

ZUSAMMENFASSUNG

Zum Zwecke der Immunevasion kodieren sowohl das humane Zytomegalovirus (HCMV) als auch das Herpes Simplex Virus (HSV) für Inhibitoren des Peptidtransporters TAP. Durch spezifische Interaktion von gpUS6 (HCMV) und ICP47 (HSV) mit TAP wird die Peptidtranslokation ins ER-Lumen als Voraussetzung für die Beladung der MHC I-Komplexe und folglich die Antigenpräsentation durch CD8⁺ T-Zellen gehemmt. Während gpUS6 (21 kDa) zu den Transmembran Typ I Glykoproteinen gehört und im ER lokalisiert ist, handelt es sich bei ICP47 (8,5 kDa) um ein zytosolisch lokalisiertes Protein. TAP bildet ein Dimer aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2, welche beide sowohl eine Transmembran-(TMD) als auch eine zytosolische Nukleotid-Binde-Domäne (NBD) umfassen. TAP macht die aus der NBD vermittelten Hydrolyse von ATP resultierende Energie nutzbar, um Peptide über die ER Membran aus dem Zytosol ins ER Lumen zu transportieren. Die Membrantopologie der Pore, die Zahl der Transmembransegmente (TMS) und das funktionelle Zusammenspiel von NBDs und TMDs, unabdingbar hinsichtlich der Funktionalität des Membrantransporters, sind bis zum heutigen Tage weitestgehend unverstanden.

In dieser Arbeit wurden gpUS6 und ICP47 als molekulare Instrumente hinsichtlich der Untersuchung der TAP-Struktur und -Funktion nutzbar gemacht. Trotz Unterschieden in ihren biochemischen Eigenschaften sind gpUS6 und ICP47 phenotypische Merkmale gemeinsam, wie die Interaktion ausschliesslich mit preformierten TAP-Komplexen und einen Spezies-spezifischen Wirkungsmechanismus. Die Konstruktion sowohl intermolekularer als auch intramolekularer TAP-Chimären erlaubte die Identifikation ICP47- und gpUS6-relevanter Interaktionsdomänen innerhalb von TAP1 und TAP2. Eine Bindestelle, welche die Hemmung des Peptidtransportes über TAP1 vermittelt, wurde innerhalb des C-terminalen Loops der TAP1-TMD identifiziert, ein erstmaliger Beweis für die Zusammensetzung von TAP1 aus 10 TMSs. Um eine effiziente Hemmung des Peptidtransportes durch TAP zu gewährleisten, ist eine zusätzliche gpUS6-Interaktion mit TAP2 eine unmittelbare Voraussetzung. Für die initiale Interaktion von ICP47 mit TAP sind humane Sequenzen innerhalb des N-Terminus der TAP2-TMD ausreichend. Darüberhinaus wurden Interaktionsdomänen innerhalb von TAP1 und des C-Terminus von TAP2 identifiziert.

Weitere TAP-Konstrukte, die Mutationen innerhalb des Walker A Motifs als Bestandteil der NBD enthielten, erlaubten eine detaillierte Analyse des Wirkungsmechanismus dieser zytosolischen TAP-Domäne. Es konnte demonstriert werden, dass aus der ATP-Hydrolyse resultierende Konformationsänderungen innerhalb der TMD von gpUS6 erkannt werden. Der Befund wurde in ein mehrstufiges Modell hinsichtlich der gpUS6-Interaktion mit TAP integriert. Nach TAP2-vermittelter ATP-Bindung und -Hydrolyse und den resultierenden Konformationsänderungen innerhalb der TMD wird die gpUS6-Bindungsdomäne exponiert. gpUS6 bindet spezifisch an TAP1 und TAP2 und inhibiert den Peptidtransport über die ER-Membran. Im Gegensatz zu gpUS6 bindet ICP47 TAP unabhängig von ATP. Es konnte gezeigt werden, dass sich gpUS6- und ICP47-Bindung aufgrund unterschiedlicher TAP-Konformationen gegenseitig ausschließen. Die ICP47-Bindung an TAP kompetiert nicht mit der Peptidbindung an TAP, kann aber von gpUS6 gehemmt werden, was auf einen auf Konformationsveränderungen basierenden Wirkungsmechanismus des ICP47 schließen lässt. Dieser Befund stellt andere Studien infrage, die ICP47 einen kompetitiven Wirkungsmechanismus attestieren.