

6. Diskussion

Mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten und früheren Beobachtungen aus der Literatur läßt sich ein Bild von den Assemblierungsschritten im ER zeichnen, die zu einer optimalen Peptidbeladung von MHC-Klasse-I-Molekülen führen.

Die Schwere Kette des MHC-Moleküls wird, durch seine Signalsequenz vermittelt, kotranslational in die Membran des ER inseriert. Unmittelbar nach der Translokation findet man sie mit dem Lektin Calnexin assoziiert (Degen et al., 1991, Hochstenbach et al., 1992). Es ist anzunehmen, daß die Bindung von Calnexin an die Schwere Kette erfolgt, wenn der Kohlenhydratrest an Position 86 (und 176 an Maus-MHC-Molekülen) der Form $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ durch Glukosidase I und II zur monoglykosylierten Form getrimmt wurde (Ware et al., 1995; Vassilakos et al., 1998). Faltet sich die Schwere Kette an Calnexin schließlich in die korrekte Konformation, wird der De- und Reglykosilierungszyklus durch die Enzyme Glykosidase II und UDP-Glukose-Glykoprotein-Glukosyltransferase eingestellt und der vollständig deglykosylierte Zustand wird erreicht (Hebert et al., 1995). Aggregiert die Schwere Kette vor, während oder nach diesen Vorgängen, ist es möglich, daß sie sich von Calnexin löst und stattdessen vom Protein BiP gebunden wird (Nößner und Parham, 1995). Calnexin und BiP scheinen unterschiedliche Formen von MHC-Klasse-I-Molekülen zu erkennen, wobei möglicherweise erst die Bindung an BiP die Schwere Kette zur Degradation freigibt (Übersicht in Zhang et al., 1997).

Die Beobachtungen von Lindquist und Kollegen sprechen für eine Assoziation von ER60 an freie Schwere Ketten, die wahrscheinlich zur korrekten intramolekularen Disulfidbrückenbildung im MHC-Molekül führt (Lindquist et al., 1998). Auch Farmery und Kollegen fanden ER60 sowohl an der gefalteten Form von HC als auch an der Form, die noch keine intramolekularen Disulfidbindungen enthält (Farmery et al., 2000). Aus unseren Ergebnissen folgern wir, daß sich ER60 nach der Bildung der Disulfidbrücken wieder vom MHC-Molekül löst. ER60 kann nicht (oder nur in geringen Mengen) im Calretikulín-assoziierten Komplex an HC nachgewiesen werden, wenn dieser nicht an TAP gebunden ist (siehe 5.4.1). Erst wenn sich die Brücke zu TAP gebildet hat, tritt ER60 bei Anwesenheit von humanem Tapasin wieder in den Beladungskomplex ein. Auch Morrice und Powis sowie Hughes und Cresswell fanden ER60 im TAP-assoziierten Beladungskomplex (Morrice und Powis, 1998; Hughes und Cresswell,

1998). Nach der Bindung von β_2m an die Schwere Kette dissoziiert Calnexin wohl von den meisten MHC-Klasse-I Allelen (Nöbner und Parham, 1995). Es ist anzunehmen, daß die monoglykosylierte Schwere Kette schon ein Substrat für Calretikulin darstellt, die von β_2m induzierte Konformation der Schwere Kette jedoch die Assoziation mit Calretikulin stärkt (Rodan et al., 1996). Denkbar ist, daß Calnexin sich wegen sterisch ungünstiger Bedingungen aufgrund seiner Membranverankerung von humanem HC löst, wenn β_2m gebunden wird. Substratvergleiche zwischen den Wildtypformen und löslich exprimiertem Calnexin oder membranverankertem Calretikulin stärken diese Vermutung (Danilczyk et al., 2000; Wada et al., 1995). Die fortbestehende Assoziation von Calnexin mit murinem MHC-Molekülen sollte durch das Vorhandensein eines zweiten, freiliegenden Zuckerrests an Position 176 bedingt sein (Hebert et al., 1997). Wie Zhang und Salter tatsächlich zeigen konnten, ist eine verstärkte Bindung von Calnexin an ein an Position 176 glykosilierbares HLA-A2-Molekül zu finden (Zhang und Salter, 1998).

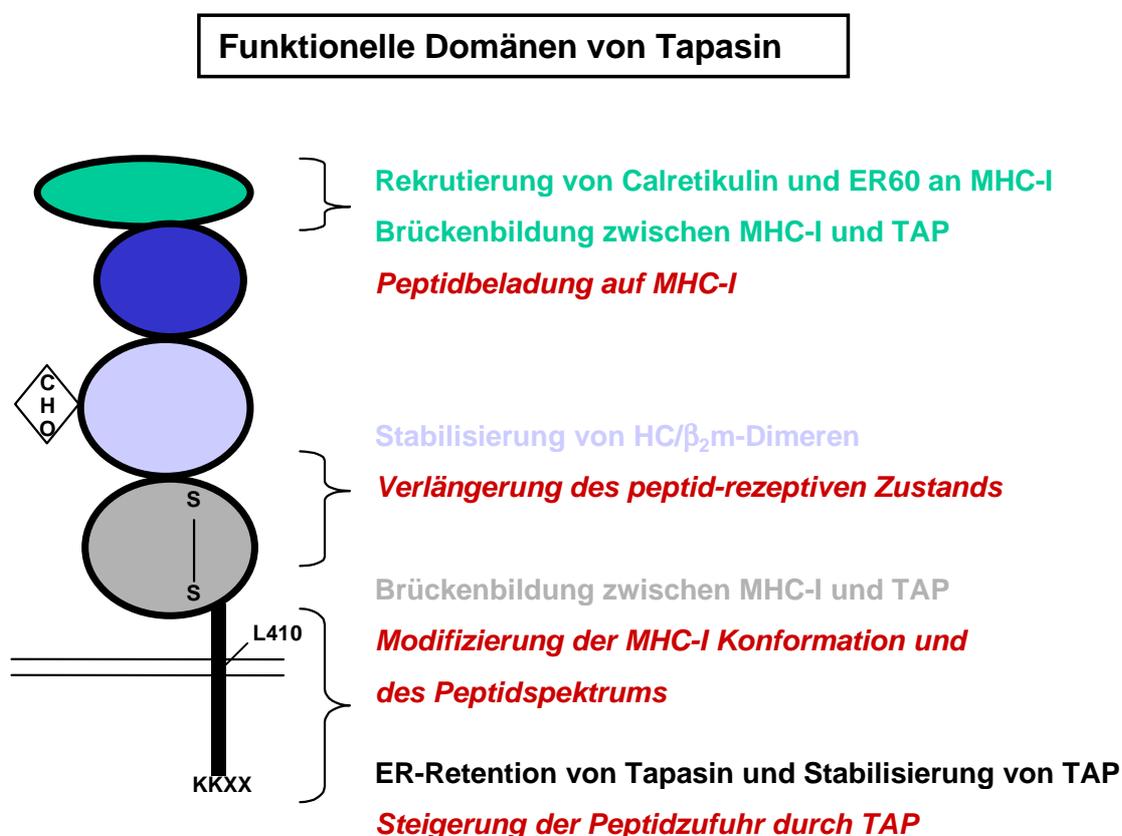


Abb.44: Funktionelle Domänen Tapasins (freundlicherweise überlassen von Dr. F. Momburg)

Tapasin als Chaperon für HC/ β_2 m

Nach der Assoziation von β_2 m mit der Schwere Kette hat das MHC-Klasse-I-Molekül seine peptidrezeptive Konformation eingenommen. Die initiale Peptidbindung an ein MHC-Molekül ist vermutlich desto erfolgreicher je länger die Halbwertszeit des peptidrezeptiven Zustands ist. Tapasin könnte als Chaperon agieren, das dazu beiträgt, peptidleere HC/ β_2 m-Dimere so zu stabilisieren, daß die Lebensdauer dieser Konformation von MHC-Molekülen verlängert wird.

Aus den Daten von Grandea und Kollegen kann man schließen, daß HC/ β_2 m-Dimere bei Abwesenheit von Tapasin tatsächlich relativ instabil sind (Granda et al., 1995 und 1998). Wir fanden, daß Tapasin neben der Erhöhung der Peptidzufuhr auch eine direkte Chaperonwirkung auf HC/ β_2 m-Dimere ausübt. Die β_2 m-assoziierte HC-Konformation wird durch Tapasin bei Abwesenheit von Peptid im ER in schwachem aber sichtbarem Maße stabilisiert (siehe 5.3.1). Aus weiteren Untersuchungen schließen wir, daß Tapasin die stabilisierende Wirkung auf HC-Moleküle über seine Immunoglobulin-ähnliche Domäne ausübt (siehe 5.3.2). Auch Suh und Kollegen konnten bereits zeigen, daß die Immunoglobulin-ähnliche α_3 -Domäne der Schwere Kette von Maus-Klasse-I-Molekülen mit Tapasin in Kontakt tritt (Suh et al., 1999). Aus unseren Beobachtungen ist zu folgern, daß beide Moleküle über ihre Ig-ähnlichen Domänen miteinander interagieren, die Bindung jedoch wahrscheinlich durch den N-terminalen Bereich verstärkt wird. In der Tat wird aus den Daten von Bangia und Kollegen deutlich, daß der N-Terminus von Tapasin die Bindungsstärke zum MHC-Molekül deutlich beeinflusst (Bangia et al., 1999). Sie konnten zeigen, daß die Interaktion zwischen N-terminal deletiertem Tapasin und dem MHC-Molekül sehr schwach ist. In diesem Fall wurde zudem keine Assoziation zwischen Calretikulin und dem MHC-Molekül detektiert.

Möglicherweise ist eine kooperative Bindung von Calretikulin und Tapasin notwendig, um MHC-Moleküle optimal zu stabilisieren. Tapasin wird in der N-terminalen Domäne nicht glykosyliert, was gegen eine direkte Interaktion von Calretikulin mit Tapasin spricht. Da Calretikulin bevorzugt mit der HC/ β_2 m-Form von MHC-Molekülen assoziiert und Tapasin gerade das Entstehen dieser Konformation unterstützt, besteht wahrscheinlich eine indirekte Interaktion zwischen Tapasin und Calretikulin. Möglicherweise ist die Stabilisierung von HLA-B44-Molekülen durch Δ C-Tapasin-Konstrukte so schwach, daß die Calretikulin-Bindung nicht signifikant induziert wird

(siehe 5.4.1). Lehner und Kollegen konnten die Schwere Kette von HLA-B8 und Δ C35-Tapasin erst nach Verwendung eines Crosslinkers mit β_2m kopräzipitieren (Lehner et al., 1998). Auch die ER-Retention von löslichem Tapasin in der Δ C53_{KDEL}-Transfektante konnte die Assoziation mit dem HLA-B44-Molekül und Calretikulin nicht verbessern (siehe 5.4.1).

Man kann spekulieren, daß die peptidrezeptive Konformation des MHC-Moleküls durch Tapasin so stabilisiert wird, daß die Peptidbindung insbesondere bei sehr geringen Peptidkonzentrationen gesichert ist. Aus diesem Grund ist möglicherweise auch die Beschreibung einer direkten Chaperonfunktion Tapasins relativ schwierig, da die Wirkung auf TAP bereits über eine erhöhte Peptidzufuhr zur Stabilisierung des MHC-Moleküls führt.

Tapasin als Chaperon für TAP

Die durch Tapasin induzierte Erhöhung der TAP-Menge führt zu einer gesteigerten Peptidzufuhr ins ER (siehe 5.2.2). Es ist möglich, daß Tapasin auf diese Weise die Peptidzufuhr zu bestimmten MHC-Klasse-I-Allelen sicherstellt, die bei der Peptidbindung anspruchsvoller sind oder deren Peptidsubstrate im zellulären Gesamtpool eher unterrepräsentiert werden.

Diese Eigenschaften treffen wahrscheinlich nicht für HLA-B8 und HLA-B44 zu. Die im ER von .220-Zellen vorhandene Peptidmenge ist offensichtlich kein Faktor, der die Höhe der Plasmamembranexpression von HLA-B8 und HLA-B*4402 limitiert. Die löslichen Tapasin-Konstrukte sind nicht in der Lage, die Menge an luminalem Peptid zu steigern, die Anzahl zelloberflächenexprimierter MHC-Moleküle erhöht sich jedoch wie auf den hTpn-FL-Transfektanten (siehe 5.2.2 und 5.5.1). Auch bei der L410F-Transfektante zeigen sich trotz einer weiteraus schwächeren TAP-Expression gegenüber FL-hTpn keine quantitativen Unterschiede in der MHC-Oberflächenmenge.

Andere Gruppe konnten beobachten, daß die Expressionsraten von HLA-B27, HLA-A2 und H2-K^b auf .220-Zellen auch nach einer Steigerung der TAP-Menge durch Tapasin unverändert bleiben (Peh et al., 1998; Barnden et al., 2000). Dennoch kann der Transport mancher MHC-Allele zur Plasmamembran alleine durch die Höhe der Peptidzufuhr beeinflusst werden. Die HLA-C-Expression läßt sich durch die N-terminale

und Ig-Mutante von Tapasin steigern, indem die Menge an exprimiertem TAP deutlich erhöht wird (siehe 5.5.1 und 5.2.1). Die Interaktion mit dem MHC-Klasse-I-Molekül hingegen dürfte äußerst schwach sein (s.o.). Das HLA-C-Allel wurde als relativ anspruchsvoll bei der Bindung von Peptiden beschrieben und benötigt deutlich größere Mengen an Peptid, um den Oberflächentransport anzutreten. HLA-C akkumuliert auffällig stark am TAP-Transporter, was für andere MHC-Allele bei einer zu geringeren Peptidzufuhr auch zu beobachten ist (Neisig et al., 1998). Suh und Kollegen konnten zeigen, daß sich bei Verwendung des Proteaseinhibitors LLnL (und damit einer begrenzten Peptidsubstratgenerierung) Klasse-I-Moleküle an TAP anreichern und erst die exogene Peptidzugabe die Ablösung aus dem Beladungskomplex induziert (Suh et al., 1994). Auch Knittler und Kollegen fanden eine erhöhte Bindung der RT1-A^a-Form von Ratten MHC-Klasse-I-Molekülen an TAP-B, das die Peptidzufuhr zu diesem Allel nicht gewährleistet (Knittler et al., 1998).

Ist die Peptidzufuhr zum MHC-Klasse-I-Molekül relativ gering, tritt demnach eine weitere Funktion von Tapasin in den Vordergrund. Tapasin sorgt in diesem Fall für eine Bindung des MHC-Moleküls an TAP. Diese Assemblierung geschieht in .220-Zellen nur, wenn humanes Tapasin voller Länge exprimiert ist. Maus-Tapasin ist nicht in der Lage, eine Brücke zwischen dem MHC-Molekül und TAP zu bilden (siehe 5.4.1 und 5.4.2). Anhand der vorliegenden Arbeit läßt sich schließen, daß erst diese Brückenbildung die Peptidbeladung auf MHC-Moleküle optimiert, wohingegen eine Erhöhung der Peptidzufuhr allein nicht ausreicht. Maus-Tapasin ist in der Lage, die TAP-Expressionsraten wie humanes Tapasin zu erhöhen, kann jedoch keine ähnlich stabilen und langlebigen MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche induzieren (siehe 5.2.1).

In diesem Zusammenhang sind auch die Beobachtungen von Copeman und Kollegen interessant, die sowohl in Daudi-Zellen als auch in Jestholm-Zellen eine natürlich auftretende Spleißvariante von Tapasin finden konnten, die eine N-terminale Verkürzung von 50 Aminosäuren aufweist (Copeman et al., 1998). Es ist anzunehmen, daß diese Tapasinform den Peptidtransport erhöhen kann, ohne direkten Einfluß auf die Qualität der Peptidbeladung zu nehmen. Unter welchen Voraussetzungen diese Tapasin-Spleißform induziert wird und welche Konsequenzen sich bei der Peptidpräsentation ergeben, sind interessante Fragen, die in der Zukunft geklärt werden sollten.

Es ist zu schließen, daß die Oberflächenexpression von Klasse-I-Molekülen einerseits von der Menge an ER-luminalem Peptid und andererseits von der Halbwertszeit und Anzahl peptidrezeptiver MHC-Klasse-I-Moleküle bestimmt wird. Steht wenig Peptid zur Verfügung, ist es sinnvoll, wenn ein MHC-Molekül im ER möglichst lange in seiner peptidrezeptiven Konformation vorliegt. Umgekehrt würde eine Erhöhung der Peptidzufuhr auch eine Peptidbeladung auf MHC-Moleküle erlauben, die nur relativ kurz in ihrer peptidrezeptiven HC/ β_2m -Konformation bestehen können.

Die Bindung des MHC-Klasse-I-Moleküls zu TAP wirkt sich auf zwei Arten positiv aus. Einerseits dürfte sich durch die räumliche Nähe zu TAP die lokale Peptidkonzentration am MHC-Molekül erhöhen und eine Beladung wahrscheinlicher machen. Andererseits zeigen unsere Versuche mit der TAP-defizienten Zelllinie T2, daß die Gesamtstabilität des HC-Tapasin-ER60-Calretikulins-Komplexes damit wohl auch der peptidrezeptiven Form des MHC-Klasse-I-Moleküls bei Abwesenheit von TAP deutlich vermindert ist (siehe 5.4.2). Diese Beobachtung deutet daraufhin, daß die Peptidbeladung auf MHC-Klasse-I-Moleküle im TAP-assoziierten Beladungskomplex bevorzugt wird. Da Tapasin diese Brückenbildung bewirkt und sowohl auf HC/ β_2m -Dimere als auch auf TAP eine stabilisierende Wirkung ausübt, stellt es in dreifacher Hinsicht sicher, daß die Peptidbeladungsrate in einer Zelle möglichst hoch ist. Desweiteren ist anzunehmen, daß die Beladung auch bei Abwesenheit von Tapasin erfolgen kann, wenn ein MHC-Klasse-I-Allel intrinsisch vergleichsweise stabil ist und genügend Peptid zur Bindung bereitsteht.

Tapasin-unabhängige allelspezifische MHC-Klasse-I-Expression: Eine mögliche Rolle Calretikulins

Die Expression bestimmter MHC-Klasse-I-Allele wird durch die Abwesenheit von Tapasin in unterschiedlichem Maße beeinträchtigt (Greenwood et al., 1994; Peh et al., 1998; Lewis et al., 1998; Barnden et al., 2000). Es stellt sich die Frage nach der Ursache, warum HLA-B27, HLA-A2 und H-2K^b bereits in Abwesenheit von Tapasin auf der Plasmamembran von .220-Zellen zu finden sind, dies bei HLA-B44-Molekülen jedoch nur wenig der Fall ist. Andererseits ist H-2K^b auf Zellen von Tapasin-defizienten Mäusen sehr schwach oberflächenexprimiert (Garbi et al., 2000; Grandea et al., 2000).

Da die differentielle Expression der betrachteten Allele durch die Höhe der Peptidzufuhr, wie oben erwähnt, nicht erklärt werden kann, müssen weitere Faktoren existieren, die die Tapasin-unabhängige Reifung bestimmen. Vorstellbar wäre, daß eine intrinsisch hohe Stabilität eines MHC-Klasse-I-Allels die Reifung fördert und/oder eine differentielle Retentionswirkung nur bestimmte MHC-Klasse-I-Allele im ER zurückhält. Bei Abwesenheit von Peptid bestimmt die Assoziationsstärke zwischen HC und β_2m die Stabilität, die wiederum den Export des MHC-Moleküls aus dem ER beeinflussen könnte (Neefjes und Ploegh, 1988; Shields et al., 1999). So könnte ein MHC-Klasse-I-Molekül durch eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur auf 26° C so stabilisiert sein, daß sogar bei Abwesenheit von Peptid der Plasmamembrantransport erfolgt (Ljunggren et al., 1990). Andererseits wäre auch vorstellbar, daß die Qualitätskontrolle und die Retentionsmaschinerie des ER bei dieser Temperatur nicht korrekt funktionieren.

Man kann die Vermutung anstellen, daß die schwache HLA-B44-Oberflächenexpression in Tapasin-negativen Zellen aufgrund des Verlusts von Peptiden auf dem Weg zur Zelloberfläche zustande kommt, was zum Zerfall der HC/ β_2m -Dimere führen könnte. Entscheidend ist jedoch, daß bereits der (durch das Erlangen der Endo-H-resistenten Form abgelesene) ER-Export von HLA-B44 bei Abwesenheit von Tapasin weitaus schwächer war als bei dessen Anwesenheit (siehe 5.6.1). Es kann also eher angenommen werden, daß HLA-B44 z.B. gegenüber HLA-B27 eine geringere intrinsische Stabilität im ER besitzt, die den ER-Export begrenzt.

Unsere Experimente deuten jedoch daraufhin, daß dieser Faktor nicht allein die Maturation von MHC-Molekülen bestimmen kann. Vergleiche zwischen dem Tapasin-unabhängig stärker exprimierten HLA-B8 Allel und HLA-B44 zeigen, daß HLA-B44 auch bei Abwesenheit von Tapasin eine relativ hohe Thermostabilität aufweist (nicht gezeigte Daten). Auffällig war allerdings die extreme Instabilität von H-2K^b in hitzebehandelten Detergenzlysaten von Mauszellen, die mit einer sehr geringen Expression des Moleküls an der Zelloberfläche einhergeht (siehe 5.6.2 und Garbi et al., 2000). Die demgegenüber in .220-Zellen beobachtete Oberflächenexpression von H-2K^b kann durch die besonders effiziente Stabilisierung der murinen Schweren Kette durch humanes β_2m erklärt werden (Shields et al., 1998; Alexander et al., 1989; Barnden et al., 2000; Myers et al., 2000).

Es kann angenommen werden, daß das relativ Tapasin-unabhängige HLA-B27 in seiner peptidrezeptiven Form ungewöhnlich stabil und/oder bei der Peptidwahl

vergleichsweise anspruchslos ist (Benjamin et al., 1991; Urban et al., 1994). Gezeigt wurde schon, daß die Schwere Kette von HLA-B27 auch in Abwesenheit von β_2m an der Zelloberfläche bestimmter Zelllinien auftritt (Allen et al., 1999). Auch Peh und Kollegen konnten in Abwesenheit von Tapasin freie Schwere Ketten auf .220.B27 Zellen detektieren (Peh et al., 1998). HLA-B44 assoziiert im Gegensatz zu HLA-B8 schon in Gegenwart eines ΔN -Konstrukts in .220-Zellen in geringen Mengen mit Calretikulin, weshalb angenommen werden kann, daß HLA-B44 eine höhere Affinität zu Calretikulin als HLA-B8 hat (Bangia et al., 1999; nicht gezeigte eigene Beobachtungen). Die möglicherweise schwächere Assoziation mit dem ER-residenten Calretikulin könnte auch erklären, warum von Lehner und Kollegen (Lehner et al., 1998) in der ΔC -gegenüber der FL-Transfektante ein geringfügig schnellerer ER-Export von HLA-B8 beobachtet wurde, während wir keine Unterschiede in der Reifungsgeschwindigkeit von metabolisch markierten HLA-B*4402-Molekülen in Gegenwart von Wildtyp-hTpn und ΔC -Tapasin feststellen konnten (siehe 5.6.1).

Nimmt man an, daß Calretikulin ein wesentliches Retentionsmolekül für menschliche MHC-Klasse-I-Moleküle im ER ist, werden die differentiellen Expressionsraten verschiedener HLA-A,-B,-C-Allele auf .220-Zellen erklärbar (Greenwood et al., 1994; Peh et al., 1998; Lewis et al., 1998; Barnden et al., 2000). Es ist zu anzunehmen, daß Calretikulin insbesondere an solche MHC-Klasse-I-Allele bindet, die stabil in ihrer HC/ β_2m -Form existieren. Agiert Calretikulin in diesen Fällen als Retentionssignal, kann dies bewirken, daß diese MHC-Allele bei einer fehlenden Bindung von Tapasin im ER zurückgehalten werden. Wäre ein MHC-Molekül, wie dies z.B. bei HLA-B27 oder H-2K^b der Fall sein könnte, jedoch schwach mit Calretikulin assoziiert, könnte diese Retention umgangen werden und der Transport zur Zelloberfläche auch bereits durch suboptimale Peptide bewirkt werden. Tatsächlich präsentieren HLA-B27 und H-2K^b bei Abwesenheit von Tapasin an der Zelloberfläche von .220-Zellen suboptimale Peptide (Barnden et al., 2000; Purcell et al., 2001). Es gibt zudem Hinweise, daß Calretikulin den ER-Export von Maus-MHC-Klasse-I-Molekülen verhindern kann, die mit suboptimalen Peptiden beladen sind (B. Gao, R. Adhikari, K. Nakamura, A. Hill, J. Lewis, R. Knee, M. Michalak und T. Elliott, 2001: "Assembly and antigen presentation function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin"; zur Veröffentlichung eingereicht).

Tapasin-vermittelte ER-Retention von MHC-Molekülen: Die Interaktion mit Calretikulin allein verbessert die Peptidbeladung nicht

Tapasin könnte die Retention von suboptimal beladenen MHC-Klasse-I-Molekülen bewirken, indem es die Assoziation mit Calretikulin verstärkt bzw. teilweise erst ermöglicht. Es ist bekannt, daß der Peptidbeladungsstatus von Klasse-I-Molekülen und deren ER-Export durch die Interaktion mit dem gesamten Beladungskomplex beeinflusst wird. Die T134K-Mutation in der α_2 -Domäne des HLA-A2-Moleküls führt neben einer defekten Bindung an den Calretikulin/Tapasin/TAP-Komplex zu einer erhöhten Dissoziation von HC/ β_2 m-Dimeren im ER und zur Oberflächenexpression peptidleerer MHC-Moleküle (Peace-Brewer et al., 1996; Lewis et al., 1996; Yu et al., 1999). Schoenhals und Kollegen fanden bei Abwesenheit von Tapasin auf der Zelloberfläche von Insektenzellen peptidleere H-2K^b-Moleküle, die nach Transfektion von Tapasin nicht mehr detektierbar waren (Schoenhals et al., 1999). Barnden und Kollegen beschrieben auch in der .220.K^b.hTpn-Transfektante eine Retention von suboptimal beladenen H-2K^b-Molekülen, die streng von Tapasin abhängig ist (Barnden et al., 2000).

In der Tat verstärkt Tapasin die Interaktion zwischen Calretikulin und HC enorm (siehe 5.4.1 sowie Barnden et al., 2000). Wir können aus unseren Ergebnissen jedoch folgern, daß die Tapasin-vermittelte Rekrutierung Calretikulins allein nicht für die Optimierung des Peptidspektrums auf HLA-B*4402- und HLA-B8-Molekülen ausreicht. Maus-Tapasin ist vollständig im ER retiniert und assembliert den Calretikulin-HLA-B*4402-Tapasin-Komplex mit gleicher Effizienz wie humanes Tapasin. Die Interaktion des MHC-Moleküls mit TAP ist jedoch kaum detektierbar, und gleichzeitig wird eine suboptimale Beladung der MHC-Klasse-I-Moleküle deutlich.

Der Bindung von Calretikulin an Klasse-I-Moleküle folgt im Normalfall sehr schnell die Assoziation mit TAP. Die Calretikulin- und TAP-assoziierten Klasse-I-Pools sind nahezu identisch (Sadasivan et al., 1996). Aus diesem Grund ist anzunehmen, daß die eigentliche ER-Retention und Bildung einer optimal peptidrezeptiven Konformation erst durch den TAP-assoziierten Beladungskomplex erfolgt (Day et al., 1995; Owen und Pease, 1999).

Die durch Tapasin optimierte Peptidbeladung führt zur Ausbildung besonderer MHC-Klasse-I-Konformationen

Der Antikörper W6/32 erkennt eine β_2m -abhängige Konformation aller HLA-A,-B und -C-Moleküle, die nicht streng peptidabhängig ist (Parker et al., 1992). Demgegenüber binden die verwendeten supertypspezifischen Antikörper gegen HLA-Bw6- und HLA-Bw4-Epitope an spezielle, teilweise peptidinduzierte, Strukturen. Die unterschiedlichen Zelloberflächenfärbungen von .220-Tapasin-Transfektanten mit den HLA-B44(Bw4)- oder HLA-B8(Bw6)-spezifischen Antikörpern kommen wahrscheinlich durch verschieden starke Ausbildungen bestimmter konformationsabhängiger Epitope zustande (siehe 5.5.2). Es ist zu vermuten, daß die Bindung der verwendeten Antikörper schon durch relativ subtile Konformationsunterschiede in den MHC-Molekülen verändert wird. Neben den als Bw4/Bw6-Determinanten definierten Aminosäuren 74-83 in der α_1 -Domäne des Klasse-I-Moleküls erkennt jeder Antikörper weitere Aminosäuren im Klasse-I-Molekül, deren räumlichen Lage von der Art des gebundenen Peptids unterschiedlich beeinflusst sein wird (Müller et al., 1989). Aus diesem Grund könnten manche Bw4/Bw6-Antikörper gar nicht oder nur sehr schwach in der Lage sein, eine unterschiedliche Peptidbeladung der MHC-Moleküle anzuzeigen, während andere dies tun.

Es ist bekannt, daß die Peptidspezifität sowohl von T-Zell-Rezeptoren als auch von inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren u.a. durch peptidinduzierte Konformationen des MHC-Moleküls bedingt ist (Smith et al., 1997). Unterschiedliche Peptide nehmen über Konformationsänderungen in der α_1 und α_2 -Domäne des MHC-Moleküls Einfluß auf die Bindung des T-Zell-Rezeptors (Rohren et al., 1994; Arnett et al., 1998). Die Art und Lage der Aminosäuren im Bereich des Bw4/Bw6-Epitops in der α_1 -Domäne bestimmter MHC-Allele wirkt sich auf die Bindung des DX9-positiven KIR- und des NKB1-Rezeptors aus (Gumperz et al., 1995; Peruzzi et al., 1996). In einer Studie des HLA-B51 Moleküls mit zwei verschiedenen Peptiden konnte gezeigt werden, daß die Ausbildung des vom Antikörper TÛ109 erkannten Bw4-Epitops nur durch eines von zwei Peptiden induziert wird (Takamiya et al., 1996). Das TÛ109-Epitop ist demnach sicherlich von der Art des gebundenen Peptids beeinflusst. Daß sich durch unterschiedliche Peptide verschiedene MHC-Klasse-I-Konformationen ausbilden, wird durch die Ergebnisse von Kristallstrukturanalysen nicht unterstützt. Allerdings konnten dabei wahrscheinlich nur

Möglicherweise bleiben peptidleere H-2K^b-Dimere auch in Abwesenheit von Tapasin lange genug stabil und finden ausreichende Mengen an Peptidliganden, um den ER-Export zu induzieren. So würde die beobachtete schnellere Maturation von H-2K^b beim Fehlen von Tapasin erklärbar sein (Barnden et al., 2000; Schoenhals et al., 1999). Erfolgt hingegen die Dissoziation bestimmter MHC-Allele in Abwesenheit von Tapasin schneller als die Stabilisierung durch Peptid, wird, wahrscheinlich wie im Fall von HLA-B*4402, eine weitaus geringere Oberflächenexpression gefunden. Tapasin könnte demnach einerseits den Zerfall der peptidrezeptiven Form verlangsamen, was zu einer effizienteren Beladung beitragen würde, andererseits aber auch den "Qualitätsanspruch" an das zu bindende Peptid erhöhen. Es ist außerdem bekannt, daß sich die Bindung von β_2m und Peptid an die Schwere Kette in kooperativer Weise verstärken (Parker et al., 1992; Cook et al., 1996). Es wurde gezeigt, daß verschiedene β_2m -Allele der Maus zur Präsentation unterschiedlicher Peptide führen, d.h. β_2m kann selbst als ein "Peptidselektor" agieren (Pérarnau et al., 1990; Nickerson et al., 1990). Es ist also anzunehmen, daß eine Optimierung der Peptidbeladung auf MHC-Klasse-I-Moleküle auch über die Stärke der chaperonvermittelten Interaktion zwischen HC und β_2m erreicht werden kann.

Bildung des TAP-assoziierten Beladungskomplexes in Abhängigkeit von Tapasin

Eine offene, mit dem Antikörper 60-3-7 detektierbare Form des H-2L^d-Moleküls tritt insbesondere dann auf, wenn das MHC-Klasse-I-Molekül mit dem Tapasin/TAP-Komplex assoziiert ist (Myers et al., 2000). Aus diesem Grund ist zu diskutieren, wie Konformationsänderungen von MHC-Klasse-I-Molekülen im einzelnen durch Komponenten des TAP-assoziierten-Beladungskomplexes beeinflusst werden könnten, um eine optimale Peptidbeladung zu gewährleisten. Unsere Ergebnisse erlauben, bezüglich des molekularen Selektionsmechanismus von Tapasin, der zu einer besseren Peptidbeladung auf MHC-Moleküle führt, Schlußfolgerungen abzuleiten. Die Expression von Maus-Tapasin in .220-Zellen vermittelt die Bildung des Subkomplexes mit dem MHC-Klasse-Molekül und Calretikulिन, wohingegen die Brücke dieses Komplexes zu TAP nur sehr ineffizient gebildet wird (siehe 5.4.1). Auch in der L410F-Transfektante ist

die Formierung des TAP-assoziierten Beladungskomplexes geschwächt, was wie bei der Maus-Tapasin-Transfektante zu einer suboptimalen Peptidbeladung führt. Aus diesen Daten ist zu folgern, daß erst die Tapasin-vermittelte Brückenbildung zwischen dem MHC-Klasse-I-Molekül und TAP die Peptidbeladung optimiert.

Eine Voraussetzung zur erfolgreichen Brückenbildung ist zunächst die Stabilisierung von TAP. Die C-terminalen Verkürzungsstrukture sind gar nicht in der Lage, die Brückenbildung zu vermitteln (siehe 5.4.1 und Lehner et al., 1998). Die L410F-Transfektante erhöht die TAP-Expression nur zu 20-30%, was ebenfalls dazu führt, daß nur wenig TAP zur Verfügung steht, um einen anscheinend unvermindert assemblierenden Prä-Komplex (MHC-Klasse-I-Molekül/Calretikulin/Tapasin) in den Beladungskomplex zu integrieren (siehe 5.4.1 und 5.4.2).

Es ist auffällig, daß der N-terminale Bereich Tapasins absolut notwendig für die

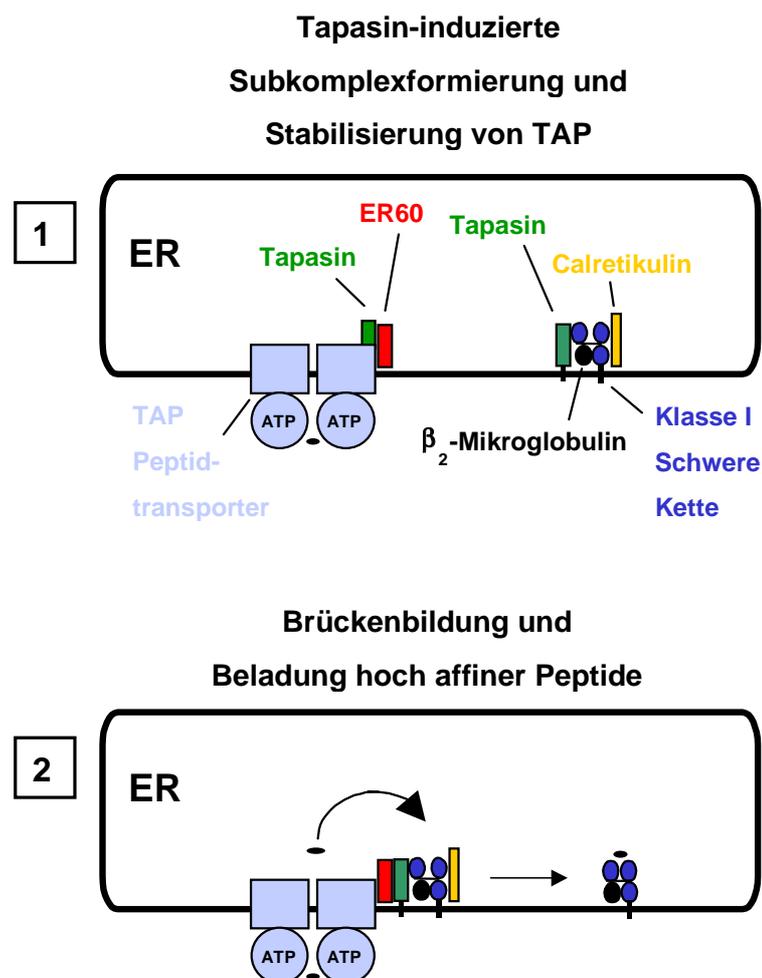


Abb.45: Funktionsweise von Tapasin bei der Peptidbeladung auf MHC-Klasse-I-Moleküle (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. F.Momburg)

Interaktion von Calretikulin mit dem Klasse-I-Molekül ist (Bangia et al., 1999). N-terminal deletierte Tapasin-Konstrukte sind gleichzeitig nicht in der Lage, das MHC-Molekül an TAP zu binden. Allerdings ist die Rekrutierung von Calretikulin an MHC-Klasse-I-Moleküle allein nicht ausreichend, um die Assemblierung mit TAP sicherzustellen (siehe oben). Maus-Tapasin und die L410F-Mutante vermitteln die Interaktion Calretikulins mit HLA-B44, bilden jedoch keine deutliche Brücke zu TAP (siehe 5.4.1). Der N-Terminus von Tapasin scheint die entscheidende Rolle bei der Assemblierung des vollständigen Beladungskomplexes in .220-Zellen zu spielen. Die Experimente deuten an, daß die Qualität der gebundenen Peptide auf dem Maus-Mensch-Hybrid-Konstrukt nicht so hoch ist wie bei humanem Tapasin (siehe 5.5.2 und 5.6.4). Man kann die Hypothese aufstellen, daß Calretikulin durch den N-Terminus von Maus-Tapasin zwar bei der initialen Bindung an HLA-Moleküle unterstützt wird, jedoch anschließend eine für die stabile Bindung an TAP notwendige Konformationsänderung Calretikulins nicht geschieht. Auffällig war, daß sich im Fall der Maus-Tapasin-Transfektante eine TAP- sowie ER60-assoziierte, im Gel langsamer laufende zusätzliche Isoform von Calretikulin etwas schwächer ausbildete als in Gegenwart von Human-Tapasin (siehe 5.4.2). Die molekularen Unterschiede zwischen diesen SDS-PAGE-Isoformen von Calretikulin, die sich im Western Blot sowohl mit dem Kaninchen-anti-Calretikulin-Antiserum wie mit dem monoklonalen Maus-anti-Calretikulin-Antikörper nachweisen ließen, konnten wir bislang nicht ermitteln.

Ein weiterer Unterschied bestand in der Interaktion zwischen Maus-Tapasin, ER60 und TAP, die quantitativ stärker ausgeprägt war als im Fall von humanem Tapasin. Die mangelnde Rekrutierung des HC-Calretikulin-Komplexes an TAP in Gegenwart von Maus-Tapasin könnte damit zu tun haben, daß in diesem Fall der Austausch von Calnexin durch Calretikulin in einem vor-assemblierten TAP/Tapasin/Calnexin-Komplex insuffizient ist, während ein solcher Austausch durch Human-Tapasin effizient vermittelt wird (Diedrich et al., 2001). Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß im mTpn-TAP-Komplex unter Gleichgewichtsbedingungen mehr Calnexin gebunden ist als im hTpn-TAP-Komplex (nicht gezeigte, eigene Beobachtungen). Die Ursache hierfür könnte in einer ungewöhnlich hohen Affinität von murinem Tapasin zu humanem Calnexin liegen.

Es besteht also in bezug auf Tapasin offensichtlich eine Speziesinkompatibilität bei der Beladung von HLA-B44-Molekülen. Die Gruppe um McCluskey fand in J26-Zellen, mit

Human- β_2m transfizierten murinen Fibroblastenlinie, nach Transfektion von HLA-B44 keine Oberflächenexpression (Peh et al., 1998 und 2000). In J26-Zellen schien die Bindung von HLA-B44 an TAP ungewöhnlich langlebig zu sein, was die Defekte in der Oberflächenexpression hier in Verbindung mit einer eher zu langen oder starken Interaktion der Moleküle an TAP bringt. Der Expressionsdefekt von HLA-B*4402 in J26-Zellen ließ sich allerdings durch transfiziertes Human-Tapasin aufheben. In diesem Zusammenhang erscheint es möglich, daß HLA-transgene Mäuse, die als Modellsysteme für HLA-Klasse-I-restringierte Immunantworten dienen sollen, wegen einer abnormalen Interaktion von menschlichen MHC-Klasse-I-Molekülen mit murinem Tapasin teilweise irrelevante Ergebnisse liefern könnten.

Eine Tapasin-vermittelte Rekrutierung von ER60 an TAP könnte für die Bildung der Brücke zwischen dem MHC-Molekül und TAP ebenfalls von Bedeutung sein. Die Bindung von ER60 an das L410F-Konstrukt ist allerdings noch relativ gut, was auch zusammen mit den Daten aus T2-Zellen dafür spricht, daß die ER60-Assoziation mit Tapasin nicht vollkommen TAP-abhängig ist (siehe 5.4.2). Die Rekrutierung von ER60 an TAP scheint die Membranverankerung Tapasins vorauszusetzen, da bei dem ΔC -Konstrukt keine verstärkte Interaktion von ER60 mit Tapasin/TAP zu finden ist (siehe 5.4.2). Man kann vermuten, daß sich transient ein gemischtes Disulfid bildet, indem ER60 über einen freien Cysteinrest im N-Terminus an Tapasin bindet. Die N-terminale Domäne von Tapasin ist in jedem Fall für die Interaktion zwischen Tapasin und ER60 essentiell (Bangia et al., 1999).

Die kleinste, stöchiometrische Einheit des TAP-assoziierten Beladungskomplexes wurde von Ortmann und Kollegen als Komplex aus einem TAP1-Molekül, einem TAP2-Molekül, vier Tapasin-Molekülen, vier HC-Molekülen, sowie durchschnittlich zwei oder drei Calretikulin-Molekülen und einem Calnexin-Molekül definiert (Ortmann et al., 1997). Diese im Gleichgewicht gefundene Assemblierungseinheit läßt sich durch verschiedene Modellannahmen mit unseren Daten vereinbaren. Jedes MHC-Klasse-I-Molekül im liegt im TAP-Komplex wohl mit einem Tapasin-Molekül assoziiert vor. Von uns konnte an TAP assoziiertes murines Tapasin isoliert werden, ohne daß stöchiometrische Mengen an HLA-B44 gebunden waren. Dieser TAP-Tapasin Subkomplex entsteht demnach unabhängig von Klasse-I-Schwerkette und Calretikulin, wie dies auch von Diedrich et al. (2001) vor kurzem beschrieben wurde. Mit TAP "vor"-assoziiertes Tapasin und Calnexin muß wahrscheinlich wieder dissoziieren, um den Eintritt von HC/ β_2m in den TAP-

Komplex zu ermöglichen. Auf solche dynamischen Austauschprozesse deutet auch die von Ortmann und Kollegen nicht genau definierte Anzahl an Calretikulin- und Calnexin-Molekülen im TAP-Beladungskomplex hin (Ortmann et al., 1997). Es also kann angenommen werden, daß die Integration von bis zu vier HC/ β_2 m-Tapasin-Calretikulin-Subkomplexen in den TAP-Komplex zum sukzessiven Austausch von Calretikulin gegen Calnexin führt. Bei der Maus-Tapasin-Transfektante konnte bei fehlender Interaktion des Klasse-I-Moleküls mit TAP mehr Calnexin an TAP detektiert werden als im vollständigen TAP-assoziierten Beladungskomplex bei der humanen Tapasin-Transfektante (nicht gezeigte, eigene Beobachtungen). Wie oben erwähnt, scheint ein TAP/ER60/mTpn-Subkomplex zudem stärker ausgeprägt (= stabiler) zu sein als in Gegenwart von hTpn (siehe 5.4.2). Diese noch vorläufigen Daten deuten daraufhin, daß bei der Bindung des MHC-Klasse-I-Moleküls an TAP bestimmte Re-Assemblierungen mehrerer Komponenten des Beladungskomplexes erfolgen. Die Anwesenheit von Tapasin ist offensichtlich ein wichtiger Faktor, der die dynamischen Umdichtungsvorgänge fördert und so die korrekte Assemblierung des Peptid-beladungskomplexes an TAP gewährleistet.

In Tabelle 1 sind die wichtigsten Eigenschaften der untersuchten Tapasin-Konstrukte aufgelistet.

| Tapasin-Konstrukt Effekt | hTpn FL | hTpn Δ C | mTpn FL | L410F | hTpn Δ N/ Δ Ig |
|---|------------|-----------------|------------|------------|------------------------------|
| TAP-Stabilisierung | XXX | - | XXX | X | XX |
| ER60-Bindung an TAP | XXX | - | XXX | X | n. erm. |
| Tpn im Komplex mit HC/ β_2 m/CRT | XXX | X | XXX | XXX | */n. erm. |
| Brücke zwischen HC und TAP | XXX | - | - | X | - |

Tabelle 1: Funktionelle Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Tapasin-Konstrukte (* = Bangia et al., 1999).