

5. Ergebnisse

5.1 Generierung von 721.220.Tapasin-Transfektanten

Aus der cDNA von humanem Tapasin wurden in mehreren Klonierungsschritten (siehe Material und Methoden) folgende Mutationskonstrukte hergestellt:

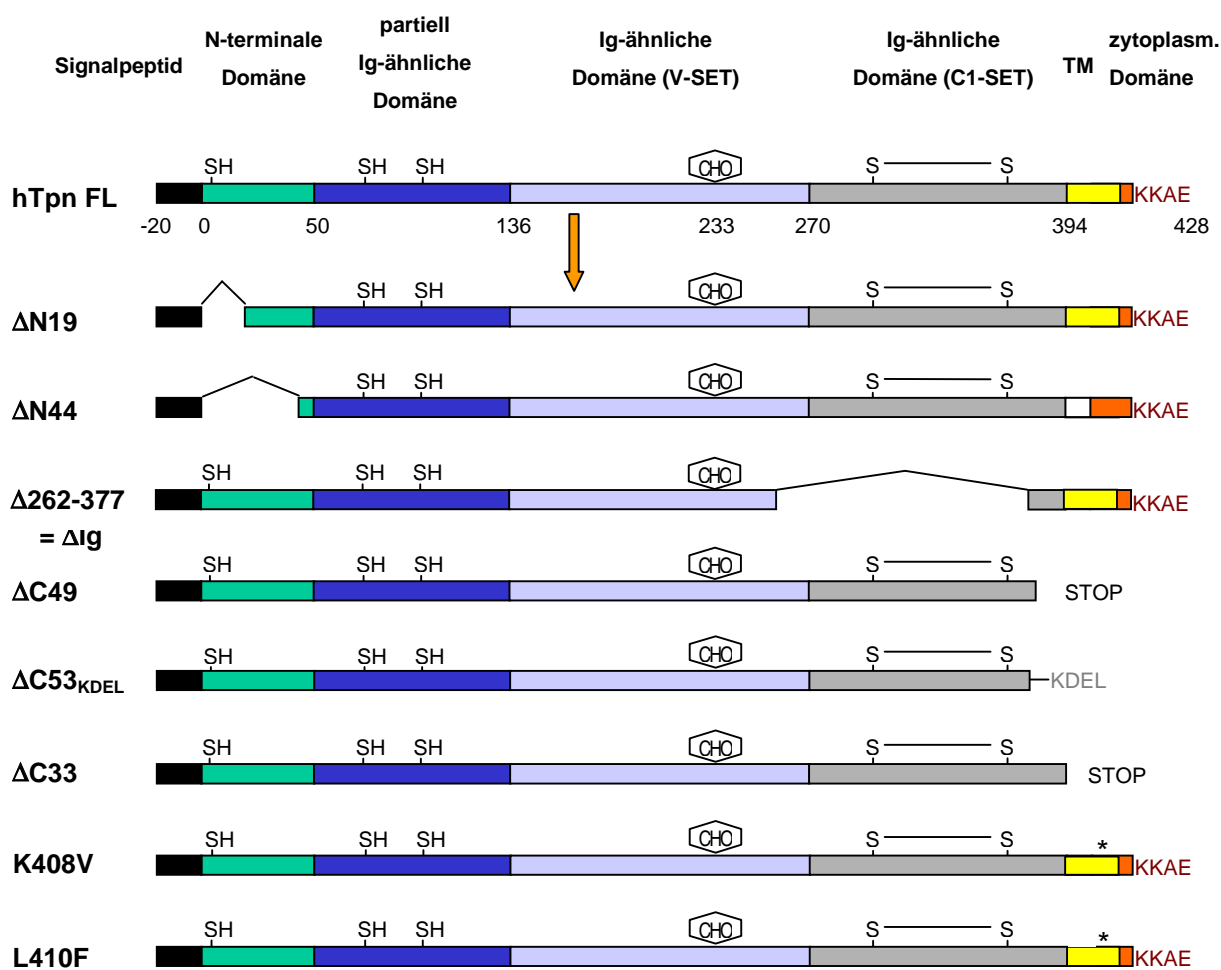


Abb.14: Domäneneinteilung der Tapasin-Konstrukte.

Unter der schematischen Darstellung der cDNA von humanem Tapasin sind die Positionen von Aminosäuren der reifen Form angegeben. TM: Transmembrandomäne, CHO: Glykosylierung, KKAE/KDEL: putative ER-Retentionssignale, SH: Cysteinreste (intramolekulare Disulfidbrücken sind unbekannt), S-S: putative Cysteinbrücken, *Punktmutation. Das Konstrukt $\Delta 262-377$ wird im folgenden als ΔIg und das Konstrukt $\Delta C53_{KDEL}$ als KDEL bezeichnet.

Aus der cDNA von humanem und murinem Tapasin wurde ein Hybridkonstrukt ($m_{149}hTpn$) generiert, das aus murinem Tapasin am Aminoterminus und humanem Tapasin am Carboxyterminus zusammengesetzt ist.

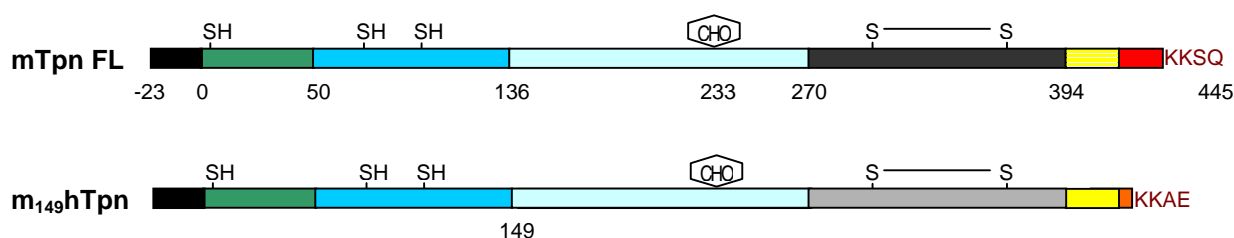


Abb.15: Murines Tapasin und Hybridkonstrukt aus murinem Tapasin am Aminoterminus und humanen Tapasinsequenzen am Carboxyterminus. Unter der cDNA von murinem Tapasin sind die Aminosäurereste der reifen Form angegeben. KKSQ: putatives ER-Retentionssignal

Alle Konstrukte wurden in den eukaryontischen Expressionsvektor pREP4 kloniert und die drei Tapasin-defizienten Zelllinien B-LCL 721.220, 721.220.B8 und 721.220.B44 mittels Elektroporation transfiziert (siehe Material und Methoden).

5.1.1 Expression von Tapasin-Mutanten in B-LCL721.220-Zellen

Die Expression der Tapasin-Mutanten in .220, .220.B8 und .220.B44-Zellen wurde durch Western Blotting kontrolliert (Abb.16A-C). Alle stabil exprimierten Konstrukte zeigten vergleichbare Expressionsniveaus (Maus-Tapasin und die Maus-Mensch-Hybridkonstrukte sind mit dem Kaninchenserum anti-“PAV“ etwas schlechter detektierbar - vgl. .220.B44.mTpn mit anti-Maus-Tapasin-Serum; beim anti-“PAV“-Blot wurde die dreifache Zellmenge verwendet). Eine aufgrund einer unkorrekt gespleißten Tapasin-mRNA in .220-Zellen konstitutiv vorhandene, N-terminal verkürzte Tapasinmutante ($\Delta N50$), konnte nicht detektiert werden (Copeman et al., 1998). Die MHC-Klasse-I Schwereketten werden in den Mutterzelllinien .220 (HLA-Cw1), .220.B8 (HLA-Cw1 und HLA-B8) und .220.B44 (HLA-Cw1 und HLA-B44) im Verhältnis 1:5:7 exprimiert (Abb. 16D).

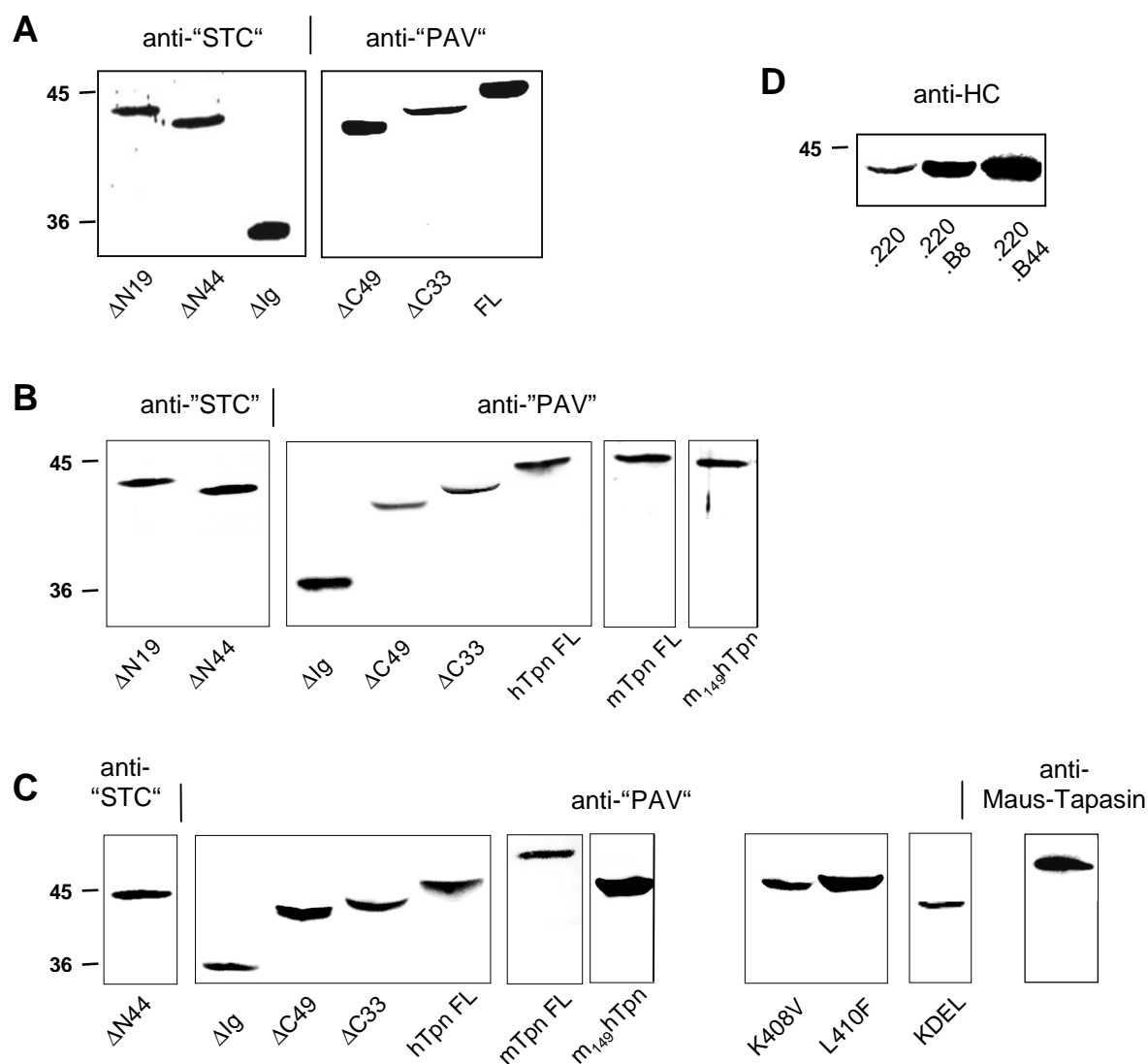


Abb. 16: Expression der Tapasin-Konstrukte in 721.220- (A), 721.220.B8- (B) und 721.220.B44-Zellen (C). Zum Nachweis der N-terminalen Deletions- und teilweise der ΔIg -Konstrukte wurde im Western Blot das anti-Tapasin Serum "STC"- verwendet, für alle anderen Konstrukte das anti-"PAV"-Serum (siehe Material). (D) Der Western Blot mit HC-10 zeigt die Expression von HLA-Cw1, von HLA-Cw1/B8 und von HLA-Cw1/B44 in NP40-Lysaten von 721.220, 721.220.B8 und 721.220.B44-Zellen. Bei allen Proben bis auf die Maus-Tapasin- und Maus-Mensch-Transfektanten im anti-"PAV"-Blot wurden, von denen 3×10^6 Zellen eingesetzt wurden, jeweils 1×10^6 Zelläquivalente aus NP40-Lysaten im SDS-PAGE aufgetrennt.

5.1.2 Zelluläre Lokalisation der Tapasin-Konstrukte

Es ist bekannt, daß ein am Carboxyterminus von Typ-I-Membranproteinen lokalisiertes Dilysinmotiv als ER-Retentionssignal dienen kann (Übersicht in Nilsson und Warren, 1994). Um die Funktionalität dieses Motivs am Tapasinmolekül zu untersuchen, wurde

die Lokalisation des Wildtyp-Proteins und die der Tapasin-Konstrukte, deren Mutationen möglicherweise die ER-Retention beeinflussen, durch Verdau mit Endoglykosidase H und Nachweis im Western Blot bestimmt (Abb.17). Es bestätigte sich die postulierte ER-Lokalisation von humanem und murinem Tapasin; beide zeigten sich vollständig Endoglykosidase H-sensitiv. Durch Deletion der zytoplasmatischen und Transmembrandomäne, wie im Konstrukt $\Delta C33$, verliert Tapasin sein Retentionssignal und wird wegen der Modifikation seiner Zuckerreste durch Golgi-Enzyme als sezerniertes Protein Endoglykosidase H-resistent. Die Addition einer KDEL-Sequenz

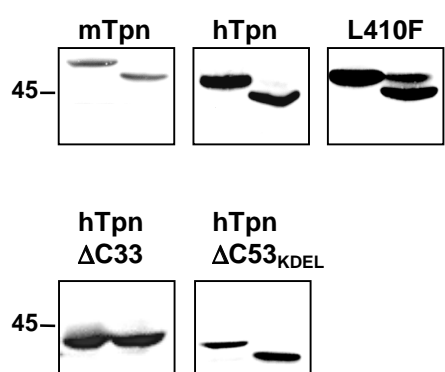


Abb.17: Intrazelluläre Lokalisation von Tapasin-Mutanten. Nach NP40 Lyse von 1×10^6 Zellen wurde jeweils eine Hälfte der Proben über Nacht mit Endoglykosidase H verdaut. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Western Blot mit PAV-Serum wird die Verteilung von Tapasin an der Zelloberfläche (obere, EndoH resistente Bande) oder als ER-Form (untere, Endo H-sensitive Bande) deutlich.

kann diesen Phänotyp wieder umkehren, und die ER-Lokalisation des Konstrukts $\Delta C53_{KDEL}$ wird erreicht. Erstaunlicherweise führt die Substitution des Leucinrestes an Position 410 in der Transmembranregion von menschlichem Tapasin durch einen Phenylalaninrest zur partiellen Aufhebung der ER-Retention. Offensichtlich ist das KKXX-Motif am C-Terminus von humanem Tapasin alleine nicht für eine vollständige ER-Lokalisation ausreichend (siehe Diskussion).

5.2 Der Einfluß von Tapasin auf den Peptidtransport ins ER

Ortmann und Kollegen konnten erstmals zeigen, daß Tapasin mit dem Peptidtransporter TAP interagiert (Ortmann et al., 1994). Diese Beobachtung warf die interessante Frage auf, ob Tapasin die Aktivität von TAP modulieren kann.

Um einer möglicherweise durch Tapasin gesteigerten Peptidtransportaktivität nachzugehen, untersuchten wir die Expression von TAP sowohl in Tapasin-defizienten Mäusen also auch in 721.220 Transfektanten.

5.2.1 Expression des TAP-Peptidtransporters

5.2.1.1 TAP-Expression in Tapasin-defizienten Mäusen

Zum Nachweis einer Chaperon-Funktion von Tapasin auf TAP wurde die TAP-Expression in Zellen von Tapasin^{-/-} Mäusen (Tpn^{-/-}) mit denen aus Tapasin^{+/+} Mäusen (Tpn^{+/+}) verglichen. Im Western Blot konnte zuvor gezeigt werden, daß in den homozygoten Tpn^{-/-} Mäusen kein Tapasinprotein mehr exprimiert wird (Abb.18B).

Aus einer Titration der NP40-Lysate aus ConA-Blasten der Tapasin-defizienten und Tapasin-exprimierenden Mäuse konnte nach Analyse der Bandenintensitäten mittels Lumi-Analyst-Software geschlossen werden, daß die TAP2-Gesamtproteinmenge in Tapasin^{-/-} Mäusen um den Faktor 6-8 vermindert ist (Abb.18A).

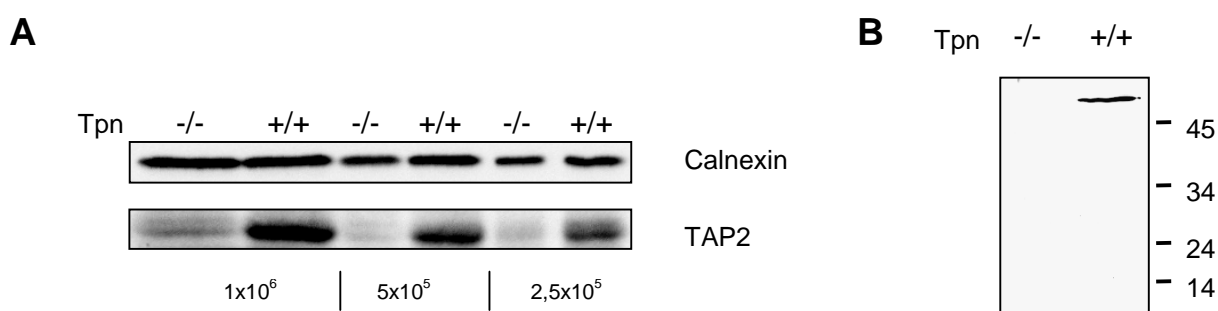


Abb. 18: A) Expression von murinem TAP2 in ConA-Blasten von Tapasin^{+/+}- und Tapasin^{-/-}-Mäusen (Calnexin als Ladekontrolle). Nach ConA-Stimulation von Milzzellen wurden NP-40 Lysate hergestellt, eine Titrationsreihe von 1×10^6 bis $2,5 \times 10^5$ Zelläquivalenten auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und im Western Blot mit Kaninchen anti-mTAP2-Serum oder Kaninchen anti-Calnexin Serum angefärbt. (B) Fehlende Expression von Tapasin in Tapasin^{-/-}-Mäusen, Expression des Proteins in Tapasin^{+/+} Mäusen. Es ist ein Western Blot nach SDS-PAGE Trennung der Proteine aus 1×10^7 Zellen mit dem anti-Tapasin Serum PAV gezeigt (aus Garbi et al., 2000).

5.2.1.2 TAP-Expression in Tapasin-transfizierten 721.220-Zellen

Nach der Beobachtung, daß Tapasin die pro Zelle enthaltene Gesamtmenge von TAP deutlich erhöht, stellte sich die Frage, durch welchen Mechanismus Tapasin die Expression von TAP beeinflusst. Es galt die Vermutung einer posttranslationalen Chaperon-Funktion zu bestätigen. Mittels Deletion bestimmter Domänen von Tapasin

sollte die direkte Interaktionsregion zu TAP untersucht werden. Nach der NP40-Lyse der Tapasin-Transfektanten wurde die TAP-Gesamtexpression in Western Blots mittels Lumi-Analyst-Software analysiert.

Es zeigte sich in drei unabhängigen Experimenten, daß bei Anwesenheit von humanem Tapasin voller Länge eine bis zu 10fach höhere TAP-Menge vorhanden war als in den mit leerem Vektor pREP4 transfizierten, Tapasin-negativen Zellen (Abb.19). Die eingeführten Deletionen am Carboxyterminus führen zum fast vollständigen Verlust dieser Stabilisierungsfunktion von Tapasin, wobei das Δ C49-Konstrukt in .220.B8-Zellen jedoch unerklärlicherweise im abgebildeten Experiment eine gewisse Steigerung der

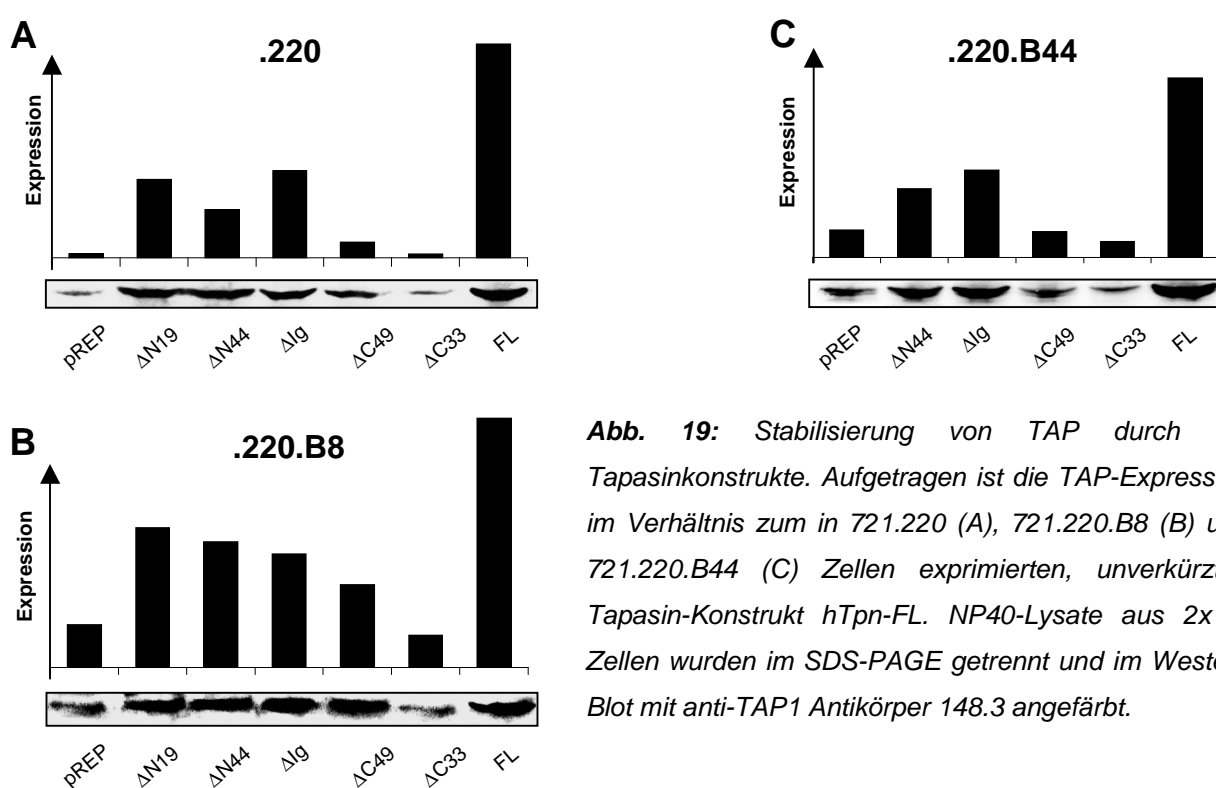


Abb. 19: Stabilisierung von TAP durch die Tapasinkonstrukte. Aufgetragen ist die TAP-Expression im Verhältnis zum in 721.220 (A), 721.220.B8 (B) und 721.220.B44 (C) Zellen exprimierten, unverkürzten Tapasin-Konstrukt hTpn-FL. NP40-Lysate aus 2×10^6 Zellen wurden im SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit anti-TAP1 Antikörper 148.3 angefärbt.

TAP-Menge zeigte. In den Transfektanten mit Δ N- und Δ I9-Konstrukten fanden wir 50-60% derjenigen TAP-Menge, die vom Tapasin-Konstrukt voller Länge induziert wurde. Die Deletionen am N-Terminus oder in der Mitte des Moleküls beeinflussen die Chaperonwirkung von Tapasin auf TAP demnach nur wenig, solange die Transmembranregion von Tapasin erhalten ist. Auch die im N-Terminus der m_{149} hTpn-Transfektante gelegenen Aminosäuren von Maus-Tapasin wirken sich nicht negativ auf die Expression von humanem TAP aus. Das Maus-Mensch-Hybrid m_{149} hTpn steigert die TAP-Expression in .220.B44-Zellen wie menschliches Tapasin (Abb.20). Aus diesen

Beobachtungen kann zusammenfassend geschlossen werden, daß Tapasin seine stabilisierende Funktion auf TAP durch Aminosäuren in seiner Membranregion ausübt.

Eine Punktmutation in der Membrandomäne kann einen erheblichen Einfluß auf die Stabilität von TAP haben. Die Expression von TAP wird durch den einzelnen Austausch von Leucin an Position 410 gegen Phenylalanin auf etwa 20-30% der Menge bei Wildtyp-Tapasin hTpn vermindert (Abb.21).

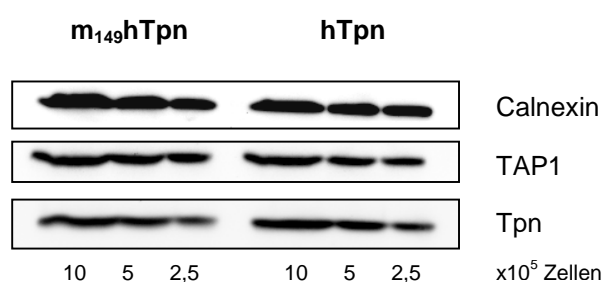


Abb.20: Expression von TAP1 in der 721.220.B44. $m_{149}hTpn$ - und $hTpn$ -FL Transfektante. Es ist eine Titration von NP40 Lysaten gezeigt. Nach SDS-PAGE Auftrennung wurden Western Blots mit dem anti-Tapasin Serum "STC", dem anti-TAP1 mAk 148.3 und dem Kaninchen anti-Calnexin Serum durchgeführt.

Maus-Tapasin weist im Bereich der Membran große Sequenzhomologien mit dem humanen Protein auf, besitzt jedoch eine wenig homologe, um 14 Aminosäuren längere zytoplasmatische Region. Es wurde bei der Analyse der TAP-Expression deutlich, daß sich die stabilisierende Wirkung von Maus-Tapasin nicht von der durch humanes Tapasin induzierten unterscheidet. Der längere zytoplasmatische Bereich von Maus-Tapasin beeinflusst die TAP-Expression demnach nicht (Abb. 21).

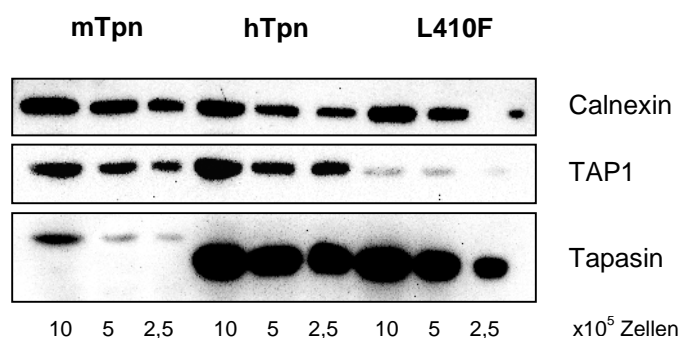


Abb.21: Expression von TAP1 in 721.220.B44.mTpn-FL, .hTpn-FL und .L410F-Transfektanten. Es ist die Titration von NP40 Lysaten aus 1×10^6 , 5×10^6 und $2,5 \times 10^5$ Zellen gezeigt. Nach SDS-PAGE Trennung wurde ein Western Blot mit dem anti-Tapasin Serum "PAV", dem anti-TAP1 mAk 148.3 und dem Kaninchen anti-Calnexin Serum durchgeführt.

5.3 Tapasin als Chaperon für HC/ β_2m Dimere

5.3.1 Thermostabilität von MHC-Klasse-I-Molekülen

MHC-Klasse-I-Moleküle zeigen die höchste Thermostabilität und sind am langlebigsten, wenn sie nach der Peptidbindung als trimerer Komplex vorliegen. Da Granda und Kollegen eine verminderte Stabilität verschiedener HLA-Moleküle bei Abwesenheit von Tapasin beschrieben, läßt sich vermuten, daß Tapasin zur Verbesserung der Peptidbindung an das MHC-Molekül beiträgt (Granda et al., 1995 und 1997). Diese Funktion könnte Tapasin bei Abwesenheit von Peptid durch eine Chaperon-Funktion ausüben, indem es die peptidrezeptive HC/ β_2m -Form des MHC-Moleküls stabilisiert und so die Zeitspanne für eine mögliche Peptidbindung verlängert. Durch den Einsatz des

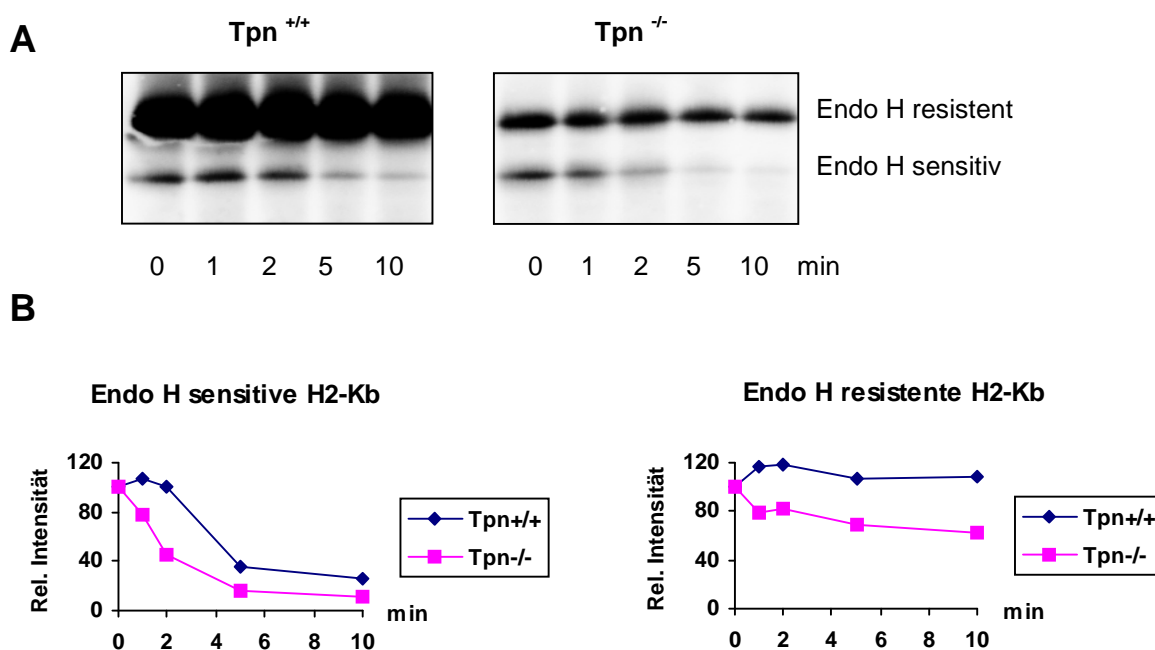


Abb. 24: Thermostabilität von H-2K^b Molekülen im Detergenzlysate in Abhängigkeit von Tapasin. (A) Western Blots mit anti-P8 Serum. (B) Auswertung der Bandenintensitäten durch Lumi-Analyst-Software. Nach einer Inkubation mit 100 μ M Lactacystin für 2h bei 37°C von ConA-Blasten aus Tapasin^{-/-}- oder Tapasin^{+/+}-Mäusen wurden NP40-Lysate in Aliquots von je 5x10⁶ Zelläquivalenten geteilt und für die angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert. Der Präzipitation der verbleibenden HC/ β_2m -Menge mit dem konformationsspezifischen Antikörper Y3 folgte über Nacht der Verdauung mit Endoglykosidase H. Mittels SDS-PAGE aufgetrennte HC-Banden wurden nach einem Western Blot mit einem Kaninchen-Antiserum gegen die zytoplasmatische Domäne von H-2K^b (anti-P8) detektiert.

Proteasomeninhibitors Lactacystin wurde die Peptidgenerierung im Zytosol und damit die Peptidzufuhr zum MHC-Klasse-I-Molekül unterbunden und unter diesen Bedingungen die Stärke der Assoziation von Schwerer Kette und β_2m in ConA-stimulierten Blasten von Tapasin^{-/-}- und Tapasin^{+/+}-Mäusen analysiert.

Bei Abwesenheit von Tapasin verminderte sich die Thermostabilität der ER-residenten, Endo H sensitiven HC- β_2m Form im Detergenzlysat von einer Halbwertszeit von ca. 4 Minuten hin zu ca. 1,5 Minuten (Abb.24). Tapasin übte unter diesen Bedingungen einen geringen, aber sichtbaren Stabilisierungseffekt auf die HC/ β_2m -Konformation von MHC-Klasse-I-Molekülen aus, der hier nicht infolge der durch Tapasin induzierten Erhöhung der TAP-vermittelten Peptidzufuhr zustande kommen kann. Betrachtet man die Thermostabilität der EndoH-resistenten Zelloberflächenmoleküle, die wegen der ER-Retention von Tapasin nicht mehr unter der Chaperonwirkung von Tapasin stehen können, ist ebenfalls eine erhöhte Dissoziation von Schwerer Kette und β_2m aus Tapasin-negativen Zellen zu finden, die unter 5.6.2 näher betrachtet wird.

5.3.2 Stabilisierung des MHC-Klasse-I-Moleküls durch die Immunoglobulin-Domäne von Tapasin

Nachdem eine schwache Chaperonwirkung von Tapasin auf das MHC-Klasse-I-Molekül nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, welche Domäne von Tapasin diese Funktion ausübt und ob sie unabhängig von anderen Regionen im Molekül agieren kann. Suh und Kollegen konnten bereits zeigen, daß die Immunoglobulin-ähnliche α_3 -Domäne der Schwere Kette von Maus-Klasse-I-Molekülen in Kontakt mit Tapasin tritt (Suh et al., 1999). Betrachtet man die Domänenstruktur von Tapasin, kommt man zu dem Schluß, daß dessen Ig-Domäne die Interaktion mit dem MHC-Molekül vermitteln könnte. Fraglich war dabei, ob tatsächlich diese Domäne Tapasins mit der Schwere Kette und/oder β_2m interagiert und so zu einer Stabilisierung des Klasse-I-Moleküls führen kann. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen der Deletion am N-Terminus und in der Ig-Domäne von Tapasin auf die Expression der Schwere Kette und β_2m untersucht. Um den Einfluß der Bindung von Peptid auf die Stabilität der Klasse-I-Moleküle bei den Experimenten auszuschließen, wurden nur

solche Tapasin-Mutanten untersucht, die die Peptidbeladung, wie später beschrieben (siehe 5.5), nicht fördern ($\Delta N44$ und ΔIg).

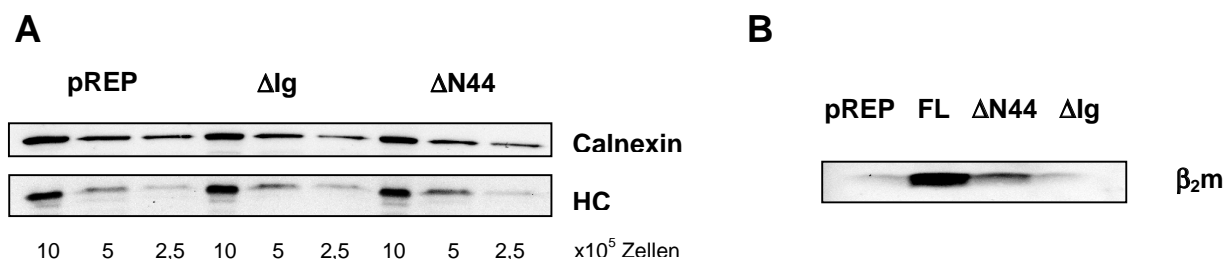


Abb.25: (A) Stabilisierung der MHC Klasse-I-Schwerkette in .220.B44 Transfektanten. NP40 Lysate wurden nach einer Titration durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Schwerkette durch Western Blot mit dem Antikörper HC-10 nachgewiesen. (B) Stabilisierung von β_2m in .220.B44-Transfektanten. Es wurde β_2m aus NP40 Lysaten von 1×10^6 Zellen nach SDS-PAGE-Auftrennung im Western Blot mit dem anti- β_2m Antikörper BBM.1 detektiert.

Nach einer NP40-Lyse der Zellen wurde die Gesamtexpression der Schwere Kette und β_2m im Western Blot analysiert. Es zeigte sich, daß die Gesamtmenge an exprimierten Schwerketten in 721.220.B44-Transfektanten durch die N-terminale Deletionsmutante ($\Delta N44$) von Tapasin in etwas stärkerem Maße erhöht wird als durch die ΔIg -Tapasin-Mutante (Abb. 25A). Diese Ergebnisse sprechen für einen gewissen stabilisierenden Effekt von Tapasin auf die Schwerkette von HLA-B44 und -Cw1 Molekülen, der auch bei defekter Peptidbeladung vorhanden ist. Der generell schwache Stabilisierungseffekt spricht für eine kooperative Aktion von Ig-ähnlicher und N-terminaler Domäne (siehe Diskussion). Bangia und Kollegen konnten mittlerweile auch zeigen, daß die Interaktionen zwischen N-terminal deletiertem Tapasin und dem MHC-Molekül sehr schwach sind (Bangia et al., 1999). Eine Erhöhung der Expression von β_2m konnte, wie erwartet, durch humanes Tapasin voller Länge erreicht werden (Abb. 25B). Ein deutlicher Stabilisierungseffekt wird zudem durch die N-terminal deletierte $\Delta N44$ -Tapasin-Mutante vermittelt, wohingegen die ΔIg -Mutante keine Erhöhung der β_2m -Expression bewirkt. Diese Beobachtungen sprechen für eine Chaperon- oder Retentionsfunktion von Tapasin in bezug auf β_2m , die wahrscheinlich durch die membranproximale Ig-Domäne von Tapasin bewirkt wird.

5.4 Die Assemblierung des Peptidbeladungskomplexes

5.4.1 Tapasin-vermittelte Assemblierung des Subkomplexes an MHC-Klasse-I-Molekülen

Im MHC-Klasse-I-Peptidbeladungskomplex konnten bisher folgende Proteine identifiziert werden: die MHC-Klasse-I-Schwerkette, β_2m , Tapasin, Calretikulin, ER60 und TAP. Nach den Ergebnissen von Ortmann und Kollegen, die die Stöchiometrie der TAP1-assoziierten Komponenten bestimmten, kann man die kleinste Einheit als Komplex aus einem TAP1-Molekül, einem TAP2-Molekül, vier Tapasin-Molekülen, vier HC-Molekülen, zwei oder drei Calretikulin-Molekülen und einem Calnexin-Molekül definieren (Ortmann et al., 1997). Später wurde zudem ER60 im TAP-Beladungskomplex gefunden (Lindquist et al., 1998; Hughes und Cresswell, 1998; Morrice und Powis, 1998). Nur ungenaue Kenntnisse hatte man bisher über die Interaktionen zwischen einzelnen Komponenten des Beladungskomplexes, die essentiell für eine erfolgreiche Peptidbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle sind. Bekannt war, daß das Fehlen von Tapasin zu einer defekten Brückenbildung zwischen dem MHC-Molekül und TAP führt (Sadasivan et al., 1996). Aus unseren Daten über die Stabilisierung von TAP läßt sich bereits folgern, daß diese Interaktion über die carboxyterminale Region von Tapasin vermittelt werden muß (siehe 5.2.2.1). Es stellte sich die weitergehende Frage, ob Tapasin die Assemblierung der restlichen Komponenten des Beladungskomplexes fördert, bzw. welche Protein-Interaktionen bei Abwesenheit von Tapasin gestört sind. Es ist anzunehmen, daß die Peptidbeladung in diesem Fall nicht TAP-assoziiert stattfindet. Möglich wäre jedoch, daß sich um das MHC-Molekül ein unvollständiger Beladungskomplex formiert. Sadasivan und Kollegen fanden heraus, daß man das Chaperon Calretikulin nach der Assoziation von β_2m an die Schwerkette am Heterodimer findet (Sadasivan et al., 1996). Um den Einfluß von Tapasin auf den Verlauf dieses frühen Assemblierungsschritts zu analysieren, betrachteten wir die Calretikulin-assoziierten Proteine in .220.B44-Transfektanten.

Wir beobachteten nach der Isolierung des Calretikulin-assoziierten Protein-Komplexes mittels Immunpräzipitation aus Digitoninlysaten, daß die L410F-Mutante und Maus-Tapasin mit gleicher Effizienz wie Mensch-Tapasin einen Subkomplex aus Calretikulin, HC und Tapasin ausbilden können (Abb. 26). Demgegenüber war nach der

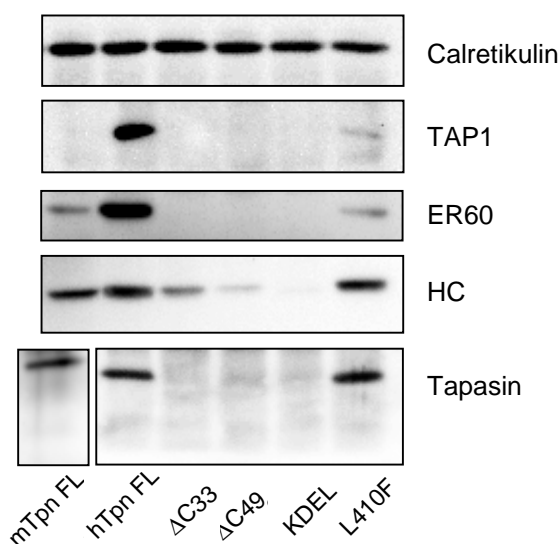


Abb.26: Calretikulin-assoziierte Proteine in .220.B44-Transfektanten. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen in Digitonin-Lysepuffer aufgeschlossen und mit dem an ProteinG-Sepharose gekoppelten Kaninchen anti-Calretikulin Antikörper inkubiert. Nach SDS-PAGE-Auftrennung wurden Western Blots mit den folgenden Antikörpern gefärbt: Maus anti-Calretikulin, 148.3 (anti-TAP1), Maus anti-ER60, HC-10 für HC und anti-Maus-Tapasin-Serum bzw. PAV Serum für humane Tapasin-Konstrukte.

Detergenzlyse keine Interaktion mehr zwischen den drei C-terminal deletierten Tapasin-Konstrukten und Calretikulin detektierbar, und wir fanden deutlich weniger MHC-Moleküle mit Calretikulin assoziiert. Die Assoziation von HC und Calretikulin scheint dennoch stark von den Tapasin-Konstrukten beeinflusst und durch deren Länge bestimmt zu werden, da in der $\Delta C33$ -Transfektante mehr HC an Calretikulin band als in den Transfektanten mit den stärker verkürzten $\Delta C49$ - und $\Delta C53_{KDEL}$ -Tapasin-Mutanten. Die Anfügung des KDEL-Retentionssignals an ein lösliches Tapasin-Molekül führt, trotz einer vollständigen Retention im ER (siehe 5.1.2), zu keiner Verbesserung der Bindung von Tapasin an das MHC-Molekül. Die Deletionen im C-Terminus von Tapasin führten ebenfalls zur Aufhebung der Bindung von Calretikulin an TAP. Daraus läßt sich folgern, daß möglicherweise Calretikulin erst in den Peptidbeladungskomplex um TAP integriert wird, wenn es zuvor erfolgreich durch Tapasin vermittelt an HC/ β_2m -Moleküle gebunden und sich ein Subkomplex formiert hat. Obwohl diese Voraussetzung gegeben ist, kann jedoch überraschenderweise weder Maus-Tapasin noch das L410F-Protein in .220.B44-Zellen die Bindung des Calretikulin-MHC-Tapasin-Subkomplexes an TAP bewirken. Zudem assoziiert mit diesen normal assemblierten Subkomplexen offensichtlich deutlich weniger ER60.

Aus diesen Daten kann man schließen, daß sich zunächst von Tapasin unterstützt ein Subkomplex aus Calretikulin, MHC-Klasse-I-Schwerkette und Tapasin bilden könnte, der abermals durch Tapasin vermittelt an TAP bindet und zuvor oder später ER60 integriert. Die Assemblierung dieses Subkomplexes erfolgt dabei anscheinend unabhängig von der ER60- und TAP-Bindung.

5.4.2 Tapasin-vermittelte Rekrutierung von ER60 an TAP

ER60 wird durch Tapasin vermittelt möglicherweise erst nach der Bildung des Subkomplexes von Calretikulin-HC-Tapasin in den TAP-assoziierten Beladungskomplex integriert. Dieser Assemblierungsschritt ist bei Anwesenheit von Maus-Tapasin oder der

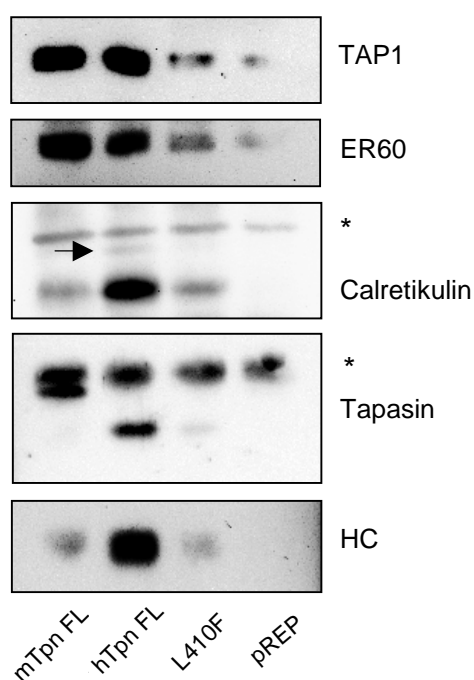


Abb.27: TAP-assoziierte Proteine in .220.B44-Transfektanten. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen in Digitonin-Lysepuffer aufgeschlossen und mit dem an ProteinA/G-Agarose gekoppeltem Kaninchen anti-TAP1-Serum präzipitiert. Nach SDS-PAGE Trennung wurde die Membran durchgeschnitten und mit den folgenden Antikörpern geblottet: 148.3 für TAP1, Maus anti-ER60, Maus anti-Calretikulin, biotinyliertes PAV Anti-Serum gegen Tapasin sowie HC-10 gegen MHC-Klasse-I-Schwerketten (* = unspezifische Banden).

L410F-Mutante in .220.B44-Zellen gestört. Es war zu klären, ob diese Tapasin-Varianten die direkte ER60-Bindung an den Subkomplex nicht ermöglichen oder ob die gestörte Interaktion mit TAP die Kopräzipitation von TAP-gebundenem ER60 indirekt verhindert. In letztem Fall wäre die ER60-Assoziation mit TAP auf ihre Tapasin-Abhängigkeit zu prüfen. Aus diesem Grund wurden die TAP1-assoziierten Proteine durch Immunpräzipitation aus Digitoninlysaten von .220.B44-Transfektanten isoliert.

Wie erwartet, ließ sich in der .220.B44.FL-hTpn-Transfektante mit den Proteinen ER60, Calretikulin, HC und Tapasin der vollständige Beladungskomplex an TAP assoziiert nachweisen, wohingegen bei Abwesenheit von Tapasin in der pREP4-Transfektante außer einer geringen Menge an ER60 keine weiteren Proteine gefunden wurden (Abb. 27). Es wurde erneut deutlich, daß sich die Brücke zwischen der Schwerkette und TAP in Gegenwart von Maus-Tapasin und der L410-Mutante kaum ausbildet; weitaus weniger HC und Calretikulin konnte an TAP detektiert werden. Auffällig war eine nur bei der FL-hTpn Transfektante sichtbare zweite Calretikulin-Bande, die im Gegenwart der anderen Tapasin-Konstrukte schwächer exprimiert wird (Pfeil in Abb. 27 und Abb. 28). Tapasin scheint ER60 direkt in den TAP-Komplex zu rekrutieren, wie der Vergleich der Ergebnisse mit der FL-hTpn-, der Maus-Tapasin- und der L410F-Transfektante zeigt. Die Mutante L410F ließ sich wegen der verminderten TAP-Gesamtmenge (siehe 5.2.1.2) nur in geringen Mengen mit TAP1 kopräzipitieren, was klar mit einer geringeren ER60-Bindung an TAP korrelierte. Beeindruckender war jedoch die starke Rekrutierung von ER60 an TAP in Maus-Tapasin-.220.B44-Zellen, die mit einer sehr guten Bindung von Maus-Tapasin an TAP einhergeht (näheres zur Bindungsstärke siehe unten). Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgern, daß eine fehlende Bindung zwischen ER60 und TAP in der Maus-Tapasin-Transfektante wahrscheinlich nicht der Grund für die mangelhaften Rekrutierung von Calretikulin in den TAP-Komplex ist. Die verminderte TAP-Gesamtmenge und die daraus resultierende schwache Bindung von ER60 an TAP in der L410F-Transfektante hingegen könnte die Hauptursache für die abgeschwächte Interaktion zwischen dem Calretikulin/HC/hTpn-L410F-Subkomplex und ER60 sein (siehe Abb. 26).

Aus den vorausgehenden Experimenten kann geschlossen werden, daß Tapasin die Bildung von zwei voneinander unabhängigen Subkomplexen fördert, indem 1. Calretikulin an das MHC-Molekül gebunden und 2. ER60 an TAP rekrutiert wird. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurden die ER60-assoziierten Proteine betrachtet.

Es bestätigte sich wiederum, daß sich in Maus-Tapasin exprimierenden .220.B44-Zellen ein ER60-TAP-Komplex bildet, an dem kaum HC und nur wenig Calretikulin zu finden ist (Abb. 28). Die Calretikulin-Bindung an ER60 war in L410F-Transfektante nur etwas schwächer nachweisbar als in der hTpn-FL-Transfektante. Diese Beobachtung spricht für eine TAP-unabhängige Assoziation der beiden Proteine, die von

membranverankertem Tapasin deutlich verstärkt wird (vergleiche mit pREP und Δ C33). Es ist jedoch bekannt, daß ER60 bei auch bei anderen Faltungsprozessen, die nicht der Assemblierung von Klasse-I-Molekülen dienen, oft mit Calretikulin assoziiert ist (Zapun et al., 1998 und Oliver et al., 1999). Calretikulin trat hier erstaunlicherweise abermals als Doppelbande auf, und dies nur, wenn auch ein Tapasinmolekül im kopräzipitierten Komplex zu finden war (siehe Diskussion).

Im Western Blot zum Nachweis der TAP-assoziierten Tapasin-Konstrukte zeigte sich,

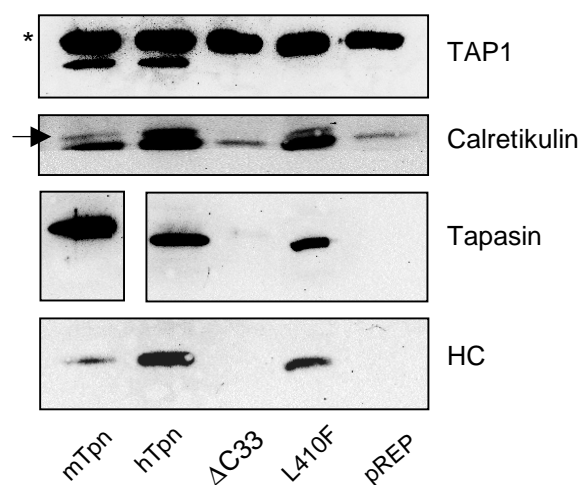


Abb.28: ER60-assoziierte Proteine in .220.B44-Transfektanten. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen in Digitonin-Lysepuffer aufgeschlossen und mit dem an ProteinA/G-Agarose gekoppelten Maus anti-ER60 Antikörper inkubiert. Nach SDS-PAGE Trennung wurden Western Blots mit den folgenden Antikörpern gefärbt: 148.3 (anti-TAP1), Kaninchen anti-Calretikulin, anti-Maus-Tapasin Serum sowie "PAV" Anti-Serum gegen Tapasin für Tapasin sowie HC-10 für MHC-Schwere Ketten (*unspezifische Banden).

daß Maus-Tapasin mit dem "PAV"-Antiserum hier sehr gut detektiert werden konnte. In früheren Untersuchungen an Lysaten war jedoch stets eine schwächere Färbung von Maus-Tapasin durch das gegen menschliches Tapasin (AS 2-20) generierte Peptid-Serum "PAV" aufgefallen (siehe Abb. 16 und 21). Diese Beobachtung spricht für eine selektive Anreicherung von Maus-Tapasin an humanem TAP in .220-Zellen. Um einer verstärkten Bindung von Maus-Tapasin auch an das ER60-Molekül nachzugehen, wurde ein weiteres ER60-Präzipitat aus .220.B44.Tapasin-Lysaten mit dem "PAV"-Serum gefärbt und die Menge von ER60-assoziiertem Tapasin mit der Menge aus Concanavalin-A-Präzipitationen verglichen. (Das immobilisierte Lektin Concanavalin A präzipitiert mannosereiche Glykoproteine.)

Es zeigte sich in der Tat, daß im Vergleich zur Situation mit humanem Tapasin oder der L410F-Mutante, deutlich mehr Maus-Tapasin-Moleküle im ER60-assoziierten Pool vorhanden waren als vom ConA-Präzipitat und vom Western Blot des Gesamtlysats zu erwarten gewesen wäre (Abb. 29). Maus-Tapasin interagiert demnach in .220.B44-Zellen überproportional gut mit ER60.

Es kann gefolgert werden, daß die Bindung von Maus-Tapasin an ER60 und an TAP im Vergleich zum humanen Tapasin eher verstärkt ist. Diese Anreicherung und starke Interaktion von Maus-Tapasin mit dem TAP-Subkomplex könnte ein Grund für die defekte Brückenbildung zum HC-Calretikulिन-Subkomplex sein (siehe Diskussion). Demgegenüber wirkt sich die schwächere Bindung der Punktmutante L410F an TAP in einer generell schwächeren Ausbildung des gesamten Beladungskomplexes aus.

Es stellt sich die Frage, ob eine schwache oder ganz fehlende TAP-Expression die Stärke der Interaktionen zwischen den Komponenten in einem möglichen

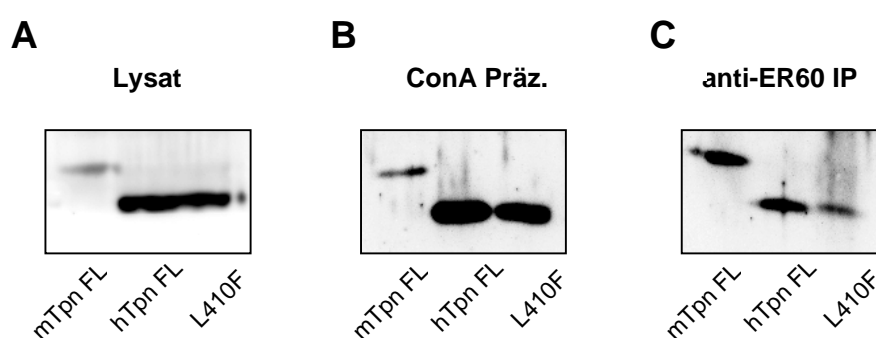


Abb.29: Verstärkte Assoziation von mTpn mit ER60. (A) Expression von Tapasin in .220.B44-Transfektanten. Nach der NP40-Lyse von jeweils 5×10^5 Zellen folgte eine Auftrennung durch SDS-PAGE und ein Western Blot mit "PAV"-Serum, um die Expression der Tapasin-Konstrukte sichtbar zu machen. (B) Conavalin A-bindene Tapasinmengen. Nach NP40-Lyse von 2×10^6 Zellen wurde eine Präzipitation mit ConA-gekoppelter Sepharose vorgenommen. Der Trennung im SDS-PAGE folgte ein Western Blot mit "PAV" Serum. (C) ER60-assoziierte Tapasinmengen. Nach Digitoninlyse von 2×10^6 Zellen wurde mit dem anti-ER60 Antikörper präzipitiert. Der SDS-PAGE-Trennung folgte ein Western Blot mit "PAV"-Serum.

HC/CRT/Tpn/ER60 „Prä-TAP“-Komplex beeinflusst (siehe Abb. 26). Möglich wäre, daß Tapasin nur in der TAP-assoziierten Form einen signifikanten Einfluß auf die Bildung des Subkomplexes um das MHC-Molekül ausüben kann. Um diese Frage zu beantworten, wurde die TAP-negative Zelllinie T2 mit einer rTAP1/2-Transfektante von T2 verglichen. Durch Immunpräzipitation aus Digitoninlysaten von T2- und T2.rTAP-Zellen wurden die ER60- und Tapasin-assoziierten Komplexe isoliert.

Wir fanden in T2- gegenüber T2.rTAP-Zellen deutlich weniger Calretikulिन, HLA-B51 und Tapasin an ER assoziiert, möglicherweise, weil ER60 wegen des Fehlens von TAP in T2-Zellen den Transporterkomplex nicht als Eintrittspunkt in den Beladungskomplex nutzen kann (Abb. 30B). Erstaunlicherweise ist aber in T2-Zellen auch die Interaktion

zwischen Tapasin und dem HLA-B51 Molekül sowie zwischen Tapasin und ER60 weniger stark ausgeprägt (Abb. 30C). Tapasin fördert, wie unter 5.4.1 gezeigt, in .220.B44-Zellen die Bildung des Calretikulin-MHC-Tapasin-Subkomplexes offensichtlich nur dann, wenn der Komplex eine transiente Interaktion mit dem TAP-Subkomplex eingehen kann. Diese Voraussetzung wird durch die Deletion des C-Terminus von Tapasin schwer erfüllbar, ist jedoch bei Anwesenheit von Maus-Tapasin und der L410F-Mutante gegeben. Tapasin wird zwar in T2-Zellen wie in T2.rTAP Zellen gleich stark exprimiert. Es ließ sich jedoch kein Tapasin-ER60-Komplex mehr nachweisen. "Freies Tapasin" ist allein offensichtlich nicht in der Lage, den Subkomplex um das MHC-Molekül effiziente zu assemblieren.

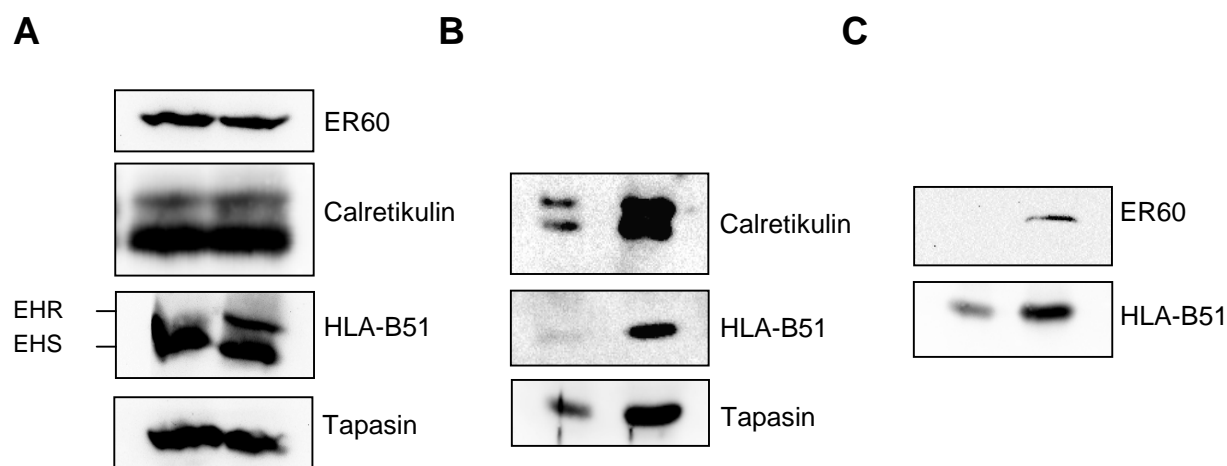


Abb.30: (A) Expression von ER60, Calretikulin, HLA-B51 und Tapasin in T2 (überall linke Spur) und T2.rTAP (rechte Spur) Zellen. 5×10^6 Zellen wurden nach NP40-Lyse im SDS-PAGE aufgetrennt und mit den folgenden Antikörpern geblottet: mouse anti-grp57 für ER60, mouse anti-Calretikulin für Calretikulin, HC-10 für HLA-B51 und PAV Serum für Tapasin. (B) ER60-assoziierte Proteine in T2 (links) und T3 (rechts). Digitoninlysate von jeweils 2×10^6 Zellen wurden mit dem an ProteinA/G-Agarose gekoppelten anti-grp57 Antikörper inkubiert und präzipitierte Proteine mittels SDS separiert. Der Western Blot erfolgte mit den bei A erwähnten Reagentien. (C) Tapasin-assoziierte Proteine in T2 (links) und T3 (rechts). Digitoninlysate von jeweils 2×10^6 Zellen wurden mit dem an ProteinA/G-Agarose gekoppelten STC-Serum inkubiert und präzipitierte Proteine mittels SDS separiert. Der Western Blot erfolgte mit den unter A aufgeführten Antikörpern.

5.5 Der Einfluß von Tapasin auf zelloberflächenexprimierte MHC-Klasse-I-Moleküle

5.5.1 Quantitative Daten: Gesamtmenge an MHC-Klasse-I-Molekülen

5.5.1.1 Nachweis mit dem Pan-MHC-Klasse-I-Antikörper W6/32

Mit dem Wissen, daß sowohl die C-terminal deletierten Tapasin-Konstrukte als auch Maus-Tapasin und die Punktmutante L410F nicht oder nur vermindert in der Lage sind, den Peptidbeladungskomplex an TAP zu assemblieren, stellte sich die Frage, wie sich diese Defekte auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression auswirken. Bangia und Kollegen konnten bereits zeigen, daß sich der Beladungskomplex nach Expression N-terminal deletierter Tapasinmoleküle in .220.B8-Zellen ebenfalls nicht assembliert, da weder die Bindung von Calretikulin noch von ER60 an HC ermöglicht wird (Bangia et al., 1999).

Um den Einfluß der Tapasinmutationen auf die Gesamtexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen in .220, .220.B8 und .220.B44-Transfektanten zu analysieren, wurden FACS-

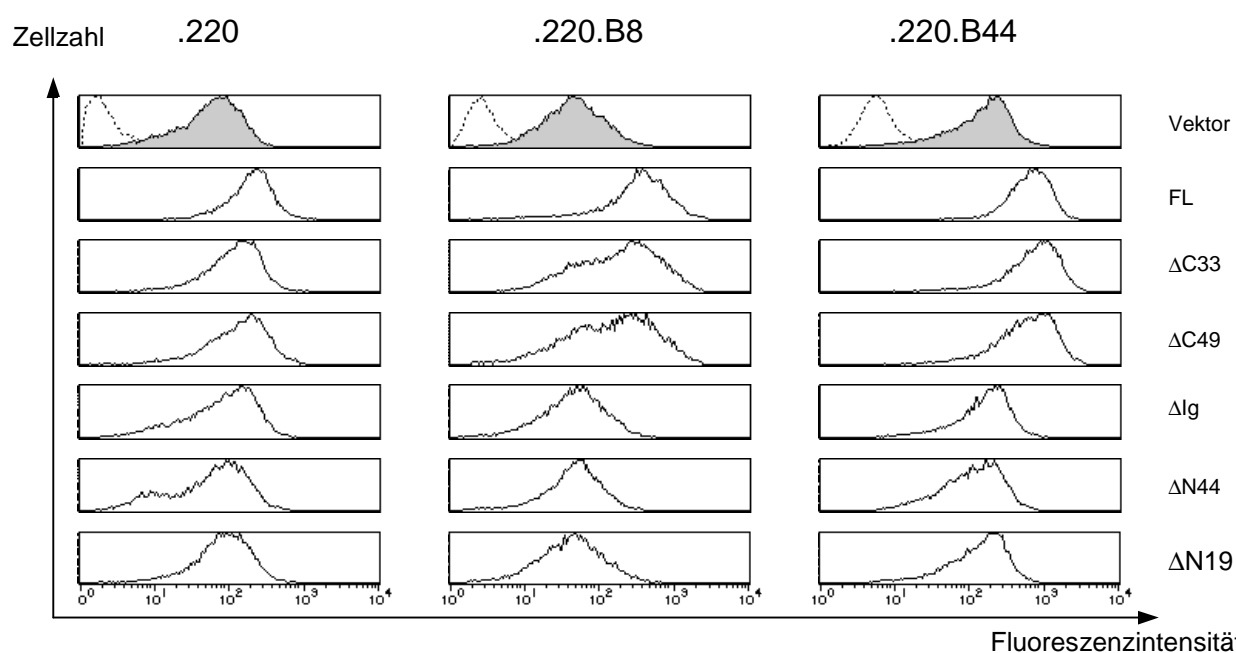
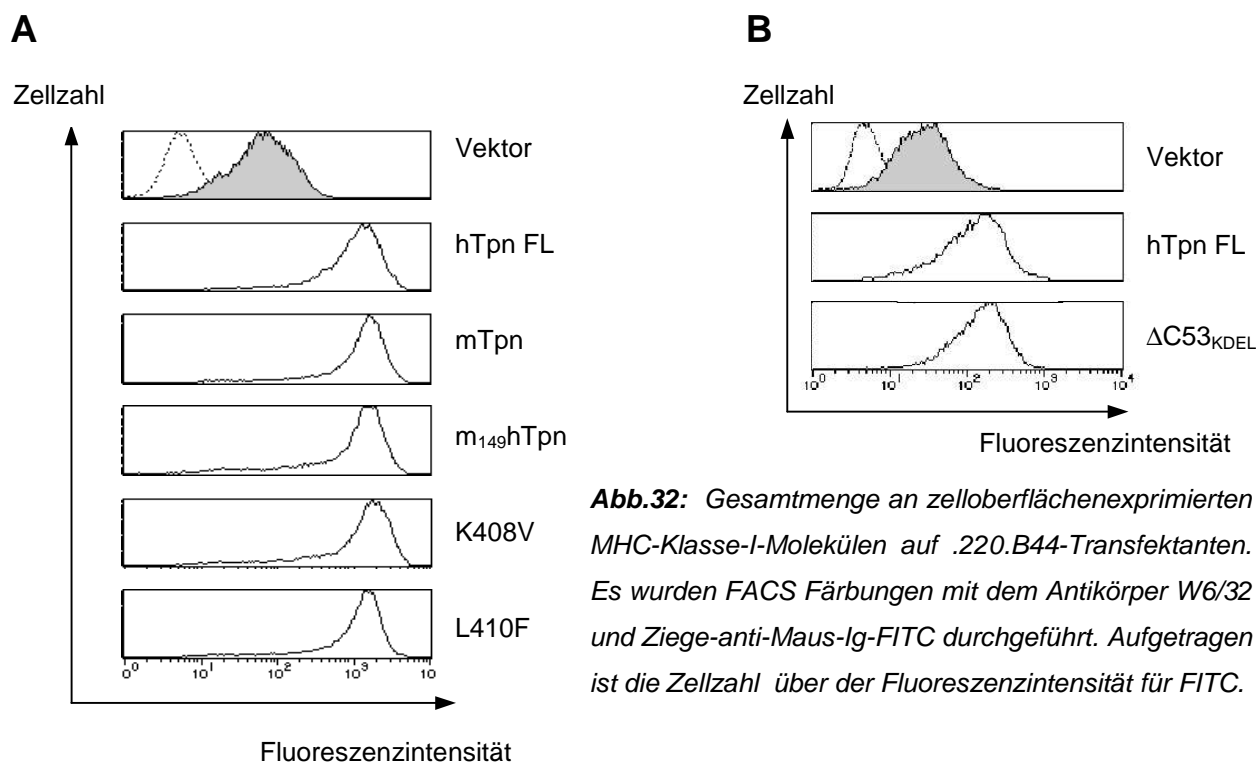


Abb. 31: Gesamtmenge an zelloberflächenexprimierten MHC-Klasse-I-Molekülen auf .220-, .220.B8- und .220.B44-Transfektanten. Es wurde eine FACS Färbung mit dem Pan-MHC-Klasse-I-Antikörper W6/32 und FITC-markiertem Ziege anti-Maus-Ig durchgeführt. Aufgetragen ist die Zellzahl über der Fluoreszenzintensität für FITC.

Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 durchgeführt. Dieser Antikörper erkennt eine monomorphe Determinante auf β_2m -assoziierten Schwerketten aller allelischen Produkte der humanen MHC-Klasse-I-Loci HLA-A,-B und -C sowie HLA-E,-F



und -G (Barnstable et al., 1978).

Es zeigte sich, daß die C-terminalen Deletionskonstrukte die MHC-Klasse-I-Zelloberflächenexpression auf .220-, .220.B8- und .220.B44-Zellen in gleicher Stärke wie das hTpn-FL Konstrukt induzierten, wohingegen die N-terminalen Verkürzungen und die Deletion der Ig-Domäne im Tapasinmolekül keine Steigerung der Klasse-I-Expression auf .220.B8- und .220.B44-Zellen bewirkten (Abb. 31). Durch die ΔIg -Mutante konnte hingegen die HLA-Cw1-Expression auf .220-Transfektanten etwas erhöht werden (siehe Diskussion). Die Expression von mTpn, m₁₄₉hTpn, der Punktmutanten K408V und L410F und des $\Delta C53_{KDEL}$ -Konstrukts in .220.B44-Transfektanten führt ebenfalls zu einer Steigerung der Menge an MHC-Klasse-I-Molekülen auf das Niveau der hTpn-FL-Transfektanten (siehe Abb. 32).

Das Vorhandensein des vollständigen Peptidbeladungskomplexes ist offensichtlich kein Faktor, der die Anzahl an Zelloberflächen-HLA-Molekülen bestimmt. Werden jedoch frühe Stufen der Assemblierung nicht ermöglicht, führt dies zur Inhibition des Plasmamembrantransports von HLA-B8- und HLA-B44-Molekülen. So binden N-

terminale Tapasin-Detektionsmutanten (wie wahrscheinlich auch die Ig-Deletionsmutante) sehr schwach an MHC-Moleküle und ermöglichen keine Bindung von Calretikulin, womit sich der erste Subkomplex nicht bilden kann (Bangia et al., 1999). Offensichtlich erlaubt diese Situation keine Peptidbeladung, die zu einer gesteigerten Klasse-I-Oberflächenexpression führen würde. Alle anderen Tapasin-Mutanten sind zumindest partiell in der Lage, den Subkomplex aus dem HLA-Molekül, Calretikulin und Tapasin zu assemblieren, was auszureichen scheint, um auf den Transfektanten die Klasse-I-Expression wie bei Anwesenheit von menschlichem Tapasin zu induzieren. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß schon eine initiale oder transiente Interaktion zwischen Tapasin und dem Klasse-I-Molekül (und Calretikulin) die Peptidbindung und damit die Oberflächenexpression stark fördert.

5.5.2 Qualitative Daten: Expression allospezifischer Epitope

5.5.2.1 Nachweis mit allelspezifischen Antikörpern

Die mit dem Antikörper W6/32 detektierte Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf .220.B8- und .220.B44-Zellen setzt sich aus HLA-Cw1 und -B8 bzw. HLA-Cw1 und HLA-B44-Molekülen zusammen. Um die alleinige Expression von HLA-B8 zu messen, wurden die B8/Bw6-spezifischen, monoklonalen Antikörper 2BC4, T384-25, SFR8-B6 und T126-39 verwendet. Die HLA-B44 Expression wurde mit den Bw4-spezifischen, monoklonalen Antikörpern T116-5-28, TT4-A20 und TÛ109 auf .220.B44-Transfektanten bestimmt. Es sollte mit diesen alloreaktiven Antikörpern die Frage geklärt werden, ob sich die Defekte in der Assemblierung des Peptidbeladungskomplexes auf die Ausbildung bestimmter konformationsabhängiger Epitope des Klasse-I-Moleküls auswirken. Der Antikörper W6/32 bindet generell an β_2m -assoziierte Schwereketten, die möglicherweise in mehreren peptidabhängigen Konformationen vorliegen können. Die Bw4- und Bw6-Epitope sind beide durch allelspezifische Aminosäuren an den Positionen 80, 82 und 83 in der α_1 -Domäne des MHC-Klasse-I-Moleküls liegenden Aminosäuren definiert, werden können aber zusätzlich durch die Art und Lage benachbarter Aminosäuren in ihrer Ausbildung beeinflusst werden (Lutz et al., 1994).

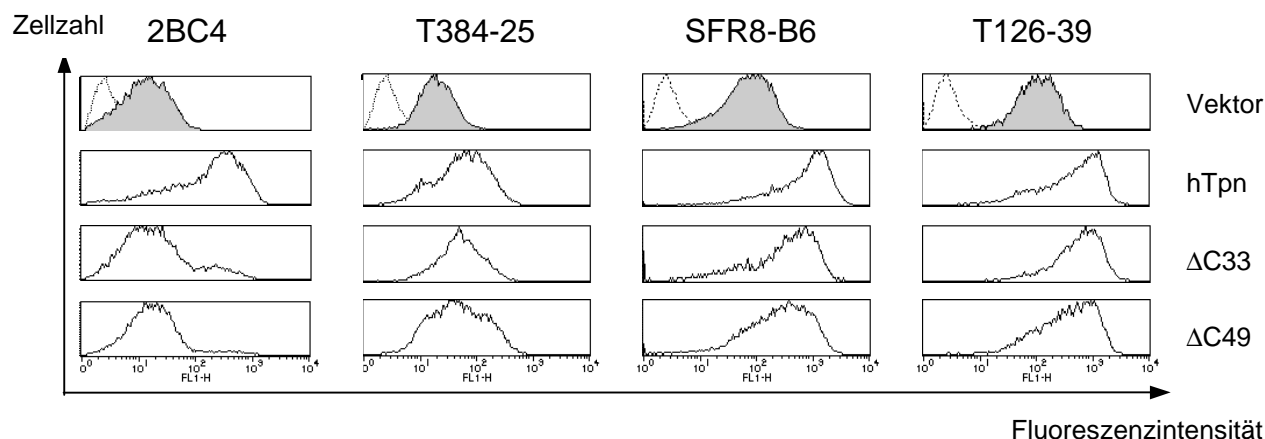


Abb.33: Expression von Determinanten auf .220.B8 Transfektanten. Es wurde eine FACS Färbung mit den Bw6-spezifischen Antikörpern 2BC4, T384-25, SFR8-B6 und dem HLA-B8-spezifischen Antikörper T126-39 und Ziege anti-Maus- bzw. Ziege anti-Ratte-FITC (SFR8-B6) durchgeführt. Aufgetragen ist die Zellzahl über der Fluoreszenzintensität für FITC.

Es zeigt sich in einer FACS-Oberflächenfärbung von .220.B8-Transfektanten mit dem HLA-B8-spezifischen Antikörper T126-39, daß HLA-B8-Moleküle von den Δ C-Konstrukten in sehr ähnlichen Mengen induziert werden wie durch humanes Tapasin voller Länge (Abb. 33). Jedoch zeigte die Färbung mit verschiedenen Bw6-reaktiven Antikörpern deutliche Unterschiede. In der Reihenfolge der Antikörper 2BC4 > SFR8-B6 > T384-25 wurden Expressionsdefekte auf den Δ C-Transfektanten sichtbar.

Die HLA-B44 Expression wurde mit Bw4-spezifischen Antikörpern auf den .220.B44-Transfektanten analysiert. Mit Ausnahme der Δ C49-Transfektante, die eine etwas schwächere Färbung aufwies, waren die mit dem Bw4-Antikörper T116-5-28 nachgewiesenen Mengen von HLA-B44, auf der hTpn-FL, der Δ C33-, der Δ C49-, der mTpn-, der m₁₄₉hTpn- sowie der L410F-Transfektante etwa gleich hoch. Gleichzeitig wurde jedoch durch schwächere Färbungen mit den Antikörpern TT4-A20 und TÜ109 deutlich, daß auch die vollständige Ausbildung der von diesen Antikörpern erkannten des Bw4-Determinanten bei allen Transfektanten im Vergleich zur hTpn-FL-Transfektanten gestört ist (Abb. 34 und 35).

Es stellte sich die Frage, wie die beobachteten Defekte in der Ausbildung von einigen, aber nicht allen von Bw6- bzw. Bw4-Antikörpern erkannten Epitopen zustande kommen. Da die verwendeten Bw4/Bw6-Supertyp-Antikörper einen exponierten Bereich in der α_1 -Domäne der MHC-Moleküle erkennen, ist anzunehmen, daß diese Region auf den Transfektanten mit Tapasin-Mutanten entweder für manche Antikörper maskiert oder aufgrund einer etwas anderen Konformation des MHC-Moleküls verändert ist. In beiden

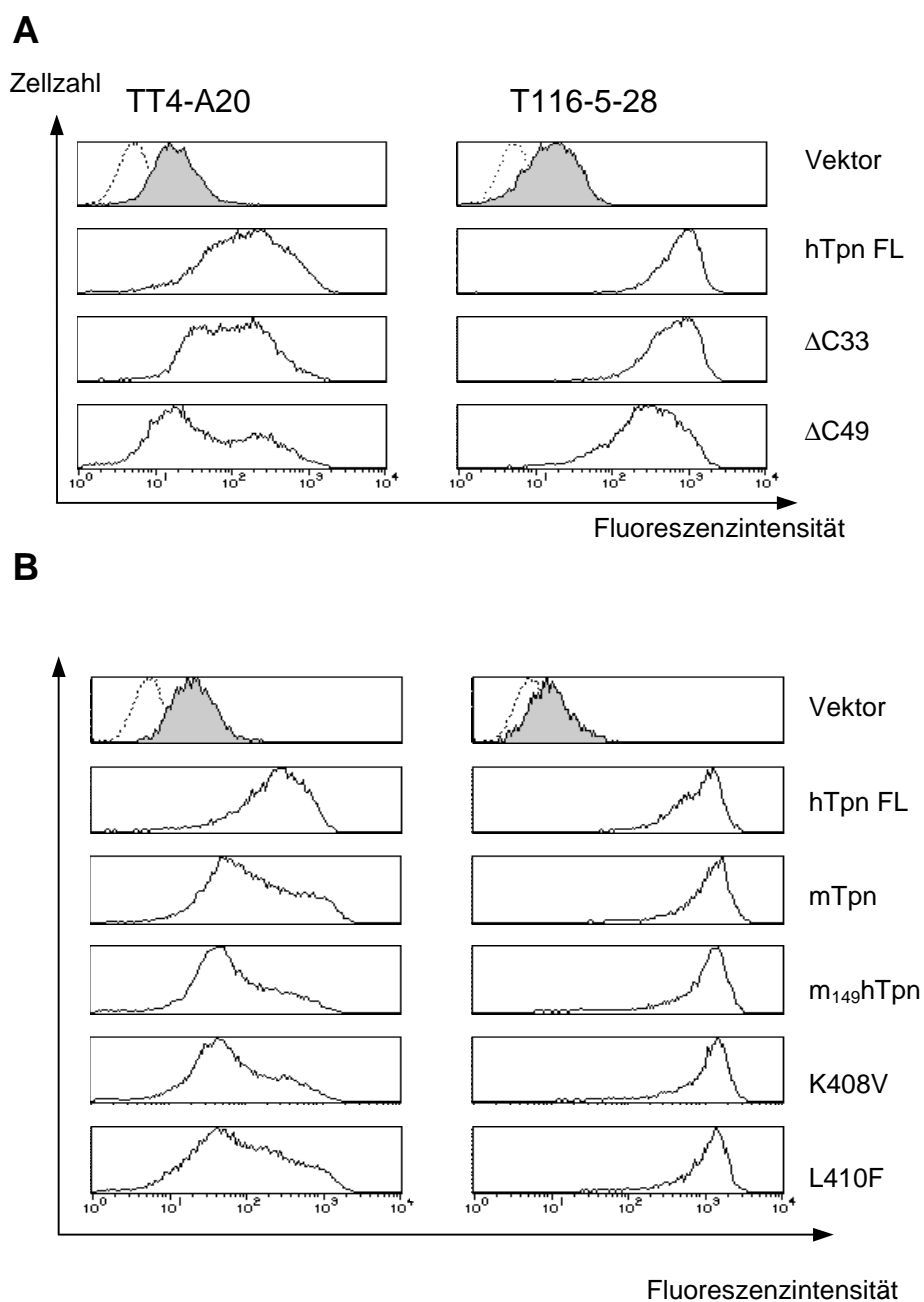


Abb.34: Expression des Bw4-Epitops auf .220.B44-Transfektanten. Es wurde eine FACS-Färbung mit den Antikörpern TT4-A20 und 116-5-28 sowie Ziege-anti-Maus-Ig-FITC durchgeführt. Aufgetragen ist die Zellzahl über der Fluoreszenzintensität für FITC.

Fällen könnte die Art des in die Grube gebundenen Peptids der Grund für die gestörte Epitoperkennung sein. Vorstellbar wäre die Bindung von Peptiden, die durch ihre ungewöhnlich exponierten Reste die Epitoperkennung einiger Antikörper beeinträchtigen. Andererseits könnten bestimmte Seitengruppen im C-terminalen Ende der gebundenen Peptide die Entstehung der erforderlichen Supertyp-Konformation in

der flankierenden α_1 -Domäne nicht unterstützen, wie dies für das von T \ddot{U} 109 erkannte Bw4-Epitop bereits beschrieben wurde (Takamiya et al., 1996).

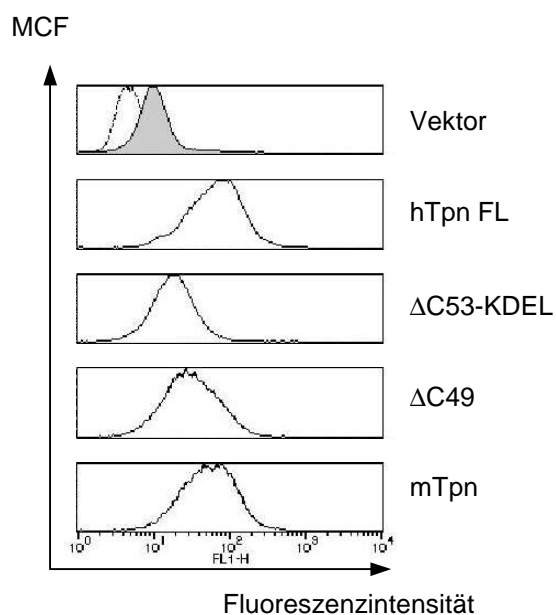


Abb.35: Expression eines Bw4-Epitops auf .220.B44-Transfektanten. Es wurde eine FACS Färbung mit Antikörper T \ddot{U} 109 und Ziege-anti-Maus-Ig-FITC durchgeführt. Aufgetragen ist die Zellzahl über der Fluoreszenzintensität für FITC.

5.6 Der Einfluß von Tapasin auf die Peptidbeladung von MHC-Klasse-I-Molekülen

5.6.1 Peptidbeladene MHC-Klasse-I-Moleküle auf .220.B44-Transfektanten

Schoenhals und Kollegen schlossen aus ihren Versuchen, daß Tapasin eine ER-Retentionsfunktion auf H-2K^b-Moleküle ausübt, die das Erscheinen peptidleerer Moleküle auf der Zelloberfläche von Insektenzellen verhindert (Schoenhals et al., 1999). Es stellte sich für uns die Frage, ob das Fehlen von Tapasin auch in der .220-Zelllinie dazu führt, daß leere MHC-Klasse-I-Moleküle auf die Zelloberfläche gelangen. Es sollte geprüft werden, ob die beobachteten Defekte in der Generierung der Bw4/Bw6-Epitope in Gegenwart der Tapasin-Mutanten mit der Anwesenheit von peptidleeren Molekülen erklärbar sein könnten.

Um eine direkte Peptidabhängigkeit der Maturation in allen Transfektanten zu untersuchen, wurde die Peptidzufuhr ins ER unterbunden und der Effekt auf die Reifung

der MHC-Klasse-I-Moleküle betrachtet. Durch eine Lactacystin-Behandlung von .220.B44-Transfektanten wurde die proteasomale Degradation von Proteinen und so die Entstehung von zytoplasmatisch generierten Peptiden verhindert. Nach radioaktiver Markierung der Zellen zu mehreren Zeitpunkten wurde eine Immunpräzipitation der entstandenen W6/32-reaktiven MHC-Klasse-I-Moleküle durchgeführt. Nachdem die Proben mit Endoglykosidase H verdaut worden waren, wurde nach einer SDS-PAGE-Auftrennung im Autoradiogramm der Zelloberflächentransport der MHC-Klasse-I-Moleküle durch das im zeitlichen Verlauf fortschreitende Erreichen der Endo-H-resistenten Form sichtbar.

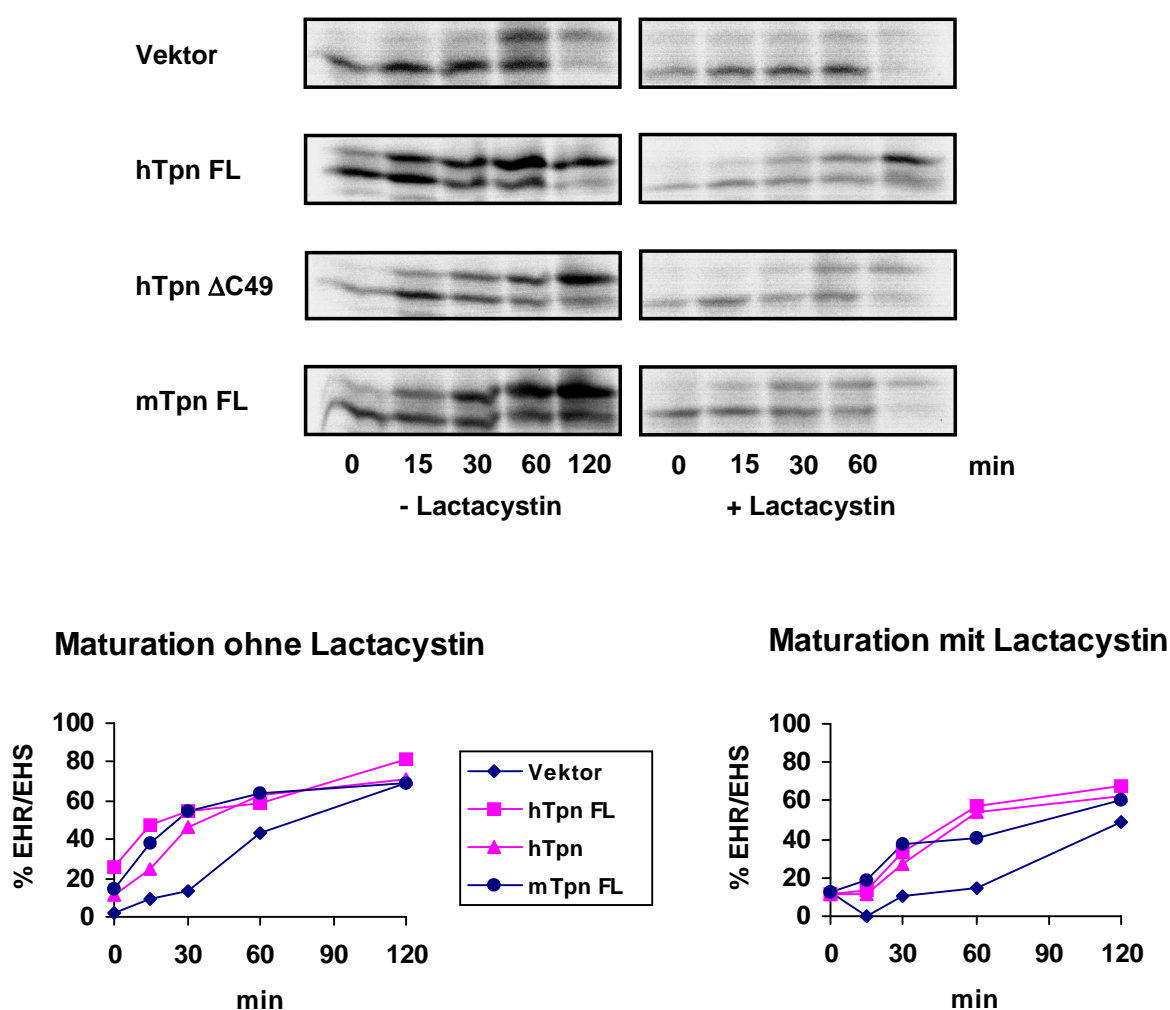


Abb. 36: Maturation von MHC-Klasse-I-Molekülen in .220.B44-Transfektanten bei normaler Peptidzufuhr und bei Peptiddepletion durch Lactacystin. Nach einer zweistündigen Inkubation der Zellen mit oder ohne Lactacystin wurde eine metabolische Markierung mit ^{35}S -Methionin/Cystein durchgeführt. Es wurde mit kaltem Medium weiterkultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten Zellaliquots entnommen, in NP40 lysiert und mit dem Antikörper W6/32 inkubiert. Mit W6/32 präzipitierte MHC-Moleküle wurden nach Endoglykosidase-Verdau und Auftrennung im SDS-PAGE mittels Autoradiographie sichtbar gemacht und mit der Lumi-Analyst-Software quantifiziert.

Zunächst war festzustellen, daß bei normaler Peptidzufuhr die Reifung von MHC-Klasse-I-Molekülen bei der Vektor-Kontroll-Transfektante gegenüber der hTpn-FL, Δ C49- und mTpn-Transfektante vermindert war (Abb. 36). Dieses Ergebniss korreliert gut mit den W6/32-Färbungen der betreffenden Zellen. Desweiteren war in Anwesenheit des Proteasomeninhibitors Lactacystin die Reifungskinetik bei allen Transfektanten gleichsinnig verlangsamt und die Gesamtmenge an W6/32-präzipitierbaren MHC-Klasse-I-Molekülen deutlich herabgesetzt. Hieraus läßt sich schließen, 1. daß die Anwesenheit einer minimalen Menge an Peptid für die Stabilität und Reifung von HLA-B*4402/-Cw1-Molekülen wichtig ist, während die sehr unterschiedlichen TAP-Mengen in FL-hTpn/mTpn bzw. Δ C49/pREP4-Transfektanten diese Faktoren wenig beeinflussen, 2. daß bei Peptiddepletion durch Lactacystin die membranverankerten hTpn und mTpn-Moleküle MHC-Klasse-I nicht stärker als Δ C49 im ER zurückhalten, was gegen eine besondere Rolle von Tapasin bei der ER-Retention leerer MHC-Klasse-I-Moleküle spricht; 3. daß auch in Abwesenheit von Tapasin nicht vermehrt peptidleere MHC-Klasse-I-Moleküle aus dem ER entlassen werden, sondern eine (wenn auch suboptimal) stattfindende Peptidbeladung für das Auswandern zur Zelloberfläche notwendig ist. Das Ergebnis dieses Experiments spricht also dagegen, daß von Bw4-spezifischen Antikörpern schwach angefärbte Zellen vermehrt leere MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimieren.

Der Verlust von Peptiden auf dem Weg zur Zelloberfläche oder sofort nach dem Erscheinen auf der Plasmamembran dürfte nicht oder kaum auftreten, sonst müßte die durch Zelloberflächenfärbung mit dem W6/32-Antikörper ermittelte Anzahl an HC/ β_2 m-Molekülen auf manchen Tapasin-Transfektanten wohl geringer sein (siehe Abb. 31 und 32).

5.6.2 Stabilität von MHC-Klasse-I-Molekülen im Detergenzlysat

Aus den Ergebnissen mehrerer Gruppen ist eine Funktion von Tapasin bei der Peptidbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle ableitbar. So ist die defekte Zelloberflächenexpression von Klasse-I-Molekülen auf der .220-Zelllinie wohl einer fehlenden Peptidbeladung zuzuschreiben, die bei Abwesenheit von Tapasin mehreren HLA-Allelen den ER-Export stark verringert (Grande et al., 1997; Peh et al., 1998).

Vorstellbar ist neben dieser essentiellen Beladungsfunktion von Tapasin auch eine Rolle bei der Selektion von hoch affinen Peptiden, wie sie für MHC-Klasse-II-Moleküle durch HLA-DM geschieht (Übersicht in Vogt und Kropshofer, 1999). HLA-DM ist ein Peptideditor für MHC-Klasse-II-Moleküle, d.h. die Interaktion mit diesem Protein führt zur Dissoziation von wenig affinen Peptiden aus der Bindungsfurche, die statt dessen mit hoch affinen Peptiden besetzt wird.

Für das MHC-Klasse-I-Molekül ist bekannt, daß sich die Bindung von Peptid und β_2m an die Schwereketten beeinflussen, d.h. der Dissoziation des Peptids folgt auch sehr bald das Ablösen von β_2m (Parker et al., 1992; Cook et al., 1996). Aus diesem Grund bestimmt die Affinität des Peptids zum Klasse-I-Molekül auch die Stabilität und Lebensdauer des HC/ β_2m -Peptid-Komplexes. Um einer Peptideditorfunktion von Tapasin nachzugehen, wurde die Stabilität der trimeren Komplexe bei An- und Abwesenheit von Tapasin analysiert.

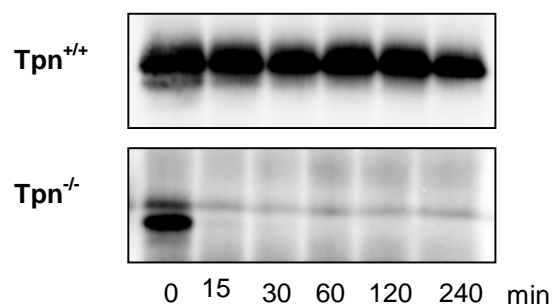


Abb.37: Thermostabilität der HC/ β_2m Form von H-2K^b-Molekülen. NP40-Lysate von ConA-Blasten aus *Tpn*^{-/-}- und *Tpn*^{+/+}-Mäusen wurden für die angegebenen Zeiten bei 37° C inkubiert. H-2K^b-Moleküle wurden dann mit dem konformationsabhängigen Antikörper Y3 präzipitiert und im Western Blot mit anti-P8 Serum sichtbar gemacht. Man erkennt eine obere Zelloberflächenform und die untere ER-Form (vgl. Abb. 36).

Die Bindungsstärke der Peptide wurde indirekt bestimmt, indem das Ausmaß der thermischen Dissoziation des HC/ β_2m -Moleküls betrachtet wurde (Neefjes et al., 1993c). Dazu wurden NP40-Lysate von ConA-Blasten aus Tapasin^{-/-}- und Tapasin^{+/+}-Mäusen für verschiedene Zeiten bei 37° C inkubiert und mit dem konformationsspezifischen Antikörper Y3 die Restmenge an HC/ β_2m -Molekülen isoliert.

Es zeigte sich im Western Blot mit dem Antiserum anti-P8 gegen die zytoplasmatische Domäne der H-2K^b-Schwerkette, daß HC/ β_2m -Moleküle bei Abwesenheit von Tapasin in den Zellen schon nach wenigen Minuten zerfallen. Demgegenüber waren die peptidbeladenen, zelloberflächenexprimierten H-2K^b-Moleküle bei Anwesenheit von Tapasin mindestens 2h lang stabil (Abb. 37). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Tapasin das Peptidrepertoire auf H-2K^b-Molekülen so beeinflusst, daß durch mehr Peptide mit geringerer Dissoziationsrate die Stabilität der MHC-Moleküle deutlich

verbessert wird. Eine fehlende Peptidselektionsfunktion in Abwesenheit von humanem α 2-mikroglobulin voller Länge könnte auch die Ursache der beobachteten Defizite in der Ausbildung der Bw6- oder Bw4-spezifischen Epitope sein. Vorstellbar wäre, daß schwach affine Peptide auf den Defektmutanten die Entstehung bestimmter Konformationen nicht ermöglichen. Um einen Hinweis auf die Bindungsaffinität der Peptide auf HLA-B44-Molekülen in den Tapasin-Transfektanten zu bekommen, wurde auch hier die Thermostabilität der MHC-Klasse-I-Moleküle im Detergenzlysat bestimmt (siehe oben). Mit dem Antikörper W6/32 wurden abermals nur intakte HC/ β ₂m-Moleküle aus den bei 4° C oder 37° C inkubierten Proben präzipitiert und die isolierten Schweren Ketten auf einem Western Blot mit dem Antikörper HC-10 nachgewiesen (Abb. 38; die quantitative Auswertung erfolgte abermals durch Lumi-Analyst Software. Die ermittelte Menge nach 4° C Inkubation wurde in jeder Probe als 100% gesetzt).

Der stabilisierende Einfluß von Tapasin auf HC/ β ₂m-Moleküle in .220.B44-Zellen zeigte sich beim Vergleich der hTpn-FL- mit der pREP4-Transfektante. Bei Abwesenheit von Tapasin ließen sich nach der Hitzebehandlung nur ca. 45% der Anzahl an MHC-Molekülen zurückgewinnen, die bei Anwesenheit von Tapasin verblieben. Während die verbleibende HC/ β ₂m-Menge nach thermischer Dissoziation aus hTpn-FL-

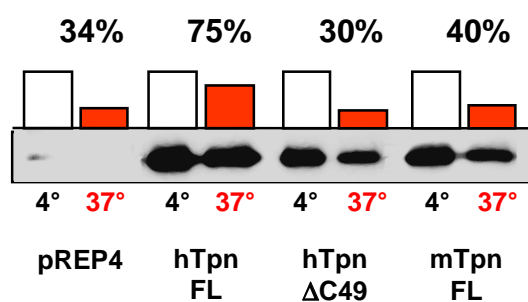


Abb.38: Thermostabilität von HC/ β ₂m-Molekülen in .220.B44-Transfektanten. Nach Lyse in NP40 von 2×10^6 Zellen wurde eine Hälfte 1h bei 4° C und die andere bei 37° C inkubiert. Verbleibende HC/ β ₂m Dimere wurden mit dem Antikörper W6/32 präzipitiert und im Western Blot mit HC-10 nachgewiesen.

Transfektanten noch 75% betrug, dissoziierten die HLA-B*4402 Dimere aus der pREP4, der Δ C49- und der mTpn-Transfektante stärker, so daß nur 30% bis 40% der nach einer Inkubation bei 4° C verbliebenen Mengen detektierbar waren.

Weder die Expression von Maus-Tapasin noch von der Δ C33-hTpn in .220.B44-Zellen führt zu einer im Lysat nachweisbaren Stabilisierung von Klasse-I-Molekülen. Es ist zu vermuten, daß diese Tapasin-Moleküle bei der Selektion von Peptiden in .220.B44-Zellen keine oder eine weitaus geringere Rolle spielen als humanes Tapasin.

5.6.2 Induktion des Bw4-Epitops durch exogene Beladung mit Peptiden

Es kann aus den bisherigen Experimenten gefolgert werden, daß die untersuchten Tapasin-Mutanten die Bindung hochaffiner Peptide auf MHC-Klasse-I-Moleküle in den .220.B44-Zellen nicht sichtbar fördern. Aus diesem Grund wäre es vorstellbar, daß das Fehlen hochaffiner Peptide auf den MHC-Klasse-I-Molekülen für die beobachteten Defizite in der Ausbildung des Bw4-Epitops ursächlich ist. Um zu überprüfen, ob sich das Bw4-Epitop für den Antikörper TT4-A20 peptidabhängig ausbildet, wurden die hTpn-FL-, Δ C33- und Δ C49-Transfektante exogen mit den HLA-B*4402 bindenden Peptiden AED (EBNA6) und VEI (Hsp90) (Peh et al., 1998) beladen und eine FACS-Färbung durchgeführt.

Rel. MCF (%)

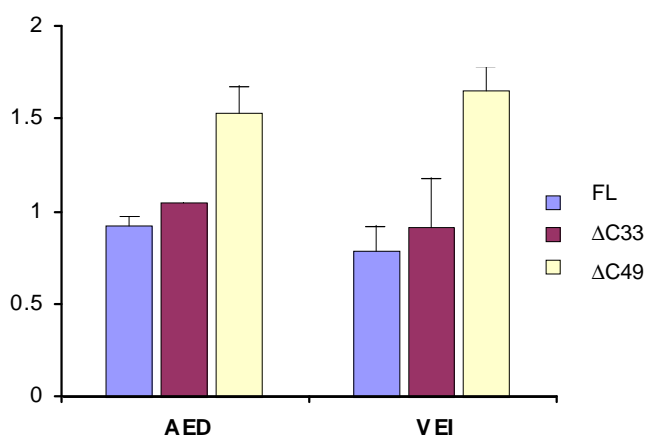


Abb.39: Induktion des TT4-Epitops durch exogene Beladung von hoch affinen Peptiden auf .220.B44-Transfektanten. Es wurden 2×10^6 Zellen 2h bei Raumtemperatur mit $100 \mu\text{M}$ EBNA6- (AED) oder Hsp90-Peptid (VEI) inkubiert und eine FACS-Färbung mit dem Antikörper TT4-A20 und Ziege-anti-Maus-Ig-FITC durchgeführt. In der Auswertung ist die mittlere Fluoreszenz (MCF) der Färbung für FITC im Verhältnis zur Färbung nach Inkubation mit einem Kontrollpeptid (ASYDKAKLK) gezeigt.

Es zeigte sich, daß die Inkubation mit den B44-Liganden im Fall der Δ C49-Transfektante zu einer deutlichen Induktion des TT4-A20-Epitops führt (Abb. 39). Die Beladung der hTpn- und Δ C33-Transfektante hingegen zeigte keinen oder kaum Einfluß auf die Ausbildung des TT4-A20 Epitops. Es ist anzunehmen, daß im Fall der hTpn-FL-Transfektante der Austausch von endogenen gegen exogen zugeführte Peptide kaum geschieht, da die natürlich gebundenen Peptide bereits sehr stabil gebunden sind. Auch die Ausbildung des TT4-A20-Epitops auf Δ C33-Transfektanten erfolgt durch die natürlich gebundenen Peptide schon relativ gut (siehe Färbung mit TT4-A20 unter 5.5.2), daher scheint eine weitere Steigerung durch exogene Peptidzugabe nicht stattzufinden. Wegen der beobachteten Erhöhung der TT4-A20-Reaktivität kann im Fall

der Δ C49-Transfektante hingegen vermutet werden, daß sich das TT4-A20-Epitop dort aufgrund einer suboptimalen Peptidbeladung nur schwach ausbildet.

5.6.4 In vivo-Stabilität von MHC-Klasse-I-Molekülen aus .220.B44-Transfektanten

Die Stabilität der MHC-Moleküle im Detergenzlysat gab einen ersten Hinweis auf eine bei Abwesenheit von humanem Tapasin voller Länge suboptimal erfolgende Peptidbeladung. Man geht davon aus, daß ein Klasse-I-Molekül, das mit schwach affinen Peptiden beladen ist, in vivo eine relativ kurze Lebensdauer besitzt, da das Dimer aus Schwerkette und β_2m ohne Peptid instabil ist (Parker et al., 1992). Aus diesem Grund versuchten wir weitere Hinweise auf die Qualität der gebundenen Peptide zu erhalten, indem wir die Halbwertszeit der zelloberflächenexprimierten MHC-Klasse-I-Moleküle auf .220.B44-Transfektanten bestimmten. Zunächst wurde der Export von neuen MHC-Molekülen aus dem ER durch Brefeldin A verhindert (Nuchtern et al., 1989), um einen definierten Pool an zelloberflächenexprimierten MHC-Molekülen zu analysieren. Nach 10 Stunden Inkubation wurde die verbleibende Menge an MHC-Molekülen durch eine FACS-Färbung mit dem dem Antikörper W6/32 bestimmt.

Rel. MCF (%)

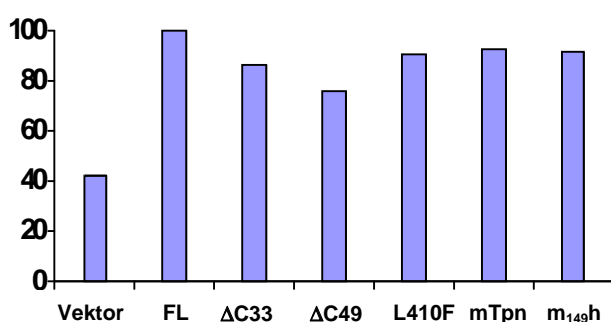


Abb.40: MHC-Klasse-I-Zelloberflächenflächen-expression nach 10h Behandlung mit Brefeldin A von .220.B44-Tapasin-Transfektanten. Es wurde eine FACS-Färbung mit dem Antikörper W6/32 ausgewertet. Die mittleren Fluoreszenzen nach BFA-Behandlung wurden ins Verhältnis zu denjenigen unbehandelter Zellen gesetzt.

Es zeigte sich auch nach 10 Stunden Behandlung mit Brefeldin A keine Abnahme der Menge an MHC-Klasse-I-Molekülen auf der hTpn-FL-Transfektante, wohingegen bei der L410F-, mTpn-, m149hTpn-, Δ C33- und Δ C49-Transfektante eine Reduktion bis zu 25% eintrat (Abb. 40). Fehlte Tapasin vollständig, war sogar eine Reduktion der HLA-B44 Menge auf 40% zu beobachten.

Dieses Experiment machte eine verkürzte Lebensdauer der MHC-Klasse-I-Moleküle insbesondere bei Abwesenheit von Tapasin voller Länge deutlich.

Zur Bestimmung der Lebensdauer der Klasse-I-Moleküle wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Es wurde das Verschwinden von ^{35}S -markierten HC/ $\beta_2\text{m}$ -Molekülen in den .220.B44-Transfektanten gemessen. Dazu wurde die nach mehreren Stunden noch vorhandene Menge an Klasse-I-Molekülen mit dem Antikörper W6/32 immunpräzipitiert.

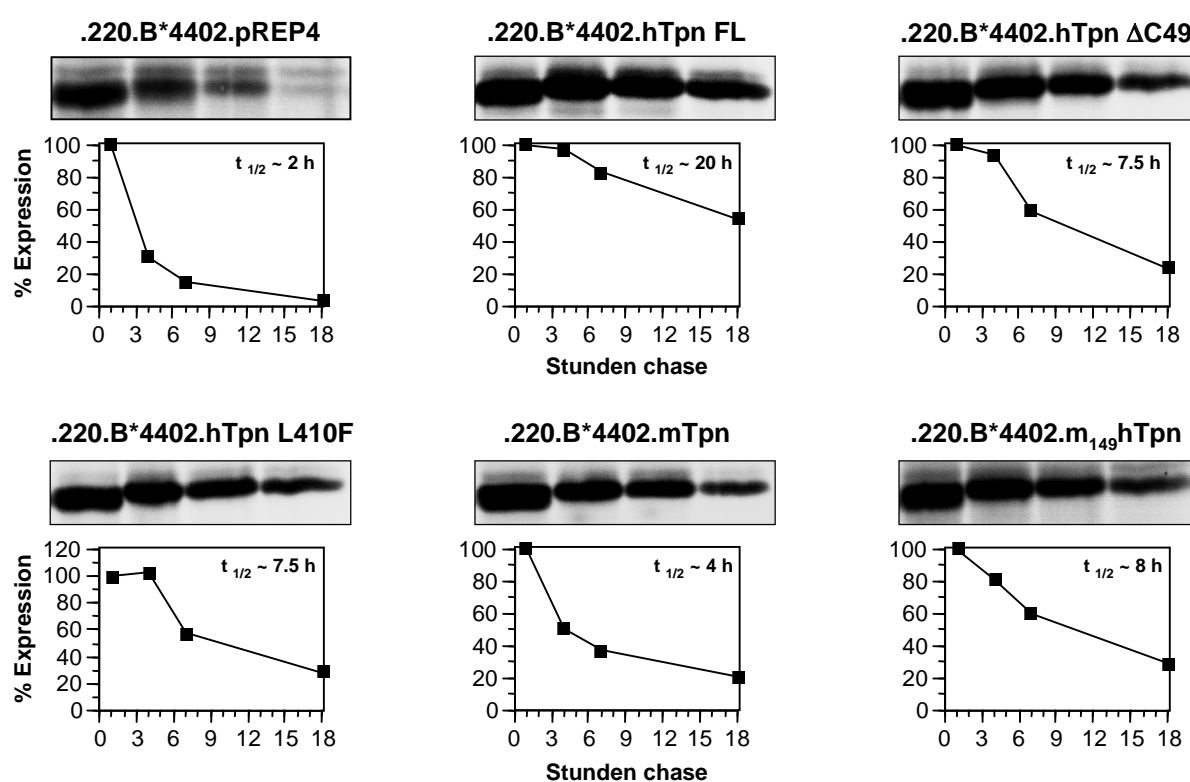


Abb.41: Zerfall der MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zelloberfläche von .220.B44-Transfektanten. Nach metabolischer Markierung mit ^{35}S -Methionin/Cystein wurde ohne Radioaktivität weiterkultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten ein Zellaliquot entnommen. Der Lyse in NP40 folgte die Präzipitation der MHC-Klasse-I-Moleküle mit W6/32 und eine SDS-PAGE-Auftrennung. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mittels Lumi-Analyser-Software vom Autoradiogramm.

Auf dem Autoradiogramm wurde abermals der schnellere Zerfall von zelloberflächenexprimierten Klasse-I-Molekülen auf jenen .220.B44-Transfektanten deutlich, die Mutationskonstrukte von Tapasin oder Maus-Tapasin exprimieren (Abb. 41). Während die HC/ $\beta_2\text{m}$ -Moleküle in der hTpn-Transfektante eine Halbwertszeit von

20 Stunden aufwiesen, waren die Werte für alle anderen Transfektanten deutlich geringer: mTpn: 4h, m_{149h}Tpn: 8h, ΔC49: 7.5h, L410F: 7.5h, pREP4: 2h.

5.6.5 Massenspektroskopische Analyse der Peptide auf .220.B44-Transfektanten

Nachdem aus den vorangehenden Ergebnisse vermuten werden konnte, daß bei Abwesenheit von humanem Tapasin voller Länge eine suboptimale Peptidbeladung von MHC-Klasse-I-Molekülen erfolgt, stellte sich die Frage, wie sich die auf den Transfektanten präsentierten Peptide in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Es ist wahrscheinlich, daß die Länge eines gebundenen Peptids die Stabilität des MHC-Komplexes beeinflussen kann. Wenn ein Peptid aus weniger Aminosäuren zusammengesetzt ist, als für eine Bindung an das MHC-Molekül optimal wäre, treten zwischen dem Peptid und der Grube zu wenig stabilisierende Wechselwirkungen auf (Fahnestock et al., 1994). Ist das Peptid hingegen zu lang, wird es wahrscheinlich, selbst bei einer erfolgreichen Bindung der Ankeraminosäuren, aus der Grube geschoben, da dort nur ein begrenzter Raum zur Verfügung steht (Zhang et al., 1992). In beiden Fällen werden bei der Bindung suboptimaler Peptide bestimmte Wechselwirkungen mit dem MHC-Molekül nicht eingegangen, was zu einer geringer Gesamtstabilität und Lebensdauer des Komplexes führen kann (Gakamsky et al., 1996).

Um die Peptidlängenverteilung auf den Tapasin-Transfektanten zu analysieren, wurden die isolierten Peptide durch Massenspektrometrie nach ihrer Länge aufgetrennt. Es wurden MHC-Klasse-I-Moleküle aus .220.B44-Transfektanten mit dem Antikörper W6/32 isoliert und in ein MALDI-TOF-Spektrometer gegeben. Im Spektrum wird eine lineare Auftrennung nach dem Molekulargewicht erreicht. Im Fall des HLA-B44-Moleküls sind unter Berücksichtigung der Ankeraminosäuren und der bevorzugten Aminosäuren an anderen Positionen beim 9-mer theoretisch Peptidmassen zwischen ca. 1070 und 1250 Dalton zu erwarten (DiBrino et al., 1995).

Generell konnten einzelne Peptidmassen immer wieder in verschiedenen Isolaten wiedergefunden werden (Abb. 42). Betrachtet man die Verteilung der Peaks

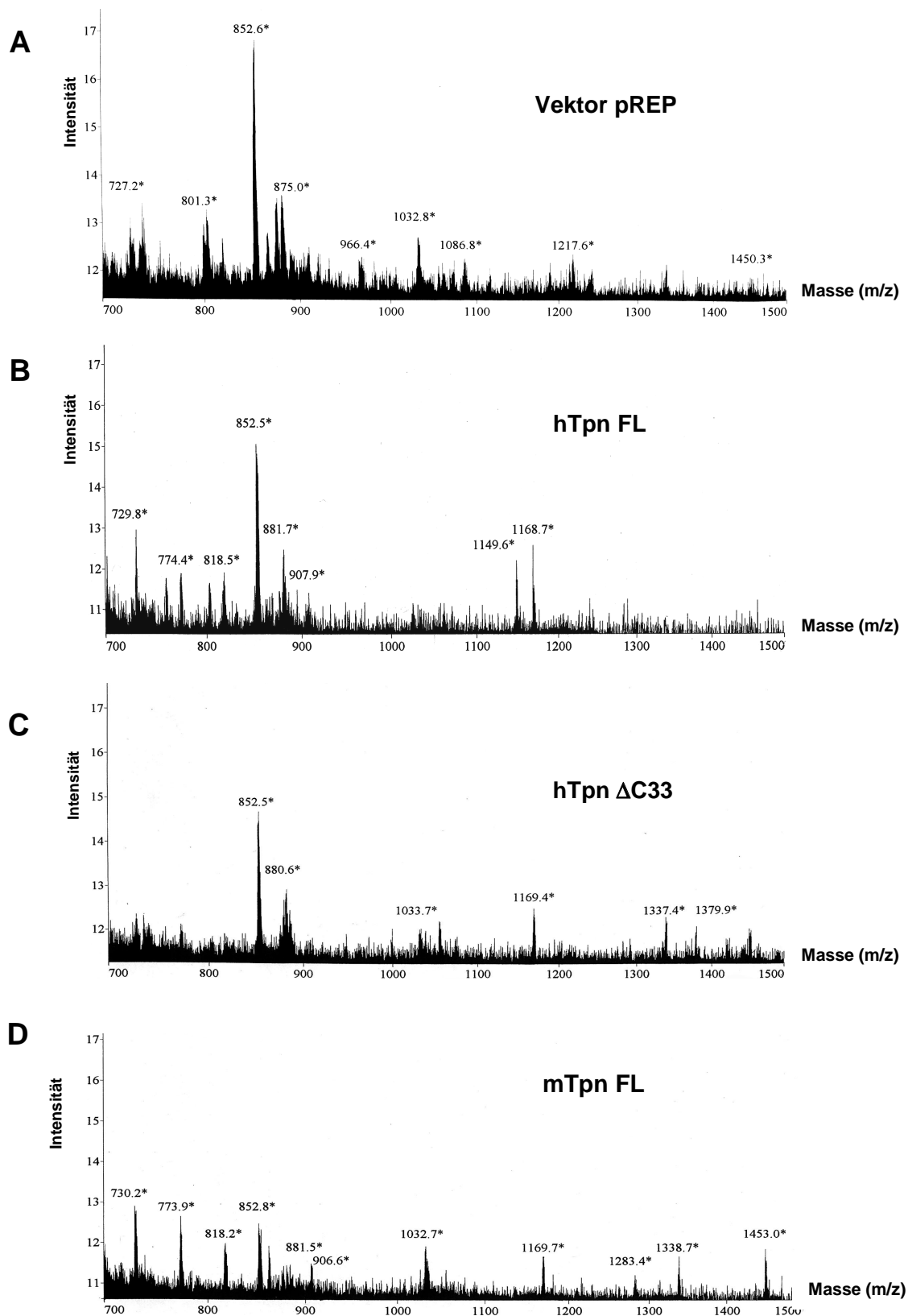


Abb. 42: MALDI-TOF Profile von .220.B44-Transfektanten. MHC-Klasse-I-Moleküle wurden mit dem Antikörper W6/32 immunpräzipitiert und gebundene Peptide mittels MALDI analysiert (siehe Methoden). Aufgetragen ist die Massenverteilung einfach ionisierter Peptide in Abhängigkeit zu ihrer relativen Menge.

oberflächlich, fällt auf, daß in der Probe der .220.B44.hTpn-Transfektante nur zwei Peptidmassen bei $m/z=1149$ und 1168 deutlich herausragten. Im Gegensatz zur pREP, $\Delta C33$ - und mTpn-Transfektante waren bei der hTpn-FL-Transfektante keine längeren Peptide als solche mit einer Masse von $m/z=1168$ detektierbar. Interessanterweise ließen sich in Gegenwart von $\Delta C33$ und mTpn prominente Massenpeaks im höheren Massenbereich detektieren. Anscheinend findet auch hier eine Bindung überlanger Peptide statt, die zur niedrigeren Stabilität der MHC-Klasse-I-Moleküle in diesen Transfektanten beitragen könnte.