAP1 dn (A87C)	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Das TAP1 dn (A87C) Fragment wurde aus Stock 54 ausgeschnitten und in pFBDual TAP2 dn kloniert.
56	pGem 3Z TAP1 dn (A51C)	pGem 3Z		<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Mutagenese
57	pFastBac Dual TAP1 dn (A51C) / TAP2 dn	pFastBac Dual TAP2 dn	TAP1 dn (A51C)	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Das TAP1 dn (A51C) Fragment wurde aus Stock 56 ausgeschnitten und in pFBDual TAP2 dn kloniert.
58	pGem 3Z TAP1 dn (S6C)	pGem 3Z		<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Mutagenese
59	pFastBac Dual TAP1 dn (S6C) / TAP2 dn	pFastBac Dual TAP2 dn	TAP1 dn (S6C)	<i>Bam</i> HI & <i>Hind</i> III	Das TAP1 dn (S6C) Fragment wurde aus Stock 58 ausgeschnitten und in pFBDual TAP2 dn kloniert.

8.3 Primerliste *de novo* Gensynthese

Primer für die *de novo* Gensynthese von TAP1 und TAP2 generiert von Kurt Pawlitschko.

Name	5'-Sequenz-3'
TAP1_11F	GTTCCCTGTGGGTCCCAGGCGGTCAGGGCGGCTCCGGCAACCCTGTGAGAAGACTGCTGGGCTCC
TAP1_13F	CCTGGTCCTGGTCGTCCTGTCTCTGGGCGAAATGGCTATCCCTTTCTTCACCGGCAGACTGAC
TAP1_15F	GACACCTTCACGCGTAACTTAACCCTGATGTCCATCCTGACCATCGCTTCCGCTGTCCTGG
TAP1_17F	CACCATGGGCCACGTCCACTCCCACCTGCAGGGCGAAGTCTTCGGTGCCGTCCTGAGACAGG
TAP1_19F	GACCGGCAACATCATGTCCAGAGTCACCGAAGATACGTCCACCCTGTCTGACTCCCTGTCC
TAP1_1F	GGGGATCCATGGCTTCCTCCAGATCCCCTGCTCCTAGAGGCTCCAGATCTCTGCCTGGCGCTTC
TAP1_21F	GTCAGAGGCCTGGCCCTGCTGGGCATCATGCTGTGGGGCTCCGTCTCCCTGACTATGGTGACC
TAP1_23F	TGCTGCCTAAGAAGGTCGGCAAGTGGTACCAGCTGCTGGAAGTCCAGGTCAGAGAATCCCTG
TAP1_25F	CGAAGCCTTAAGTGCTATGCCTACCGTCAGATCCTTCGCTAACGAAGAAGGCGAAGCTCAG
TAP1_27F	AGACCCTGAACCAGAAGGAAGCTGTGCTTACGCTGTCAACTCCTGGACCACCTCCATCTCCG
TAP1_29F	ATCGGCGGCCAACTGGTGACCTCCGGCGCTGTGAGCTCTGGCAACCTGGTCACCTTCGTCCTG
TAP1_31F	TCGAAGTCCTGCTGTCCATCTACCCTAGAGTCCAGAAGGCTGTCGGCTCCTCCGAAAAGATC
TAP1_33F	CCACCTAGTGGCCTGCTGACCCCTCTGCATCTGGAAGGACTGGTCCAGTTCAGGACGTCTCCTTC
TAP1_35F	CCTGCAGGGTCTGACCTTCACCCTGAGACCTGGCGAAGTCACCGCACTGGTCGGCCCTAACGGCTCC
TAP1_37F	CCTGTACCAGCCTACCGGCGGCCAGCTGCTGCTGGACGGCAAGCCTCTGCCTCAGTACGAACACAG
TAP1_39F	GCCAGGAACCTCAGGTCTTCGGCAGATCTCTGCAGGAAAACATCGCTTACGGCCTGACCCAGAAGC
TAP1_3F	TGGCTGACTGGGTCTGCTGAGAACCGCTCTGCCTAGAATCTTCTCCCTGCTGGTCCCTACCGCCC
TAP1_41F	CAAGTCCGGGGCCCACTCCTTCATCTCCGGCCTGCCTCAGGGCTACGACACCGAAGTAG

TAP1_43F	GGCCAGAGACAGGCTGTCGCTCTGGCTAGAGCCCTGATCAGAAAGCCTTCCGTCCTGATCCTGG
TAP1_45F	CTCCCAGCTGCAAGTCGAACAACCTGCTGTACGAATCCCCTGAAAGATACTCCAGATCCGTCCTG
TAP1_47F	GGTCGAACAGGCTGACCACATCCTGTTCCCTGGAAGGTGGCGCTATCAGAGAAGGCGGCACCC
TAP1_49F	CCTACTGGGCTATGGTCCAGGCTCCTGCTGACGCTCCTGAACTGGTCCCTAGAGGCTCCGGTG
TAP1_5F	TCCAGATGGGCTGTCTGTGGCTGGGTGCTTCCGGAGTCCTGAGAGCTACCGTCGGCTCCAAGTC
TAP1_7F	CTCTGAAGCCTCTGGCCGCTGCTCTGGGCCTGGCCTTGCCAGGTCTGGCTCTGTTTCAGAGAACTG
TAP1_9F	TCCACCAGACTGCTGCACTGGGGCTCCCATCCAACCGCTTTCGTCGTCTCCTACGCTGCTGCCC
TAP1_2R	CAGGACCCAGTCAGCCAGCAGCAGCAGGACGGTGCCCAGCCAAGCCAGGGAAGCGCCAGGCAGAG
TAP1_4R	AGGACAGCCCATCTGGACAGGCCGACAGCCCAGACTCTCAGCAGAGGCAGGGCGGTAGGGACCAGC
TAP1_6R	GGCCAGAGGCTTCAGAGCAGCCAGCCAGCCCTGAGCGCCAGCGTTTTTCGGACTTGGAGCCGACGG
TAP1_8R	CCGAGACAAGTCTCTTGACTAGAGGACCCCGCGAGGGCCCAGGCGACTGAGGTGGTCTGACGACGT
TAP1_10R	TGGGACCCACAGGGAACCCAGCTTGTGCCACAGGGCGGCAGCAGGCAGGGCAGCAGCGTAGG
TAP1_12R	CTTCTGACGACCCGAGGGACCCAAGGCTTTGGTCTTCTGACAGGGACAAGGACCAGGACCAGCAGG
TAP1_14R	AGTTACGCGTGAAGGTGTCAGCGGAGCCATCCTGCAGAATCCAGTCGGTCAGTCTGCCGGTGAAG
TAP1_16R	GGACGTGGCCCATGGTGTGTTGTAGATGCCGTCGCCGACGAATTCCAGGACAGCGGAAGCG
TAP1_18R	GACATGATGTTGCCGGTCTGGTTCTGCTGGAAGAATTCGGTTTCCTGTCTCAGGACGGCAC
TAP1_20R	AGGGCCAGGCCTCTGACCAGGTACCACAGGAACAGGGACAGGTTTTTCGGACAGGGAGTCAGACAG
TAP1_22R	CGACCTTCTTAGGCAGCAGGAACAGCAGAGGCAGGGTGATCAGGGTCACCATAGTCAGGGAG
TAP1_24R	CATAGCACTTAAGGCTTCGATAGCGACCTGGGAGGACTTAGCCAGGGATTCTCTGACCTGG
TAP1_26R	CCTTCTGGTTCAGGGTCTTGATTTCTGACGCTTTTCTCTGAACTTCTGAGCTTCGCCTTCTTC
TAP1_28R	ACCAGTTGGCCGCCGATGTACAGGATACCGACTTTCAGCAGCATGCCGGAGATGGAGGTGGTC
TAP1_30R	ATGGACAGCAGGACTTCGACGGCCTGGGTGAACTGCATCTGGTACAGGACGAAGGTGACCAG
TAP1_32R	AGCAGGCCACTAGGTGGGGATCTAGGGGTTCTGTCCAGGTATTCGAAGATCTTTTCGGAGGAGCC

TAP1_34R	AAGGTCAGACCCTGCAGGACCAGCACGTCAGGTCTGTTAGGGTAAGCGAAGGAGACGTCCTGGAAC
TAP1_36R	CGGTAGGCTGGTACAGGTTCTGCAGCAGAGCAGCGACGGTGGACTTGCCGGAGCCGTTAGGGCCG
TAP1_38R	GACCTGAGGTTCTGGCCGACAGCAGCGACCTGTCTGTGCAGGTATCTGTGTTTCGTAAGGAGCAG
TAP1_40R	AGTGGGCCCCGGACTTGACAGCGGCGGCGGTGATTTCTTCCATGGTAGGCTTCTGGGTCAGGCCG
TAP1_42R	GACAGCCTGTCTCTGGCCGCCGGACAGCTGAGAGCCAGCTTCGTCTACTTCGGTGTCTGAGCC
TAP1_44R	TCGACTTGCAGCTGGGAGTTAGCGTCCAGAGCGGAGGTAGCGTCCAGGATCAGGACGGAAGGC
TAP1_46R	TGGTCAGCCTGTTTCGACCAGGGACAGGTGCTGGGTGATCAGCAGGACGGATCTGGAGTATC
TAP1_48R	GGACCATAGCCCAGTAGGAGCCCTTCTTTTCCATCAGCTGCTGGTGGGTGCCGCCTTCTCTG
TAP1_50R	ACAAGCTTTCAGTGATGGTGTGATGGTGTGATGGTGTGATGTCCACCGGAGCCTCTAGGG
TAP2_1F	GGGATCCATGAGACTGCCTGACCTGAGACCCTGGACCTCTCTGCTGCTGGTCGACGCTGC
TAP2_3F	GGGTACCCTGCTGCCACAAGGTCTGCCTGGTCTGTGGCTGGAAGGCACCCTGAGACTGGGCG
TAP2_5F	CCTGCTGGGCTTCGTCGGCACTCTGCTGTTGCCTCTGTCCCTGGCTACCCTCTGACCGTC
TAP2_7F	CCAGGGCTCCTCCTGCTAGAGTCGCCTCTGCTCCTTGGTCTTGGCTGTTGGTCGGCTACGGCG
TAP2_9F	GCTGTCCTGTCCCCTCCTGGCGCTCAGGAAAAGGAACAAGATCAGGTCAACAACAAGGTCC
TAP2_11F	CAGACCTGACCTGCCTCTGCTGGTCGCTGCTTTCTTCTTCCCTGGTCCTGGCCGTCCTGGG
TAP2_13F	AGAGTCATCGACATCCTGGGCGGCGACTTCGACCCTCACGCTTTCGCTTCCGCTATCTTCTTC
TAP2_15F	TGTCCGCTGGTGCCAGAGGCGGTTCCCTTACCTACACCATGTCCAGAATCAACCTGAGAATC
TAP2_17F	GACAGGACCTGGGCTTCTTCCAGGAAACCAAGACCGGCGAACTGAACTCCAGACTGTCCTCCGAC
TAP2_19F	GCCTTTAAACGCTAACGTCCTGCTGAGATCCCTGGTCAAGGTCGTCGGCCTGTACGGTTTTATGC
TAP2_21F	TCCCTGCTGCACATGCCTTTCACCATCGCTGCTGAAAAGGTCTACAACACCAGACACCAGGAAGTC
TAP2_23F	AGAGCTGGCCAGGTCGTCAGAGAAGCTGTCCGGCGCCTGCAAACCGTCAGATCCTTCGGCGCTG
TAP2_25F	AGCTCTGGAACAGTCCAGACAGCTGTACTGGAGAAGAGACCTGGAAAGAGCCCTGTACCTGCTGG
TAP2_27F	AGATGCTGATGCTGTCCGTCGGTCTGCAACAGATGCAGGACGGCGAGCTCACCCAGGGCTCCCTG

TAP2_29F	TCGGCTCCTACGTCCAGACCCTGGTCTACATCTACGGCGACATGCTGTCCAACGTCGGTGCCGCCG
TAP2_31F	CAGCCTAACCTGCCTTCCCCTGGCACCCTGGCTCCTACCACCCTGCAAGGAGTCGTCAAGTTC
TAP2_33F	ACAGACCTGATAGGCCTGTCCTGAAGGGCCTGACCTTCACCCTGAGACCTGGCGAAGTCACC
TAP2_35F	GTCCACCGTCGCTGCTCTGCTGCAGAACCTGTACCAGCCTACCGGCGGCCAGGTCCTGCTGGAC
TAP2_37F	CACTACCTGCACTCCCAGGTCGTCTCCGTCCGGCCAGGAACCTGTCCTGTTCTCCGGCTCCGTC
TAP2_39F	CCTCCGAAGACGACAAGGTCATGGCTGCTGCTCAGGCTGCTCACGCTGACGACTTCATCCAGG
TAP2_41F	ATGTCGGCGAAAAGGGCTCCCAACTGGCTGCTGGTCAGAAGCAGAGACTGGCTATCGCTAGGG
TAP2_43F	CCTGGACGAAGCTACCTCCGCTCTGGACGTGCAGTCCGAACAGGCTCTGCAGGACTGGAAC
TAP2_45F	CATCGCTCACAGACTGCAGACCGTCCAGAGAGCCCACCAGATCCTGGTCCTGCAAGAAGGCAAGC
TAP2_47F	GCCAGGACCTGTACTIONCAGACTGGTCCAGCAGAGACTGATGGACCTGGTCCCTAGAGGCTCCG
TAP2_2R	TGTGGCAGCAGGGTACCCAGTGGACCTTGCAGCAGCCACAGCAGAGCAGCGTCGACCAGCAG
TAP2_4R	CGACGAAGCCCAGCAGGCCCTCAGCTTCAGCAGGCCCCACAGGCCGCCCAGTCTCAGGGTG
TAP2_6R	AGCAGGAGGAGCCCTGGAAGCGCCAGCGACCAGAGCCCTCAGGGAGACGGTCAGAGGGGTAGC
TAP2_8R	GGAGGGGACAGGACAGCCCACAGGGACCAGGACAGGCCAGCAGCGCCGTAGCCGACCAAC
TAP2_10R	AGAGGCAGGTCAGGTCTGGACAGCTTCAGCAGACGCCACATCAGGACCTTGTTGTTGACCTG
TAP2_12R	CCAGGATGTCGATGACTCTGCCGGAGTAGTGTGGGATCAGGGTTTCACCCAGGACGGCCAGGAC
TAP2_14R	TCTGGCACCCAGCGGACAGGGAAGAACC GAAGGAGAACAGGGCCATGAAGAAGATAGCGGAAGCG
TAP2_16R	GAAGCCCAGGTCCTGTCTCAGCAGGGAGGAAAACAGTTGTTCTCTGATTCTCAGGTTGATTCTGG
TAP2_18R	GGACGTTAGCGTTTAAAGGCAGCCAGTTGGACATCAGGGTGGTGTCCGAGGACAGTCTGGAG
TAP2_20R	GGCATGTGCAGCAGGGACAGCAGGGTCCAGTCTAGGGGAGATAGACAGCATAAAACCGTACAGGCC
TAP2_22R	ACGACCTGGCCAGCTCTAGCGACAGCGTCCTGGATTTCTCTTAAGACTTCCTGGTGTCTGGTG
TAP2_24R	TCTGGACTGTTCCAGAGCTTCCTTGATCTGGAGACTTCGTGTTCTTCAGCGCCGAAGGATCTG
TAP2_26R	ACGGACAGCATCAGCATCTGGACTCCCAGGTGCAGGACTCTTCTGACCAGCAGGTACAGGGCTC

TAP2_28R	TCTGGACGTAGGAGCCGACAGATTCCTGGTAGATCATGAAGGACAGCAGGGAGCCCTGGGTGA
TAP2_30R	GGAAGGCAGGTTAGGCTGTCTGTCCATGTAGGAGAAAACCTTCTCGGCGGCACCGACGTTGGAC
TAP2_32R	ACAGGCCTATCAGGTCTGTTAGGGTAAGCGAAAGAGACGTCCTGGAACCTTGACGACTCCTTGC
TAP2_34R	GAGCAGCGACGGTGGACTTGCCAGAACCGTTAGGGCCGACCAGAGCGGTGACTTCGCCAGGTC
TAP2_36R	CCTGGGAGTGCAGGTAGTGGTGTTCGTA CTGGGAGATAGGCTTTTCGTCCAGCAGGACCTGGC
TAP2_38R	CCTTGTCGTCTTCGGAGGACTGCAGGCCGTAAGCGATGTTGTTTCTGACGGAGCCGGAGAACAG
TAP2_40R	AGCCCTTTTCGCCGACATCGGTGTAGATGCCGTGTTCCATTTCTGGATGAAGTCGTCAGC
TAP2_42R	GAGGTAGCTTCGTCCAGGATCAGGACCCGCGGATCTCTGACCAGAGCCCTAGCGATAGCCAGTC
TAP2_44R	CTGCAGTCTGTGAGCGATGACCAGGACGGTTCTGTGCCTCTGGAGTTCCAGTCCTGCAGAGC
TAP2_46R	TGGAGTACAGGTCCTGGCCCTCTTGCAGCTGAGCCAGCTTCTGCAGCTTGCCTTCTTGCAGGAC
TAP2_48R	ACAAGCTTTCAACCACCGAACTGTGGATGTCTCCAAGCAGATCCACCGGAGCCTCTAGGGACC

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Robert Tampé für das interessante und spannende Thema sowie die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Sein reges Interesse am Fortgang meiner Arbeit waren Motivation und Herausforderung zugleich.

Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Insbesondere gilt mein Dank Dr. Joachim Koch für die ausgezeichnete Betreuung meines Projekts und die Diskussions- und Hilfsbereitschaft beim Schreiben/Korrigieren der Publikationen und dieser Arbeit.

Bei Dr. Ulrike Ritz und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Barbara Seeliger möchte ich mich für die herzliche Aufnahme in ihrem Labor in Mainz zu Beginn meiner Arbeit bedanken. Vielen Dank für die hervorragende Einarbeitung in die Methoden der humanen Zellkultur.

Allen jetzigen und früheren Mitgliedern des Labors 1.23 und der „TAP“-Gruppe danke ich für die angenehme Atmosphäre und die schöne Zeit im Labor sowie deren stetige Hilfsbereitschaft auch über die Grenzen des Labors hinaus.

Allen Kollegen des Instituts für Biochemie gilt mein besondere Dank für die angenehme Arbeitsklima und die fachlichen und fachübergreifenden Diskussionen.

Bei Eva Jaks, Peter Lamken, Matthias Hofacker, Nils Hanekop, Katharina Strube, Christina Fischer und Tanja Mittag möchte ich mich für die gemeinsame Studien- und Promotionszeit und den daraus entstandenen Freundschaften ganz herzlich bedanken.

Meinen Eltern und meinem Mann Michael danke ich für die liebevolle, immerwährende und geduldige Unterstützung während meiner gesamten Studienzzeit.

Lebenslauf

Susanne Schrodtt, geb. Heintke
geb. am 12. Juli 1976 in Schlüchtern, Deutschland

Naturwissenschaftliche Ausbildung:

seit 06/2001

Promotion am Institut für Biochemie, Abteilung Zelluläre Biochemie der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main mit dem Thema: „Membrantopologie und funktionale Charakterisierung der Transmembrandomänen des Transportkomplexes TAP“

Doktorvater: Prof. Dr. Robert Tampé

03/2001

Abschluss: Diplom-Biochemikerin an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main

09/2000 -
03/2001

Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Genetik der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main mit dem Thema: „Isolierung und Charakterisierung einer alternativen Cytochrom c Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*“

Betreuer: Prof. Dr. Bernd Ludwig

10/1998

Vordiplom Biochemie

09/1996 -
07/2000

Studium der Biochemie an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main

Schulbildung:

1993 - 1996
06/1996

Grimmelshausen Gymnasium, Gelnhausen,
Abschluss mit dem Abitur

1987 - 1993
1983 - 1987

Friedrich August Genth-Schule, Wächtersbach
Grundschule „Kinderbrücke“, Wächtersbach

Konferenzen:

- 10/2005 Internationales Symposium des SFB 628 „Functional Membrane Proteomics – From Transport Machineries to Dynamic Assemblies and Networks“, Frankfurt am Main. (Posterbeitrag)
- 06/2005 Gordon Reseach Konferenz zum Thema „Mechanisms of Membrane Transport“, Tilton, New Hampshire, USA. (Posterbeitrag)
- 05/2005 5. Transportkolloquium – Schloß Rauischholzhausen, Marburg
- 05/2003 4. Transportkolloquium – Schloß Rauischholzhausen, Marburg
- 03/2003 4th FEBS Advanced Lecture Course „ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Genetic Disease to Multidrug Resistance“, Gosau, Österreich. (Posterbeitrag)
- 05/2001 3. Transportkolloquium – Schloß Rauischholzhausen, Marburg