

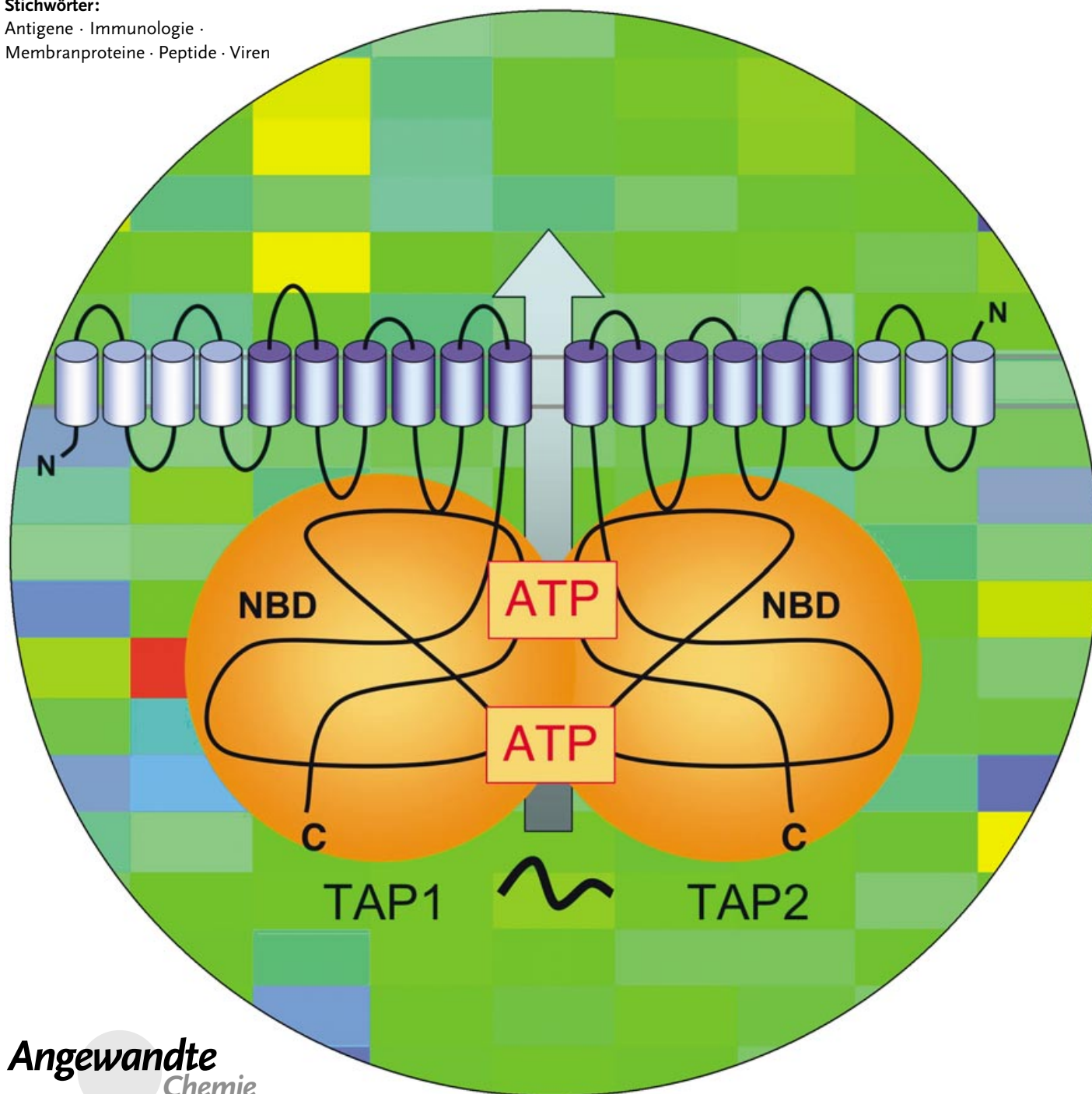
Immunologie

Funktion der Antigen-Transportmaschinerie TAP im zellulären Immunsystem

Silke Beismann-Driemeyer und Robert Tampé*

Stichwörter:

Antigene · Immunologie ·
Membranproteine · Peptide · Viren



Das Immunsystem besteht aus unterschiedlichen Typen von Zellen und Molekülen, deren komplexe Wechselwirkungen ein effizientes System zur Verteidigung eines Individuums gegen eindringende Pathogene und gegen eigene transformierte Zellen bilden. Angeborene Immunität bezeichnet die sofortige Reaktion auf Mikroorganismen, unabhängig von der Art des Eindringlings. Erworbene Immunität dagegen ruft eine spezifische Immunantwort hervor, wodurch das Individuum vor Fremdzellen von bestimmten Eindringlingen oder sogar vor Tumorzellen geschützt wird, und gibt lang anhaltenden Schutz bei wiederholter Exposition. Antikörper-Produktion und zellvermittelte Antworten sind die zwei verzahnten Zweige des erworbenen Immunsystems. Normalerweise aktivieren auf der Zelloberfläche präsentierte antigene Peptide die zelluläre Immunantwort. Der Transportkomplex TAP hat eine Schlüssel-funktion bei der Antigenprozessierung und -präsentation. Dieser Aufsatz diskutiert die neuesten Forschungsergebnisse zur Struktur und zum Mechanismus sowie zu den mit Krankheiten verbundenen Fehlfunktionen des TAP-Komplexes.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4105
2. Antigenprozessierung und -präsentation über MHC I	4106
3. TAP ist ein Mitglied der ABC-Protein-Superfamilie	4108
4. Strukturelle Organisation des TAP-Komplexes	4112
5. TAP ist ein Peptidtransportkomplex	4113
6. Verwandte Transporter	4115
7. TAP-Dysfunktion und Krankheiten	4116
8. Zusammenfassung und Ausblick	4118

1. Einleitung

Täglich wird unser Körper mit zahlreichen Bakterien, Viren, Toxinen und Parasiten konfrontiert. Als Schutz gegen diese Attacken haben Vertebraten mit ihrem erworbenen (adaptiven) und angeborenen (innaten) Immunsystem komplexe Abwehrmethoden entwickelt. Die B- und die T-Lymphocyten sind die Schlüsselkomponenten des adaptiven Immunsystems. B-Lymphocyten produzieren Antikörper, die in Blut und Lymphe zirkulieren. Die Antikörper binden an fremde Antigene und markieren die antigenpräsentierenden Zellen für die Zerstörung durch andere Immunzellen. Eine Art von T-Lymphocyten, die T-Helferzellen (CD4⁺), ist essenziell für die Koordination der gesamten Immunantwort. Die andere Art, die cytotoxischen T-Zellen (CD8⁺), tötet dagegen infizierte oder maligne Zellen direkt (Übersichten hierzu siehe Lit. [1–4]).

Der mit der Antigenprozessierung assoziierte Transporter (*transporter associated with antigen processing*, TAP)^[*] spielt eine bedeutende Rolle in der adaptiven Immunantwort. TAP transportiert Peptide, die von endogenen Proteinen stammen, vom Cytosol in das endoplasmatische Retikulum (ER). Dieser Schritt ist für die anschließende Präsentation der an Moleküle des Hauptkompatibilitätskomplexes I (*major histocompatibility complex I*, MHC I) gebundenen Peptide auf der Zelloberfläche erforderlich.^[5,6] CD8⁺-Zellen können „fremde“ Peptide von z.B. viralen oder tumorspezifischen Proteinen erkennen und die infizierten oder transformierten Zellen töten. Viren haben ausgefeilte Mechanismen entwickelt, um der Immunerkennung zu entgehen. Mehrere Viren haben TAP als Angriffspunkt gewählt und blockieren daher

an dieser Stelle den Antigenpräsentationsweg (Übersichten hierzu siehe Lit. [7–9]).

Auch Tumore können die MHC-I-Expression an der Zelloberfläche z.B. durch Hemmung der Expression von TAP beeinträchtigen. Ferner werden Mutationen in TAP, die zu funktionslosen Proteinen führen, mit Krebsentstehung und einer schweren Immunschwächekrankheit, dem Bare Lymphocyte Syndrome (BLS), in Verbindung gebracht.^[10–12] Da der Verlust der Funktionsfähigkeit von TAP mit einer schweren Störung des Immunsystems einhergeht, ist die Aufklärung der Struktur und Funktion von TAP sowie des Mechanismus des Peptidtransports von wesentlicher Bedeutung für die biomedizinische Forschung.

TAP gehört zur Familie der ABC-Transporter, von denen einige an schweren Erbkrankheiten, z.B. der zystischen Fibrose, Morbus Stargadt, der Tangier-Krankheit und Adrenoleukodystrophie, beteiligt sind.^[13,14] ABC-Transporter bestehen aus zwei Transmembrandomänen (TMDs), die vermutlich die Translokationspore für das Substrat bilden, und zwei Nucleotidbindungsdomänen (NBDs), die ATP hydrolysieren und dadurch die für den Substrattransport notwendige Energie bereitstellen. Trotz intensiver Studien an vielen ABC-Transportern aus unterschiedlichen Organismen sind einige prinzipielle Fragen zu ihrer Funktion immer noch ungeklärt, z.B. wie viele ATP-Moleküle pro Transportzyklus benötigt werden und wie die Aktivität der beiden NBDs koordiniert wird. Weiterhin besteht starkes Interesse daran zu

[*] Dr. S. Beismann-Driemeyer, Prof. Dr. R. Tampé
Institut für Biochemie, Biozentrum Frankfurt
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Marie-Curie-Straße 9, 60439 Frankfurt am Main (Deutschland)
Fax: (+49) 69-798-29495
E-mail: tampe@em.uni-frankfurt.de

verstehen, wie die verschiedenen Domänen eines ABC-Transporters während des Translokationszyklus miteinander kommunizieren.

TAP ist einer der am intensivsten untersuchten ABC-Transporter und könnte daher ein geeignetes Modell für viele ABC-Transporter sein.^[15–17] Dieser Aufsatz gibt den aktuellen Stand der Forschung auf diesem Gebiet wieder und diskutiert einige der Fragen, die bislang noch nicht zufriedenstellend beantwortet werden konnten.

2. Antigenprozessierung und -präsentation über MHC I

2.1. Überblick

Antigene sind Substanzen, die entweder eine angeborene oder eine erworbene Immunreaktion auslösen. Die meisten Antigene sind Polypeptide oder Polysaccharide. Diese werden während einer Reaktion des angeborenen Immunsystems durch lösliche Antikörper (Immunglobuline) erkannt, die von B-Zellen sezerniert werden. Bei einer Reaktion des erworbenen Immunsystems werden die Antigene durch membrangebundene Immunglobuline auf B-Lymphocyten oder durch antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren (TCRs) im extrazellulären Raum gebunden. TCRs sind spezifisch für intrazellulär prozessierte Antigene, die entweder an MHC-I- oder MHC-II-Moleküle an der Zelloberfläche gebunden sind.

MHC-II-Moleküle findet man ausschließlich auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen. Sie präsentieren meistens Peptide von extrazellulären Pathogenen, die durch Phagozytose in die Zelle gelangt sind. Anschließend interagiert der MHC-II-Peptid-Komplex durch Bindung an den TCR und CD4⁺ mit CD4⁺-T-Lymphocyten. Cytokine, die sowohl die humorale (antikörperabhängige) als auch die zellabhängige Immunität vermitteln, werden aktiviert und aus der Zelle geschleust. Im Unterschied hierzu präsentieren MHC-I-Moleküle Peptide von Viren, intrazellulär replizierenden Bakterien oder tumorspezifischen Proteinen. CD8⁺-T-Lym-

phocyten erkennen den Komplex aus MHC-I-Molekülen und intrazellulärem Peptid auf der Zelloberfläche durch die Bindung an ihre TCR- und CD8⁺-Moleküle. Die infizierten Zellen werden lysiert oder durchlaufen den programmierten Zelltod (Apoptose).

Neben antigenen Peptiden präsentieren MHC-I-Moleküle auch ständig Peptide von normalen zellulären Proteinen, ein Prozess, der essenziell für die Selektion von T-Lymphocyten im Thymus ist. T-Lymphocyten, deren Antigen-Rezeptoren zelleigene Peptide mit hoher Affinität binden und sich daher autoreaktiv verhalten, werden eliminiert, während T-Lymphocyten, deren Antigen-Rezeptoren „fremde“ Peptide erkennen, überleben (negative und positive Selektion; Übersichten hierzu siehe Lit. [18–20]). Der komplexe MHC-I-abhängige Antigenprozessierungs- und Antigenpräsentationsweg ist in nahezu allen kernhaltigen Zellen konstitutiv aktiv, die Aktivität wird jedoch durch inflammatorische Cytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) erhöht. Analog zu den Genchips, auf denen Tausende von cDNA-Fragmenten für die Erkennung durch komplementäre RNA-Moleküle präsentiert werden,^[23] präsentieren die kernhaltigen Zellen Millionen unterschiedlicher Peptid-Epitope für die Inspektion durch CD8⁺-Zellen.^[21,22]

Der MHC-I-Weg besteht aus einem cytosolischen Antigenprozessierungsteil, der Bildung eines makromolekularen Peptidbeladungskomplexes (*peptide-loading complex*, PLC) im ER und dem Transport der mit Peptid beladenen MHC-I-Moleküle zur Zelloberfläche. Die Aufgabe von TAP besteht darin, die Peptide über die ER-Membran zu transportieren und die Beladung der MHC-I-Moleküle zu optimieren. TAP verknüpft daher den cytosolischen mit dem ER-ständigen Teil des Antigenpräsentationswegs (Abbildung 1).

2.2. Antigenprozessierung

Der Proteinabbau im Cytosol erfolgt hauptsächlich durch das Proteasom, ein multikatalytischer Protease-Komplex, der in Organismen aus allen drei Lebensreichen (Eukarya, Bakterien und Archaea) vorkommt.^[24,25] Das Proteasom enthält ein 20S-Kernstück (≈ 700 kDa) aus 28 Unterein-



Silke Beismann-Driemeyer, Jahrgang 1970, studierte Biologie an den Universitäten Göttingen und Dublin. Nach der Diplomarbeit in Pflanzenphysiologie bei D. G. Robinson wechselte sie in die Biochemie zu R. Sterner an der Universität zu Köln. Dort promovierte sie 2001 mit einer Arbeit über die Struktur und Funktion eines Enzymkomplexes von *Thermotoga maritima*. Nach einem Interim am Deutschen Krebsforschungszentrum in der Abteilung für Immunchemie bei W. Dröge wechselte sie in die Gruppe von R. Tampé am Biozentrum der Universität

Frankfurt. Dort arbeitet sie derzeit an der Expression und biochemischen Charakterisierung von humanen ABC-Transportern.



Robert Tampé, Jahrgang 1961, studierte Chemie an der TU Darmstadt und promovierte dort 1989 in Biochemie bei H.-J. Galla mit einer Arbeit über Lipid-Protein-Wechselwirkungen. An der Stanford University forschte er zusammen mit H. M. McConnell an der Struktur und Funktion von MHC-II-Komplexen. Von 1992 bis 1998 war er Nachwuchsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried und betreute gleichzeitig eine Forschungsgruppe am Institut für Biophysik an der TU München, wo er 1996 in Biochemie habilitierte. 1998 wurde er als C4-Professor des Instituts für Physiologische Chemie an die Universität Marburg berufen, 2001 folgte er dem Ruf auf eine C4-Professur an das Institut für Biochemie am Biozentrum der Universität Frankfurt.

Frankfurt. Dort arbeitet sie derzeit an der Expression und biochemischen Charakterisierung von humanen ABC-Transportern.

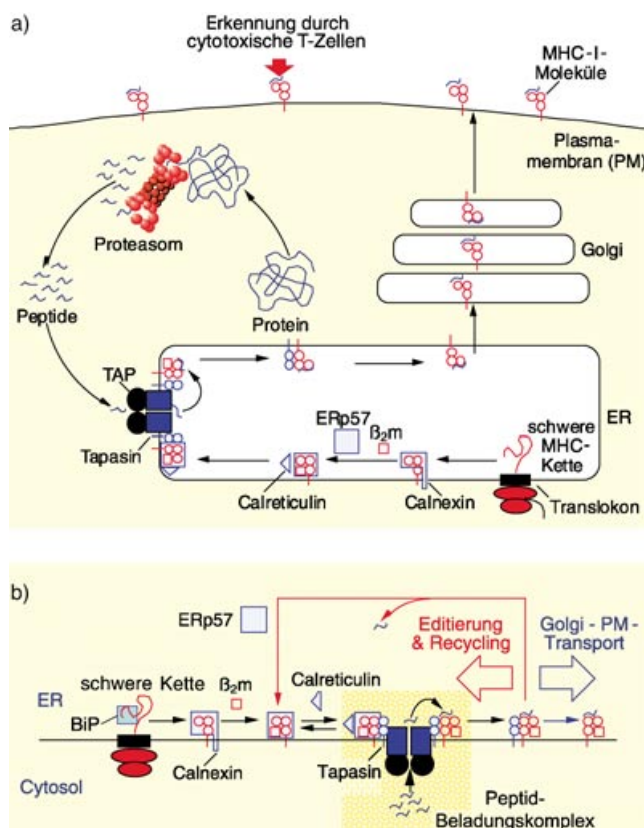


Abbildung 1. a) Der Weg der Antigenprozessierung und -präsentation über MHC-I-Moleküle. Proteine werden im Cytosol vom Proteasom abgebaut, und die gebildeten Proteinbruchstücke (Peptide) werden durch TAP in das ER transportiert. Anschließend werden die Peptide innerhalb des TAP-Tapasin-MHC-Komplexes auf MHC-I-Moleküle geladen. Peptid-MHC-Komplexe wandern zur Zelloberfläche, wo sie ihre antigene Fracht T-Zell-Rezeptoren auf CD8⁺-Zellen präsentieren. b) Assemblierung von MHC-I-Molekülen im ER, koordiniert durch Faltungsenzyme (Chaperone). Details siehe Text.

heiten, die in vier Stapeln aus heptameren Ringen angeordnet sind.^[26,27] Die katalytischen β -Untereinheiten bilden die inneren Ringe, während die äußeren Ringe aus den α -Untereinheiten aufgebaut sind, die strukturelle und regulatorische Aufgaben erfüllen. In Vertebraten hat eine spezielle Form des Proteasoms, das Immunproteasom, eine zusätzliche Aufgabe übernommen: Es stellt Peptide für die MHC-I-abhängige Präsentation bereit. IFN- γ bewirkt den Einbau von LMP2 (*low molecular weight protein*), LMP7 und MECL-1 (*multicatalytic endopeptidase complex-like protein-1*) anstelle der konstitutiven katalytisch aktiven β -Untereinheiten in das Proteasom.^[28–30] Durch Rekrutierung von regulatorischen 19S-Untereinheiten wird das 26S-Immunproteasom (≈ 1500 kDa) gebildet, bei dem der Proteinabbau anders als beim 20S-Proteasom in ATP-abhängiger Weise erfolgt.^[25,31,32] Das 26S-Proteasom spaltet in erster Linie ubiquitinylierte Proteine in Peptide von 3–30 Aminosäureresten, wobei das Optimum bei 8–11 Resten liegt.^[33–37] Die Größenverteilung der vom Proteasom erzeugten Peptide überlappt mit der Größenverteilung der Peptide, die von TAP und MHC-I-Molekülen erkannt werden.

Das Immunproteasom generiert vorzugsweise Peptide mit hydrophoben und basischen C-Termini, die sowohl von TAP als auch von MHC-I-Molekülen bevorzugt gebunden werden.^[38–40] Die vom Proteasom erzeugten Peptide enthalten somit bereits geeignete C-Termini für die folgenden Schritte im Antigenprozessierungs- und Antigenpräsentationsweg. Sie können aber noch N-terminal von Aminoexopeptidasen im Cytosol und im ER verkürzt werden, um so eine für die Beladung der MHC-I-Moleküle optimierte Länge und einen optimierten N-Terminus zu erhalten.^[41–45]

2.3. MHC-I-Beladung und Antigenpräsentation

Im Cytosol erzeugte antigene Peptide müssen von TAP in das ER-Lumen überführt werden. Die Assoziation der Peptide mit TAP scheint in erster Linie diffusionsabhängig zu erfolgen. Ein Problem dabei ist, dass freie Peptide schnell von cytosolischen Peptidasen wie der Thimet-Oligopeptidase abgebaut werden.^[46,47] Möglicherweise entkommen einige Peptide diesem Schicksal durch Bindung an Chaperone, die die Übertragung auf TAP vermitteln.^[48–50] Die meisten werden jedoch von den cytosolischen Peptidasen eliminiert, sodass nur ein kleiner Teil für den Transport in das ER und die anschließende Beladung von neu synthetisierten MHC-I-Molekülen übrig bleibt.^[51,52]

Zur MHC-I-Beladung wird ein aus verschiedenen Proteinen bestehender, makromolekularer PLC benötigt. Die MHC-I-Moleküle bilden einen Teil des PLC. Sie bestehen aus einer polymorphen schweren Kette (*heavy chain*, HC) von etwa 46 kDa, die für die Peptidspezifität ausschlaggebend ist, einer invarianten leichten Kette, auch als β_2 -Mikroglobulin (β_2m) bezeichnet (12 kDa), und einem Peptid, das zur Stabilisierung des MHC-I-Komplexes notwendig ist.^[53,54] Neu synthetisierte, ungefaltete MHC-I-HCs assemblieren mit dem Chaperon BiP. Dies erfolgt entweder gleichzeitig mit oder vor der Bindung an ein zweites Chaperon, Calnexin.^[55,56] Die Thiol-Oxidoreduktase ERp57, die an der korrekten Faltung und der Bildung von intrazellulären Disulfid-Brücken beteiligt zu sein scheint, assoziiert mit der HC.^[57,58] Ein weiteres Chaperon, Calreticulin, ersetzt Calnexin, und die Calreticulin-gebundenen HCs bilden mit β_2m ein MHC-I-Heterodimer (HC- β_2m). Als nächstes binden Tapasin, ein TAP-assoziiertes transmembranes Glycoprotein von 48 kDa, und TAP an den intermediären Komplex, wodurch der PLC vervollständigt wird (Abbildung 1 b).^[59,60]

Für Tapasin wurden mehrere wichtige Rollen im Peptid-beladungsprozess vorgeschlagen: 1) Stabilisierung des TAP1-TAP2-Komplexes durch Bindung an die Transmembrandomänen von TAP1 und TAP2;^[61–63] 2) als Brückenglied zwischen TAP und dem HC- β_2m -Dimer, wodurch die nötige Nähe von Peptid-Donor und Peptid-Acceptor hergestellt wird;^[64–66] 3) Stabilisierung von noch nicht beladenen HC- β_2m -Molekülen;^[64] 4) Optimierung der Peptidfracht auf Peptiden, die kinetisch stabil an HC- β_2m binden („Peptid-Editierung“).^[62,67,68] Die MHC-I-Moleküle werden innerhalb des PLC mit Peptiden beladen. Die Bindung erfolgt über die freien N- und C-Termini der Peptide und ein oder zwei meist hydrophobe „Ankerreste“. Durch die proteasomale Spaltung

wurde ein hydrophober oder basischer C-terminaler Ankerrest erzeugt, wodurch das Peptid auch zu einem attraktiven Substrat für TAP wird (siehe Abschnitt 5.1). Wenn zunächst ein suboptimales Peptid von HC- β_2 m gebunden wird, könnte Tapasin seine vermeintliche Editierfunktion ausüben.^[62,65,67] Dabei werden die Peptide entweder verkürzt oder gegen andere Peptide ausgetauscht, bis schließlich ein Repertoire an hoch affinen Peptiden an die HC- β_2 m-Heterodimere gebunden ist. Die so entstandenen kinetisch stabilen HC- β_2 m-Peptidkomplexe treten in den Sekretionsweg ein und werden zur Plasmamembran transportiert, wo ihre antigene Fracht von cytotoxischen T-Zellen inspiziert werden kann.

3. TAP ist ein Mitglied der ABC-Protein-Superfamilie

ABC-Proteine bilden in vielen Organismen die größte Familie paraloger Proteine.^[69] Das humane Genom beispielsweise enthält mindestens 49 Mitglieder dieser Proteinfamilie (<http://www.humanabc.org>). Die humanen ABC-Transporter werden nach Sequenzhomologie in sieben Unterfamilien eingeteilt, die mit ABCA bis ABCG bezeichnet werden. TAP1 und TAP2 gehören mit neun weiteren Vertretern der ABCB-Unterfamilie an (ABCB2 und ABCB3).^[70]

Die Familie der ABC-Proteine wird durch die Homologie innerhalb der ATP-Bindungskassette (ATP-binding cassette, ABC) definiert.^[71] Die ABC-Region enthält drei hoch konservierte Motive, das Walker-A- und das Walker B-Motiv sowie die C-Schleife (auch ABC-Signatur-Motiv genannt). Die Walker-A- und Walker-B-Motive kommen in vielen ATP-bindenden Proteinen vor,^[71] während die C-Schleife spezifisch für ABC-Proteine ist.^[72] ABC-Proteine kommen in allen Organismen von Archaea und Bakterien bis hin zu Eukaryoten vor. Sie sind an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt, z. B. an der Nährstoffaufnahme, am Lipidtransport, an der Ionen- und Osmolyt-Homöostase und der Antigenprozessierung. Die meisten agieren als ATP-abhängige Transporter im Transfer von Substraten durch zelluläre Membranen. ABC-Transporter können eine Vielzahl chemisch diverser Substrate, unter anderem Ionen, Kohlenhydrate, Aminosäuren, Antibiotika, Lipide und sogar große Proteine (z. B. Hämolyisin A, 110 kDa), transportieren. Die Bedeutung von ABC-Proteinen im menschlichen Organismus wird durch die Tatsache illustriert, dass bislang Mutationen in 14 ABC-Transporter-Genen mit Erbkrankheiten assoziiert werden konnten.^[13,70] Mindestens acht humane ABC-Transporter sind in der Lage, amphipathische Substanzen einschließlich vieler Chemotherapeutika aus der Zelle zu schleusen (Übersicht hierzu siehe Lit. [73]). Ferner vermitteln ABC-Transporter des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*, der oft bei immungeschwächten Personen wie AIDS-Patienten ein zentrales Problem ist, Resistenz gegen antifungale Azol-Regentien.^[74,75]

Alle ABC-Transporter weisen eine gemeinsame Architektur auf, und vermutlich gibt es nur einige wenige Mechanismen zur Energetisierung der Substrattranslokation durch Membranen. Es werden daher als nächstes einige allgemeine Aspekte von ABC-Transportern erläutert, ehe wir näher auf die Struktur und Funktion von TAP eingehen.

3.1. Architektur der ABC-Transporter

3.1.1. Allgemeine Aspekte der Architektur

Einige ABC-Proteine, z. B. der ubiquitäre RNase-L-Inhibitor (ABCE1) und das bakterielle Rad50-Protein, haben keine Transporterfunktion. Diese „Nicht-Transporter“ sind lösliche Proteine, die verschiedene Rollen im Zellmetabolismus spielen, z. B. bei der DNA-Erhaltung und -Reparatur oder der Regulation der Protein-Biosynthese. Ferner rekrutiert das humane Immunschwäche-Virus (*human immunodeficiency virus*, HIV) das lösliche Wirtprotein ABCE1 für seine Kapsid-Assemblierung.^[76] Alle ABC-Proteine besitzen zwei hoch konservierte NBDs mit den klassischen ABC-Motiven. Grundsätzlich haben ABC-Transporter eine Minimalzusammensetzung aus zwei NBDs und zwei wenig konservierten TMDs, die die Transporter in der Plasmamembran oder in intrazellulären Membranen (ER, Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen, Vakuolen) verankern. In Prokaryoten werden die ABC-Transporter von zwei bis vier Genen codiert, wobei die beiden NBDs, die beiden TMDs oder eine NBD mit einer TMD fusioniert sein können (Abbildung 2).

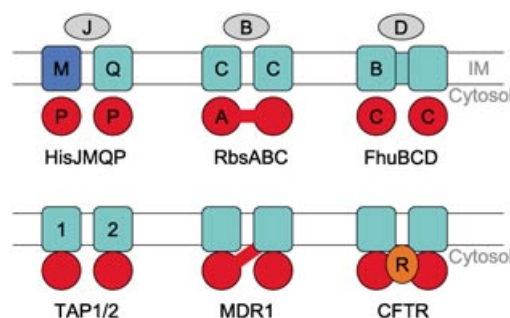


Abbildung 2. Domänenorganisation von ABC-Transportern. Die Transmembrandomänen (TMDs) sind in Blau dargestellt, Nucleotidbindungsdomänen (NBDs) in Rot. Anhand ausgewählter Beispiele werden die verschiedenen Organisationsmöglichkeiten von ABC-Transportern von Bakterien (obere Reihe) und Mensch (untere Reihe) gezeigt. HisJMQP, RbsABC und FhuBCD sind bakterielle Import-Systeme, die der Aufnahme von Histidin, Ribose bzw. Eisenhydroxamat dienen. Diese Importer arbeiten mit einem periplasmatischen Substratbindungsprotein zusammen (grau). TAP, Pgp und CFTR sind Exporter, die jeweils für den Transport von Peptiden, Chemotherapeutika und Chlorid-Ionen zuständig sind. Die zusätzliche regulatorische Domäne R von CFTR ist in Orange dargestellt.

Ferner assoziieren bakterielle Importer mit periplasmatischen Substrat-Bindungsproteinen, die eine hohe Affinität zum Substrat haben und durch Wechselwirkung mit den TMDs den Substrat-Import regulieren.^[77] Bakterielle Export-Systeme dagegen assoziieren in der Regel mit Membranfusionsproteinen und/oder Faktoren in der äußeren Membran (*outer membrane factors*).^[78] Die ABC-Transporter von Eukaryoten bestehen entweder aus einem (TMD-NBD)₂-Fusionsprotein („Gesamt-Transporter“) oder aus zwei TMD-NBD-Fusionsmodulen („Halb-Transporter“). Manche Transportkomplexe enthalten daneben noch weitere Domänen. Ferner gibt es einige ABC-Proteine mit der gleichen Architektur wie die ABC-Transporter (zwei NBDs plus zwei

TMDs), die aber als Kanäle oder Transportregulatoren wirken. Ein Beispiel hierfür ist ein Chloridkanalprotein, das Zystische-Fibrose-Protein (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR). Mutationen im CFTR-Gen verursachen die Entstehung von Mukoviszidose, einer der häufigsten tödlichen Erbkrankheiten in der westlichen Bevölkerung.^[79,80] Ein weiteres Beispiel ist der Sulfonylharnstoff-Rezeptor (*sulphonylurea receptor*, SUR), der eine Untereinheit des ATP-sensitiven Kaliumkanals (K_{ATP} -Kanal) in pankreatischen β -Zellen ist. Innerhalb dieses Kanalkomplexes arbeiten SUR1, SUR2A oder SUR2B wahrscheinlich als ATP-Sensor, während die anderen Untereinheiten, $K_{IR}6.1$ oder $K_{IR}6.2$, den eigentlichen Kaliumkanal bilden.^[81]

3.1.2. Nucleotidbindungsdomänen

Die NBDs von ABC-Transportern sind hoch konserviert. Die Sequenzhomologie liegt bei über 25 %, unabhängig davon, ob es sich um Sequenzen aus Pro- oder Eukaryoten handelt. Die NBDs agieren gewissermaßen als „Motor-Domänen“, da sie die chemische Energie von ATP in mechanische Arbeit umwandeln, die in Konformationsänderungen in den TMDs umgesetzt wird. Die NBDs bestehen aus ca. 250 Aminosäuren und enthalten mehrere charakteristische Motive. Die markantesten sind das Walker-A- und das Walker-B-Motiv sowie die C-Schleife (ABC-Signatur) (Abbildung 3). Das Walker-A-Motiv weist die Konsens-Sequenz $\text{GX}_4\text{GKS/T}$ auf (X: beliebige Aminosäure im Einzelbuchstabencode), das Walker-B-Motiv $\Phi_4\text{D}$ (Φ : hydrophobe Aminosäure). Die C-Schleife befindet sich zwischen dem Walker-A- und dem Walker-B-Motiv und hat die Konsens-Sequenz LSGGQ . Anders als die Walker-A- und Walker-B-Motive, die auch in anderen ATP- und GTP-bindenden Proteinen vorkommen, ist die C-Schleife spezifisch für ABC-Proteine. Allerdings enthalten G-Proteine das verwandte Motiv GGQR/K/Q .^[82] Die D-Schleife befindet sich C-terminal vom Walker-B-Motiv und hat die Konsens-Sequenz SALD . Weitere Motive enthalten nur einen einzigen konservierten Rest (Q, P, H oder G), sind aber dennoch charakteristisch für ABC-Proteine (siehe Details in Lit. [83]).

Bis jetzt (Oktober 2003) wurden die Strukturen von neun NBDs von ABC-Transportern aufgeklärt.^[84–93] Diese NBDs weisen alle eine charakteristische Faltung aus zwei Untereinheiten (Armen) auf. Arm I ist eine F1-ATPase-artige Domäne und enthält die Walker-A- und Walker-B-Motive. Der α -helicale Arm II, der spezifisch für ABC-Proteine ist, dient vermutlich als Signaltransferdomäne. Arm II ist im rechten Winkel zum katalytischen Arm I angeordnet und enthält die C-Schleife. Die Scharnier-Region, die Arm I und Arm II verbindet, befindet sich zwischen der Q-Schleife und der P(Pro)-Schleife.^[89,94] Abbildung 3 zeigt als Beispiel die Struktur der TAP1-NBD.^[91]

Die beiden NBDs mehrerer ABC-Transporter können in Abwesenheit der TMDs dimerisieren.^[95-97] Die Dimerisierung der NBDs von Rad50, einer an der DNA-Doppelstrangreparatur beteiligten bakteriellen ABC-ATPase, wird durch ATP-Bindung induziert. Die Dimerisierung verursacht eine Bewegung von Arm II relativ zu Arm I sowie eine Reorganisation der P(Pro)- und Q-Schleifen-Regionen.^[98] Die Struk-

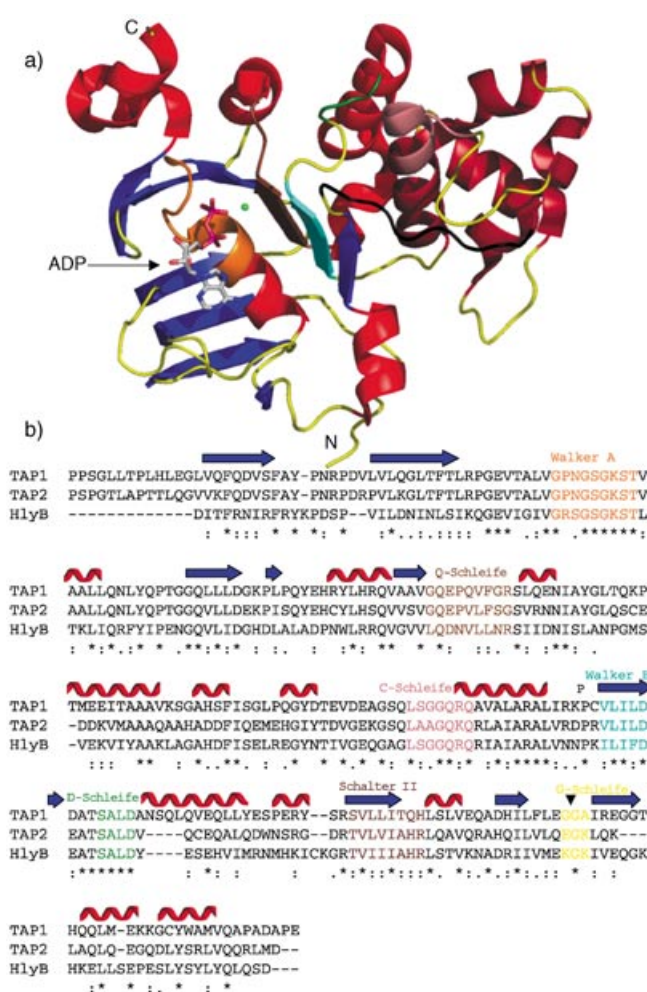


Abbildung 3. a) Struktur der Nucleotidbindungsdomäne (NBD) von humanem TAP1 (PDB-Code 1JJ7).^[91] Helices sind in Rot, β -Faltblätter in Blau und Schleifen in Gelb dargestellt. Gebundenes ADP ist detailliert gezeigt, wobei Stickstoffatome in Blau erscheinen, Sauerstoffatome in Rot, Phosphoratome in Magenta und das Magnesiumion in Grün. Charakteristische Motive (Walker A und B, Q-, C-, P(Pro)-, D- und G-Schleifen, Schalter-II-Region) haben die gleiche Farbcodierung wie in der in Abbildung 3b gezeigten Sequenzalignierung. Diese Abbildung sowie die Abbildungen 4a, b, 5 und 9b wurden mit PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net/>) erstellt. b) Sequenzvergleich der NBDs von humanem TAP1, TAP2 sowie von Hämolyisin B von *E. coli*. Die Sekundärstrukturelemente beziehen sich auf die Struktur der TAP1-NBD. Die Alignierung wurde mit ClustalW erstellt.^[222]

tur des MJ0796-Dimers, eines ABC-Proteins des Archaeons *Methanococcus jannaschii*, ähnelt Rad50.^[87] Die NBDs beider ABC-Proteine sind in einer Kopf-Schwanz-Orientierung angeordnet (Abbildung 4a).^[87,93,98] Zuvor beschriebene Strukturen von NBD-„Dimeren“ in Rücken-an-Rücken-Orientierung oder mit ineinander verzahnten NBDs werden im Nachhinein als rein kristallographische Dimere gedeutet.^[89,90]

Gebundene Nucleotide wurden sowohl an monomeren wie auch dimeren NBD-Strukturen gefunden. Im Unterschied zu anderen ATPasen sind die Nucleotide in den monomeren NBDs der ABC-Proteine stark lösungsmittel-exponiert.^[86,88,91] Im NBD-Dimer wird ein ATP-Molekül

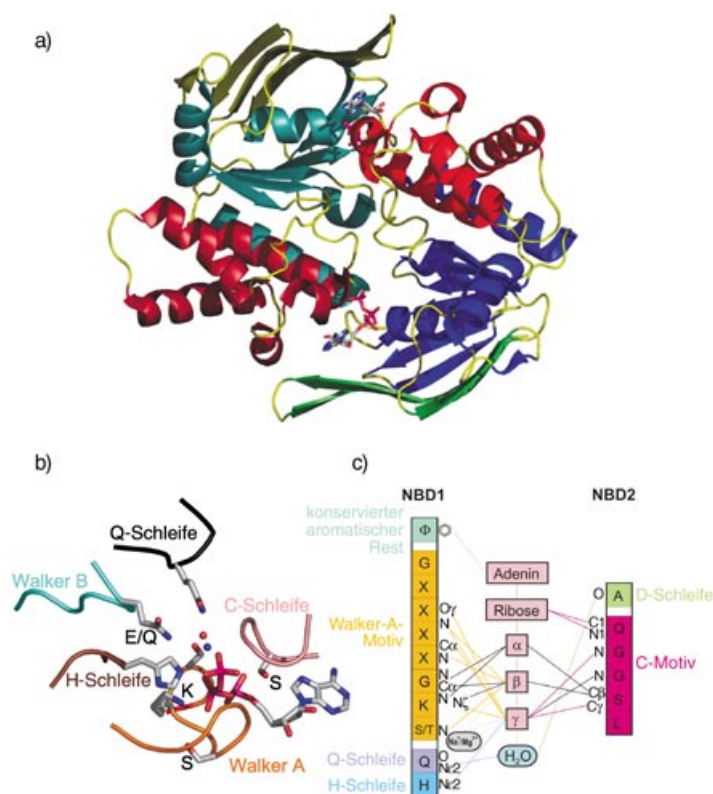


Abbildung 4. ATP-Bindung induziert die Bildung eines Nucleotid-Sandwich-Dimers. a) Dimere Struktur von MJ0796 (PDB-Code 1L2T).^[87] Die ATP-bindende Kern-Untereinheit (Arm I, F₁-ATPase-artige Domäne) ist in Blau dargestellt, die α-Untereinheit (Arm II, Signalisierungsdomäne) in Rot und die antiparallele β-Untereinheit in Grün. b) Katalytisches Zentrum der ATP-Hydrolyse. Aminosäure-Seitenketten und ATP sind detailliert dargestellt (O orange, N blau, P magenta). Das α-Kohlenstoff-Rückgrat der Walker-A-Schleife (mit zwei Serinen und einem Lysin) ist in Gelb, die C-Schleife (mit einem Serin) des anderen Monomers in Pink, die Q-Schleife in Dunkelbraun, die H-Schleife in Braun und das Walker-B-Motiv (mit dem Aminosäure-Austausch E171Q) in Cyan dargestellt. Das Natrium-Ion ist als roter Punkt und das koordinierende Wassermolekül als blauer Punkt gezeigt. c) Wechselwirkungen, die das ATP und sein Gegenion Mg²⁺ (oder Na⁺) stabilisieren. Schwarze Linien repräsentieren Van-der-Waals-Wechselwirkungen, farbige Linien Wasserstoffbrücken. Die Kontakte zum ATP-Gegenion sind als graue Linien und die π-π-Wechselwirkungen zwischen der aromatischen Aminosäure nahe dem N-Terminus und der Adeninbase als gestrichelte grüne Linie gezeigt.

hauptsächlich durch Reste des Walker-A-Motivs sowie der Q- und der H-Schleife der einen NBD und durch Reste der C-Schleife der zweiten NBD gebunden (Abbildung 4b,c). Das Alanin der D-Schleife der zweiten NBD trägt indirekt (über ein Wassermolekül) zur ATP-Bindung bei. Außerdem wird die Purin-Base des ATP durch π-π-Wechselwirkungen zwischen einem konservierten aromatischen Rest nahe dem N-Terminus der NBD (Y572 im humanen TAP1) und dem Adeninring fixiert, wodurch sich erklärt, warum ATP, GTP oder UTP gleichermaßen als Energiequelle genutzt werden können. Die NBD-NBD-Grenzfläche wird hauptsächlich von Resten des Walker-A-Motivs sowie der C-, D- und H-Schleife (die auch als Schalter II bezeichnet wird) gebildet (siehe Abbildungen 3 und 4).^[93] Da das aktive Zentrum jeder NBD

durch Reste der zweiten NBD im Dimer komplementiert wird, scheint eine Funktion der zweiten NBD in der Abschirmung des Nucleotids vom Lösungsmittel und in der Fixierung des γ-Phosphats des ATP zu bestehen. Das Gegenion des ATP (in der Regel Mg²⁺, Na⁺ in der MJ0796(E171Q)-Mutante) interagiert mit dem konservierten S/T-Rest des Walker-A-Motivs, mit dem Glutamin der Q-Schleife und mit dem β- und dem γ-Phosphat des ATP. Von diesen Wechselwirkungen wird angenommen, dass sie zum Zusammenhalt der beiden NBDs beitragen.^[87]

3.1.3. Transmembrandomänen

Die TMDs weisen eine deutlich größere Diversität in Länge und Sequenz auf als die NBDs. Wahrscheinliche Ursache hierfür ist die Notwendigkeit, Substrate unterschiedlicher Größe und Form zu binden und zu transportieren, wobei vermutlich unterschiedliche Transportwege durch die verschiedenen zellulären Membranen genutzt werden. Für die meisten ABC-Transporter werden 6 + 6 Transmembranhelices (TMs) vorhergesagt. Auch die Kristallstrukturen des homodimeren Lipid-A-Exporters MsbA aus *E. coli* und *V. cholera* zeigen sechs Helices pro Monomer.^[84,85] Für einige ABC-Transporter wurden mehr TMs vorausgesagt. So zeigt die kürzlich gelöste Struktur des Vitamin-B₁₂-Importers BtuCD aus *E. coli* zehn TMs in jeder der beiden TMDs.^[93] Wahrscheinlich nehmen die TMDs unterschiedlicher ABC-Transporter, besonders bei unterschiedlicher Zahl an TMDs, auch unterschiedliche Membrantopologien an.

Die ligandenfreien MsbA- und BtuCD-Strukturen sind zurzeit die einzigen verfügbaren Strukturen von kompletten ABC-Transportern. Zwischen diesen Strukturen gibt es erhebliche Unterschiede in den NBDs, den TMDs und den NBD-TMD-Kontaktflächen (Abbildung 5). In MsbA wird die TMD aus einem Bündel von sechs Helices gebildet. Die beiden TMDs des Lipid-A-Transporter-Dimers aus *E. coli* bilden eine V-förmige Struktur mit einer 25 Å weiten, zum Cytoplasma gerichteten Öffnung („offene“ Konformation). Der einzige intermolekulare Kontakt zwischen den Transporter-Monomeren wird von TMD-Regionen in der äußeren Membranschicht und den extrazellulären Schleifen hergestellt. In den Strukturen des Lipid-A-Transporters wurde zudem eine α-helicale intrazelluläre Domäne (ICD) identifiziert, die die NBDs mit den TMDs verbindet. Die TMDs und ICDs bilden zusammen die putative Lipid-A-Bindungsstelle, die von der inneren Membranschicht her zugänglich ist.^[99] Lipid A könnte daher in ähnlicher Weise wie lipophile Substanzen zu den Multidrugresistenzproteinen Pgp und LmrA rekrutiert werden.^[100,101]

Die Strukturen der MsbA-NBDs aus *E. coli* wurden nicht vollständig gelöst: Es fehlt der Arm I mit dem Walker-A- und dem Walker-B-Motiv. Wird Arm I einer anderen NBD in die „offene“ Konformation von MsbA durch Molecular Modeling eingefügt, so sind die NBDs etwa 50 Å voneinander entfernt. Interessanterweise zeigen die C-Schleifen und die Walker-A-Motive voneinander weg, sodass die Bildung eines NBD-Dimers, wie es in MJ0796, Rad50 und BtuCD vorliegt, eine beträchtliche Rotation der NBDs aufeinander zu erfordern würde.

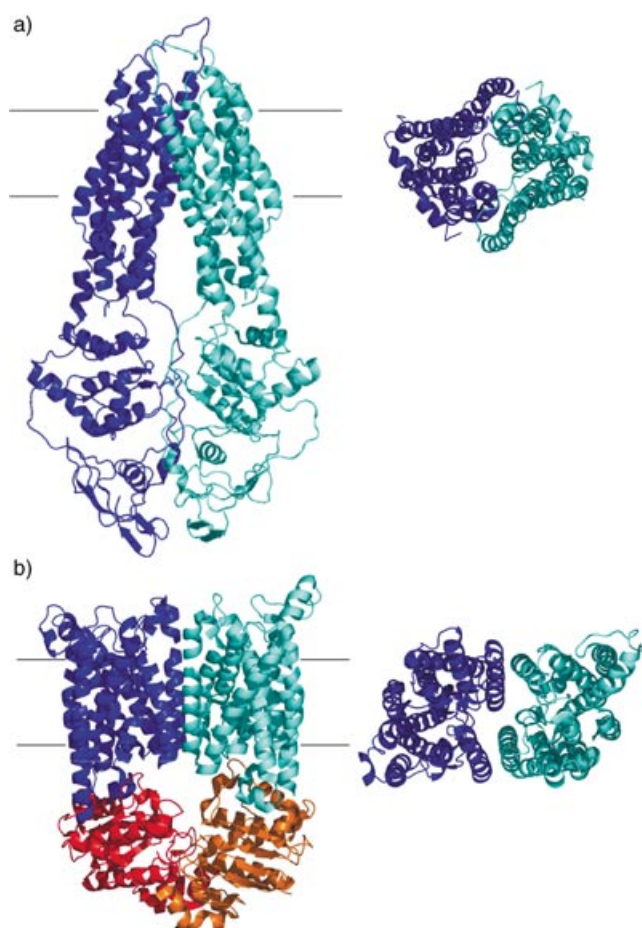


Abbildung 5. Strukturen der ABC-Transporter MsbA und BtuCD. a) Lipid-A-Flippase (MsbA) aus *V. cholera* (PDB-Code 1PF4).^[85] Die beiden Untereinheiten des Homodimers sind in Hell- und Dunkelblau dargestellt. b) Vitamin-B₁₂-Importer (BtuCD) aus *E. coli* (PDB-Code 1LV).^[93] Die beiden TMDs (BtuC) sind in Hell- und Dunkelblau dargestellt, die beiden NBDs (BtuD) in Orange und Rot. Im Aufblick (rechtes Bild) wurden die beiden NBDs weggelassen, um die Organisation der Transmembranhelices hervorzuheben.

Strukturell unterscheidet sich der Lipid-A-Transporter aus *V. cholera* von dem aus *E. coli* darin, dass die beiden helicalen Bündel der TMDs eng beieinander liegen und einen Kanal durch die Membran bilden, der von der cytoplasmatischen Seite unzugänglich ist (Abbildung 5a). Diese Struktur repräsentiert daher eine „geschlossene“ Konformation. Jedes Monomer liegt gegenüber den Monomeren in der MsbA-Struktur von *E. coli* um etwa 90° verdreht vor. Wegen dieser Rotation entspricht die NBD-NBD-Kontaktfläche von MsbA aus *V. cholera* eher einer für andere NBD-Strukturen beschriebenen Kontaktfläche.

Die dritte gelöste Struktur eines vollständigen ABC-Transporters ist die des Vitamin-B₁₂-Importers BtuCD. Sie enthält zehn TMs pro Monomer (Abbildung 5b). Auffällig ist, dass die Helices nicht wie im Lipid-A-Transporter parallel verlaufen, sondern ineinander verzahnt sind. Innerhalb der Dimer-Struktur bilden sie vermutlich einen Translokationskanal für Vitamin B₁₂. Dieser Kanal ist an der cytoplasma-

tischen Seite durch zwei Schleifen, die die TMs miteinander verbinden, blockiert.

In der Struktur des Vitamin-B₁₂-Importers BtuCD fehlt die in MsbA gefundene intrazelluläre Domäne, und die NBDs und TMDs befinden sich in direktem Kontakt miteinander. Der Kontakt wird vornehmlich durch die L-Schleife hergestellt, eine im Cytosol lokalisierte Region aus zwei kurzen Helices. Die Helices werden durch ein Glycin verbunden, das einen scharfen Knick der Peptidkette und damit die Bildung einer „L-Form“ ermöglicht. Da die L-Schleifen-Sequenz auch in anderen ABC-Transportern schwach konserviert ist, wird vermutet, dass die L-Schleife generell am Kontakt zwischen der NBD und TMD beteiligt ist. Von der NBD (BtuD) befinden sich hauptsächlich Reste der Q-Schleife und der Region von Helix 2 zu Helix 3 sowie der Helix 4 an der Kontaktfläche, also Reste der Region, die Arm I und Arm II miteinander verbindet. Da alle gelösten NBD-Strukturen einander stark ähneln, liegt die Vermutung nahe, dass diese Region grundsätzlich zur Bildung der NBD-TMD-Kontaktfläche beiträgt und an der Signalübertragung von den TMDs zu den NBDs nach Substratbindung beteiligt ist.

Die Struktur des NBD-Dimers im Vitamin-B₁₂-Importer (BtuD-BtuD) unterscheidet sich von anderen NBD-Dimeren durch die größeren Abstände zwischen den NBDs. Die NBDs liegen in einer Kopf-Schwanz-Anordnung vor. Es ist daher zu vermuten, dass die ATP-Bindung die NBDs einander nahe bringt und die Bildung eines geschlossenen Dimers wie in den ATP-gebundenen Dimeren von Rad50 und MJ0796 bewirkt.^[87,98]

3.1.4. Funktion von ABC-Transportern

ABC-Transporter transferieren ein breites Spektrum an Substanzen durch biologische Membranen. Bakterielle Importer sind meist hochspezifisch und akzeptieren nur ein einziges oder wenige strukturell ähnliche Substrate. Exporter sind hingegen eher promiskuitiv. Das Multidrugresistenzprotein Pgp und sein bakterielles Homolog LmrA beispielsweise können nahezu alle bekannten Chemotherapeutika aus der Zelle ausschleusen. TAP transportiert eine Unzahl von Peptiden unterschiedlicher Länge und Sequenz (siehe Abschnitt 5.1). Erwartungsgemäß gibt es daher keine konservierte Substratbindungsstelle in den TMDs von ABC-Transportern. Weiterhin herrscht noch Unklarheit darüber, ob es eine oder mehrere Substratbindungsstellen gibt. Anders sieht es bei den Nucleotidbindungsstellen aus, die sich in allen ABC-Transportern sehr ähneln. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von ATP die Annäherung der NBDs und dadurch die Bildung des katalytisch kompetenten NBD-Dimers induziert.^[87,97] ABC-Transporter weisen meistens eine geringe basale ATPase-Aktivität auf, die durch Substratbindung aktiviert wird. Die Transportaktivität hängt ab von Wechselwirkungen zwischen beiden NBDs, zwischen den beiden TMDs und von Signalen, die von den TMDs zu den NBDs und in umgekehrte Richtung gesendet werden. Wie genau die Kopplung von ATP-Hydrolyse und Substrattransfer erfolgt, ist zurzeit nicht klar. Möglich wäre ein allen ABC-

Transportern gemeinsamer Mechanismus oder aber mehrere unterschiedliche Mechanismen.

Bislang wurde nur für wenige ABC-Transporter das Verhältnis von transportiertem Substrat zu verbrauchtem ATP präzise bestimmt. So wurde für OpuA, einen bakteriellen Importer für Osmose-Schutzstoffe, und Mdl1, einen homodimeren Peptid-Transporter der inneren Mitochondrienmembran der Bäckerhefe, die Hydrolyse von zwei ATP pro Transportzyklus nachgewiesen (siehe Abschnitt 6).^[97,102] Es konnte gezeigt werden, dass in bestimmten Phasen des ATPase-Zyklus zwei Nucleotide (entweder zwei ATP, ein ATP plus ein ADP oder zwei ADP) an das Mdl1-NBD-Dimer gebunden sind. Daraus wurde folgendes Modell für den ATPase-Zyklus abgeleitet: Nach ATP-Bindung kommt es zur substratinduzierten Dimerisierung der NBDs, wodurch die Energie für den Substrattransport bereitgestellt wird.^[87,98] Ein ATP wird hydrolysiert und das entstehende anorganische Phosphat freigesetzt, wobei ein instabiles ATP-ADP-gebundenes Intermediat entsteht. Das verbliebene ATP wird hydrolysiert und wiederum das Phosphat freigesetzt. Der Verlust des γ -Phosphats bedingt die Dissoziation des NBD-Dimers. ADP wird anschließend gegen ATP ausgetauscht, womit der Ausgang für einen neuen ATPase-Zyklus erreicht wird. Nach diesem Modell würden beide NBDs in aufeinanderfolgenden Schritten ATP hydrolysieren und nicht in alternierender Weise, wie es in anderen Modellen vorgeschlagen wurde („alternating site models“).^[103,104] Offen bleibt die Frage, wodurch bestimmt wird, welche der beiden aktiven Zentren in homodimeren ABC-Transportern wie Mdl1 das erste und welche das zweite ATP hydrolysiert. Nichtsdestotrotz wäre dieses Modell auch anwendbar auf ABC-Transporter mit NBDs, die unterschiedliche Aufgaben im ATPase-Zyklus verrichten, z. B. in SUR1, CFTR oder TAP.^[105–107]

4. Strukturelle Organisation des TAP-Komplexes

Der Transportkomplex TAP besteht aus zwei Untereinheiten, TAP1 und TAP2, die jeweils aus einer NBD und einer TMD bestehen. TAP1 und TAP2 weisen eine Sequenzidentität von etwa 40 % auf. Ebenso wie bei anderen ABC-Transportern besteht auch in TAP eine weitaus engere Verwandtschaft zwischen den NBDs (etwa 60 % Sequenzidentität) als zwischen den TMDs (etwa 30 %). Humanes TAP1 hat ein theoretisches Molekulargewicht von 81 kDa (748 Aminosäuren), humanes TAP2 von 75 kDa (686 Aminosäuren), wobei die TMDs die N-terminale und die NBDs die C-terminale Hälfte bilden.

Transfiziert man TAP-defiziente Zelllinien mit einem oder beiden TAP-Genen (je nachdem, ob ein Defekt eines oder beider TAP-Gene vorliegt), wird die MHC-I-abhängige Antigenpräsentation wiederhergestellt.^[108,109] Durch die heterologe Expression in Insekten- oder Hefezellen konnte gezeigt werden, dass TAP1 und TAP2 für den Peptidtransport in das ER essenziell und hinreichend sind.^[108,110,111] In Kombination mit Immunpräzipitationsexperimenten deuten diese Befunde darauf hin, dass TAP1 und TAP2 einen heterodimeren Transportkomplex bilden. Weiterhin lassen

Vernetzungsstudien und Einzelpartikel-Elektronenmikroskopie-Analyse erkennen, dass TAP als Heterodimer organisiert ist.^[112,113] Wie Immunelektronen- und Immunfluoreszenzmikroskopie-Studien zeigen, ist der Transportkomplex im ER und in der Cis-Golgi-Membran lokalisiert. Ein ER-Retentionssignal konnte bislang jedoch nicht identifiziert werden.^[110,114]

4.1. Nucleotidbindungsdomänen

Die NBDs der TAP-Proteine bestehen aus den Aminosäuren 489–748 (TAP1) und 454–686 (TAP2) (siehe Abbildung 3). Die Struktur der TAP1-NBD ist die einzige bekannte Kristallstruktur einer eukaryotischen NBD.^[91] Die TAP1-NBD wurde in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} kristallisiert, enthält aber ADP im Kristall. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich entweder eine spontane Hydrolyse oder eine Verunreinigung mit einer anderen ATPase, da die TAP1-NBD keine ATPase-Aktivität aufweist.^[115] Die Struktur zeigt die NBD in der monomeren Form. Die NBD weist die gleiche allgemeine Faltung auf wie die zuvor gelösten NBD-Strukturen mit einem der F1-ATPase ähnlichen Arm I und einem α -helicalen Arm II. Arm II hat einen höheren durchschnittlichen B-Faktor als Arm I und könnte daher flexibler als Arm I sein. Diese Annahme ist konsistent mit den kristallographischen Daten von MJ1276.^[116] Außerdem deuten Mutationsstudien an MalK darauf hin, dass Arm II als Signaltransferdomäne fungieren könnte, die nach Bindung von ATP und Dimerisierung ihre Konformation ändert und somit den Peptidtransport über die TMDs ausführt.^[117,118] Analog zu HisP, MJ0796 und GlcV bilden Reste des Walker-A-Motivs extensive Kontakte zum α - und β -Phosphat des in der TAP1-NBD gebundenen ADP.^[86,87,89,91]

Die NBDs von TAP1 und TAP2 enthalten alle für ABC-Transporter charakteristischen Motive (siehe Abbildung 3), diese weisen allerdings einige Variationen auf. Auffällig ist die degenerierte C-Schleife in TAP2. So enthält TAP2 in Mensch und Gorilla die Sequenz LAAGQ anstelle von LSGGQ. In TAP2 von Nagetieren (Hamster, Maus, Ratte) liegt die Sequenz LAVGQ vor, und Tiere anderer Ordnungen haben wieder andere C-Schleifen. Der einzige in allen TAP-Sequenzen streng konservierte Rest in diesem Motiv ist die vierte Aminosäure (Glycin), die wie das Serin im Konsensmotiv LSGGQ Wasserstoffbrücken zum γ -Phosphat des ATP bildet (Abbildung 4b,c).^[87] Die genaue Rolle der unterschiedlichen C-Schleifen im humanen TAP1 und TAP2 ist zurzeit nicht klar. Die Mutationen S644A/G646A in der TAP1-C-Schleife und/oder G610A in der TAP2-C-Schleife führen zum Verlust der Peptidtransportaktivität, ohne dass die Fähigkeit zur Bindung von Peptiden oder ATP beeinträchtigt wird.^[119] Mutationsstudien an anderen ABC-Transportern zeigen, dass der streng konservierte zweite C-Schleifen-Rest (Serin) für die ATP-Hydrolyse essenziell ist.^[117,120,121] Wird die C-Schleife von TAP2 durch das Konsensmotiv LSGGQ ersetzt, erhält man einen TAP-Komplex mit einer höheren Transportaktivität als der Wildtyp (M. Chen, R. Abele, R. Tampé, unveröffentlichte Ergebnisse). TAP-Chimären mit ausgetauschten C-Schleifen haben die

5.1. Spezifität und Flexibilität der Peptidbindungstasche

Die Spezifität der Bindungstasche von TAP wurde intensiv untersucht. Peptide mit 8 bis 16 Resten haben die optimale Länge für die Bindung an TAP.^[136] Die Peptidspezifität von TAP wurde mithilfe von komplexen Peptidbibliotheken aufgeklärt.^[39,40,137] Es zeigte sich eine Selektivität für basische und hydrophobe Aminosäuren am C-Terminus. Diese Ergebnisse wurden durch In-vitro-Transportstudien an semipermeabilisierten Zellen oder Mikrosomen gestützt.^[110,138] Darüber hinaus beeinflussen die drei N-terminalen Reste die Bindungsaffinität signifikant (Abbildung 7).^[136] Der stärkste Destabilisierungseffekt wird bei Peptiden mit einem Prolin an Position 2 gefunden. Diese Peptide haben eine etwa 100fach geringere Affinität für TAP als solche mit Arginin an gleicher Position. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das Peptidrückgrat an dieser Position ebenfalls zur Bindungsaffinität beiträgt.^[40]

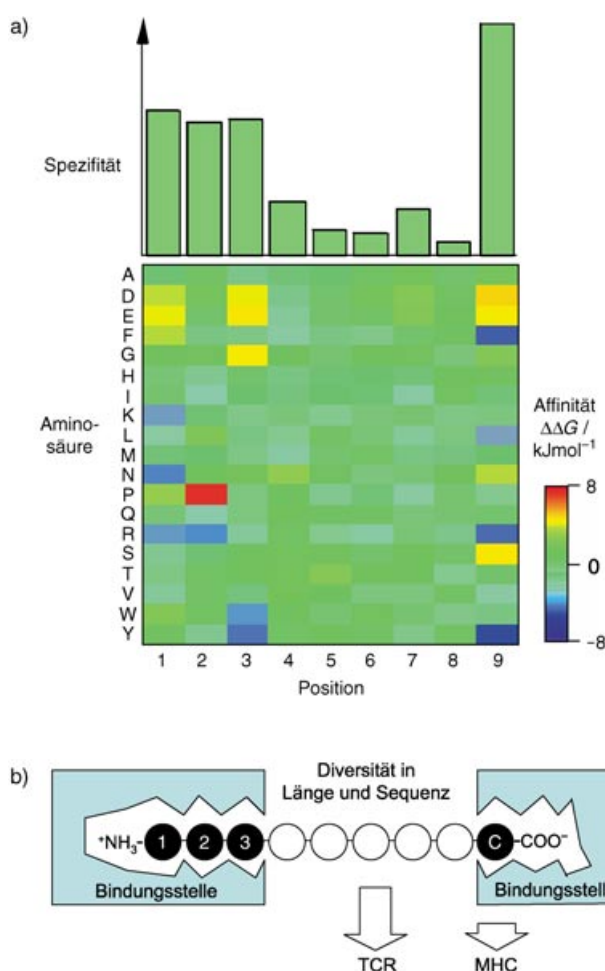


Abbildung 7. Peptidspezifität des humanen TAP-Komplexes. a) Mithilfe von kombinatorischen Peptidbibliotheken und statistischer Analyse wurde festgestellt, dass TAP die größte Spezifität für die drei N-terminalen und den C-terminalen Rest eines Peptids aufweist.^[40,139] Favorigierte Aminosäuren werden an der entsprechenden Position in Blau (negative $\Delta\Delta G$ -Werte) dargestellt, Aminosäuren, die von TAP schlecht gebunden werden, sind in Rot (positive $\Delta\Delta G$ -Werte) dargestellt. b) Modell der Peptidbindungstasche einschließlich der Reste, die für die MHC-I-Bindung und die TCR-Erkennung verwendet werden.

Der Einfluss des Peptidrückgrats wurde durch „Positions-abtastung“ (*positional scanning*) detaillierter untersucht.^[40] Hierbei wurden D-Aminosäuren in Peptide unterschiedlicher Länge an jeder Position eingefügt. Interessanterweise haben D-Aminosäuren an Position 2 und 3 und in geringerem Maße auch an Position 1 und am C-Terminus einen destabilisierenden Effekt, während D-Aminosäuren an internen Positionen die Bindungsaffinität kaum beeinflussen. Diese Experimente zeigen daher, dass auch das Rückgrat an diesen Positionen an der Bindung beteiligt ist. Die Peptide werden außerdem durch Wasserstoffbrücken von den freien N- und C-Termini fixiert.^[139]

Interessanterweise werden auch sterisch anspruchsvolle Peptide, z. B. Peptide mit langen, sperrigen Seitenketten oder Fluoreszenzfarbstoffen, von TAP gebunden und transportiert.^[39,130,140,141] Sowohl die Peptidbindungstasche als auch die Translokationspore scheinen daher sehr flexibel zu sein.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Peptide durch Wasserstoffbrücken an ihren freien N- und C-Termini in der Bindungstasche fixiert werden und dass das Rückgrat sowie die Seitenketten der drei N-terminalen Aminosäuren und des C-terminalen Restes zur Gesamtbindungsaffinität beitragen (Abbildung 7b). Die internen Aminosäuren scheinen dagegen nur unbedeutende Wechselwirkungen zur Bindungsstelle auszubilden oder könnten im Fall von langen oder sterisch anspruchsvollen Peptiden sogar in das Lösungsmittel ragen. In dieser Weise wird Flexibilität (Peptidgröße und -struktur) mit Spezifität in Bezug auf die N- und C-terminalen Ankerreste kombiniert. Der TCR andererseits interagiert im Wesentlichen mit den Resten 5–8 eines an MHC I gebundenen Nonapeptids, also dem Bereich größter Promiskuität im TAP. Daher wird die Diversität der vom MHC I präsentierten und mit dem TCR wechselwirkenden Peptide durch den TAP-Komplex nicht eingeschränkt.^[142]

5.2. Peptidtransport ist an ATP-Hydrolyse gekoppelt

In zahlreichen Studien zeigte sich, dass die Reihenfolge der Ereignisse während eines Transportzyklus sehr schwierig zu bestimmen ist. Untersuchungen mit TAP-Mutanten, in denen konservierte Reste des Walker-A-Motivs von TAP1 und TAP2 ausgetauscht wurden, ergaben nur indirekte und sich zum Teil widersprechende Ergebnisse bezüglich der Frage, ob die Nucleotid-Bindung eine Voraussetzung für die Peptid-Bindung ist oder nicht.^[143–146] Bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen wurde eine ATP-unabhängige Peptid-Bindung an Wildtyp-TAP von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet.^[39,130,131] Studien mit dem Virusprotein ICP47, das die Peptid-Bindung an TAP inhibiert (siehe Abschnitt 7.3), belegten eindeutig, dass die Peptid-Bindung keine Voraussetzung für die ATP-Bindung ist.^[147] Peptide und Nucleotide scheinen daher unabhängig voneinander an TAP zu binden.

Wie oben beschrieben, induziert die ATP-Bindung die Bildung eines NBD-Sandwich-Dimers (siehe Abschnitt 3.1.2). Dieser Schritt könnte der eigentliche Antrieb sein, der die Bindungsenergie von ATP in mechanische Arbeit umsetzt.^[87,93,98] Kinetische Untersuchungen ergaben, dass Peptide über einen Zweistufenmechanismus an TAP

binden, bestehend aus einem schnellen Assoziationsschritt und einer anschließenden langsamen Isomerisierung des TAP-Komplexes.^[130] Der Isomerisierungsschritt geht mit einer erheblichen Konformationsänderung einher, bei der etwa ein Viertel aller TAP-Reste umgeordnet wird.^[148] Die strukturelle Neuordnung ist möglicherweise ein molekularer Schalter, der die ATP-Hydrolyse induziert. ATP-Hydrolyse ist eine Voraussetzung für (anhaltenden) Peptidtransfer,^[138,149] und interessanterweise ist die Stimulierung der ATPase-Aktivität direkt mit der Peptid-Bindung korreliert.^[150] Sterisch anspruchsvolle Peptide, die an TAP binden, aber nicht transportiert werden, stimulieren die ATP-Hydrolyse nicht.^[150]

In einer neueren Untersuchung wurde die 8-Azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP-Photomarkierung mit einem BeF_4^{2-} -Trapping kombiniert.^[151] BeF_4^{2-} wirkt als ATPase-Inhibitor, da es als Phosphatanalogon die Bildung des stabilen Komplexes $\text{Mg}\cdot\text{ADP}\cdot\text{BeF}_4^{2-}$ induziert.^[152] Es wurde gezeigt, dass dieser Komplex in TAP peptidspezifisch gebildet wird und dass beide TAP-Untereinheiten an der ATP-Hydrolyse beteiligt sind. Die Funktion der ATP-Hydrolyse könnte folgerichtig darin bestehen, den Transporter für weitere Translokationszyklen in den Grundzustand zurückzusetzen. Gegenwärtig ist unklar, wie genau die Translokation von Peptiden über die TMDs erfolgt.

Innerhalb eines Transferzyklus wird an beiden NBDs ATP hydrolysiert.^[151] Es wurden zudem Vanadat-Trapping-Experimente durchgeführt, in denen Orthovanadat (V_i) innerhalb des inhibitorischen $\text{Mg}\cdot\text{ADP}\cdot\text{V}_i$ -Komplexes das γ -Phosphat im Übergangszustand der ATP-Hydrolyse nachahmt.^[153,154] Diese Ansätze ergaben, dass ADP hauptsächlich an TAP2 bindet, wohingegen das nichthydrolysierbare ATP-Analog ATP- γ -Biotin stets mit TAP1 assoziiert vorlag.^[144] Ein solches unterschiedliches Markieren beider Untereinheiten wurde auch bei anderen ABC-Transportern beobachtet.^[155–157] Diese Befunde belegen zusammen mit Ergebnissen der Walker-A-Mutanten und Chimären mit vertauschten NBDs von TAP eine Nichtäquivalenz der NBDs im Transportzyklus.^[107,143–146,158,159] Der Grund, weshalb TAP zwei funktionell unterschiedliche NBDs enthält, ist derzeit nicht geklärt. Zwar wurde gezeigt, dass beide NBDs ATP hydrolysieren, aber Mutationsstudien deuten darauf hin, dass ATP-Hydrolyse an TAP1 möglicherweise nicht essenziell ist (M. Chen, R. Abele, R. Tampé, unveröffentlichte Ergebnisse).^[144]

Basierend auf den verfügbaren Daten kann das folgende Arbeitsmodell für den Peptidtranslokationszyklus aufgestellt werden (Abbildung 8): ATP und Peptid binden unabhängig voneinander an TAP. Beide Bindungsschritte gehen mit Konformationsänderungen in den NBDs und den TMDs einher. Die Peptidbindungstasche könnte als Konsequenz der Konformationsänderungen in die (möglicherweise neu gebildete) Pore überführt werden, wodurch das Peptid in das ER-Lumen transferiert wird. Nachfolgend wird ATP prozessiv an beiden NBDs hydrolysiert und das gebildete Phosphat und schließlich ADP freigesetzt. Wegen der hohen Konzentration an zellulärem ATP (3–8 mM) wird TAP anschließend sofort wieder mit ATP beladen und kann so in den nächsten Transportzyklus eintreten. Zurzeit ist dieses

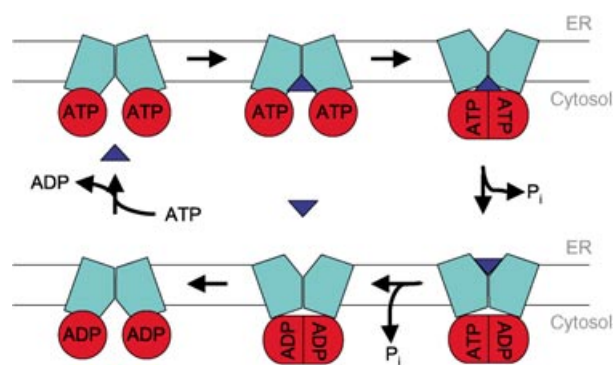


Abbildung 8. Modell für den Peptidtranslokationszyklus von TAP. ATP und Peptid (blaues Dreieck) binden unabhängig voneinander an TAP, wodurch die Dimerisierung der NBDs induziert wird. Die TMDs erfahren Konformationsänderungen, die zur Bildung einer Translokationspore führen, durch die das Peptid in das ER-Lumen transferiert wird. An jeder NBD wird ein ATP-Molekül hydrolysiert. Die Hydrolyse könnte sequenziell erfolgen, wie in Mdl1, einem nahen Verwandten von TAP.^[97] Schließlich werden ADP und anorganisches Phosphat freigesetzt, und die NBDs lösen sich voneinander. Der Transporter ist dann bereit für den nächsten Zyklus.

Modell spekulativ und alternative Modelle können nicht ausgeschlossen werden.^[160,161]

6. Verwandte Transporter

MHC-I-Moleküle präsentieren cytotoxischen T-Zellen intrazelluläre Peptide. Die meisten Peptide sind „Selbst-Peptide“, die von endogenen Proteinen aus dem Cytosol oder intrazellulären Organellen stammen und die normalerweise keine Immunreaktion auslösen.^[162–164] Die Diskriminierung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ ist streng: So kann die Substitution einer einzigen Aminosäure eine cytotoxische T-Zell-Antwort induzieren. Dadurch kann der Organismus Zellen mit fehlerhaften Translationsprodukten, die sich z. B. durch den Einfluss mutagener Substanzen und/oder durch maligne Transformation anhäufen, schnell eliminieren. Die strikte Diskriminierung zwischen „Selbst-Peptiden“ und „Fremd-Peptiden“ bereitet allerdings große Probleme in der Transplantationsmedizin, da viele menschliche Gene eine natürliche Polymorphie aufweisen. Ein Protein eines Spenders braucht nur in einer einzigen Aminosäure von dem des Empfängers abzuweichen, um so genannte Minor-Histokompatibilitätsantigene (*minor histocompatibility antigens*) zu bilden und eine Abstoßung des Transplantats zu verursachen. Interessanterweise stammen einige Minor-Histokompatibilitätsantigene von mitochondrial codierten Proteinen. Wie bakterielle Proteine unterscheiden sich mitochondrial von Kern-codierten Proteinen darin, dass sie N-terminale Formylmethioninreste tragen.^[165,166] Es wurde gezeigt, dass die MHC-Präsentation eines N-formylierten Peptids, das von der mitochondrial codierten NADH-Dehydrogenase (ND1) stammt, zumindest teilweise TAP-abhängig erfolgt.^[167]

Die Präsentation N-formylierter Peptide ist außergewöhnlich, da TAP- und MHC-I-Komplexe Peptide mit modifizierten N- und C-Termini in der Regel ablehnen. Der

Transportweg dieser Peptide von den Mitochondrien ins Cytoplasma ist nicht bekannt. Möglicherweise werden die Peptide von mitochondrialen ABC-Transportern wie ABCB10 oder ABCB8 in das Cytosol gepumpt. Beide Transporter haben eine signifikante Sequenzidentität zu TAP1 und TAP2 (> 30 %).^[168,169] Kürzlich wurden Hinweise auf die Funktion des ABCB10-Homologs Mdl1 in der Bäckerhefe gefunden.^[78] Dieser Halb-Transporter bildet ein Homodimer, das Peptide von der Matrix in den Zwischenmembranraum der Mitochondrien transportiert. Interessanterweise scheint Mdl1 Peptide mit 6–20 Aminosäuren zu transportieren und somit eine ähnliche Längenspezifität wie TAP zu haben. Neben der Rolle bei der zellulären Immunantwort könnte ABCB10 auch an der peptidvermittelten Kommunikation zwischen dem zellulären und mitochondrialen Genom und/oder Stoffwechsel beteiligt sein. Ferner gibt es Hinweise auf eine Funktion bei der Regulation der Resistenz gegen oxidativen Stress.^[170] Die Funktion des Hefe-Mdl2 und des humanen Homologs ABCB8 ist bislang nicht geklärt.

Das Protein mit der größten Sequenzidentität zu TAP ist ABCB9 (TAPL, *TAP-like protein*, 36 % Sequenzidentität mit TAP1, 37 % mit TAP2).^[171] ABCB9 und die TAP-Gene sind wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden, aber im Laufe der Evolution auf verschiedenen Chromosomen loziert worden.^[172] Die hohe Sequenzidentität lässt vermuten, dass es sich bei ABCB9 ebenfalls um einen Peptidtransporter handeln könnte. Die zelluläre Lokalisation von ABCB9 ist zurzeit umstritten, da es entweder in der ER-Membran oder in der lysosomalen Membran nachgewiesen wurde.^[173,174] Weiterhin ist unbekannt, ob ABCB9 ein Homodimer oder mit einem anderen Halb-Transporter wie TAP1 oder TAP2 ein Heterodimer bildet.

7. TAP-Dysfunktion und Krankheiten

Da MHC-Moleküle ohne gebundene Peptide instabil sind und im Cytosol abgebaut werden, führt jeder Defekt, der den Peptidtransport in das ER hemmt, zu einer Verarmung an Antigen-präsentierenden MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche. Der durch den TAP-Komplex vermittelte Peptidtransport in das ER bildet gewissermaßen einen Engpass im Antigen-Präsentationsweg. Eine Störung der TAP-Funktion hat somit schwerwiegende Auswirkungen auf die Immunantwort gegen virusinfizierte oder maligne Zellen. Die Funktion von TAP kann auf unterschiedlichen Ebenen beeinflusst werden. Erstens können Mutationen entweder in TAP1 oder in TAP2 zum Funktionsverlust des Transporters führen. TAP-Mutationen können zu der Immunschwächekrankheit BLS (Bare Lymphocyte Syndrome Typ 1) führen, der einzigen bekannten Erbkrankheit, die mit TAP assoziiert ist. Zweitens kann die Transkription der TAP-Gene durch Fehlfunktion eines oder mehrerer Regulationsmechanismen gestört sein. Dieser Fall trifft auf einige Tumore zu.^[175–177] In diesem Zusammenhang bleibt zu erwähnen, dass auch einige Viren, z. B. das Epstein-Barr-Virus, Proteine exprimieren, die die TAP-Expression supprimieren.^[178] Drittens kann der TAP-Komplex posttranslational durch spezifische Inhibitoren

blockiert werden. Verschiedene Viren nutzen diese elegante Strategie, um der Erkennung durch das Immunsystem des Wirts zu entgehen.

7.1. Gendefekte in TAP verursachen eine Immunschwächekrankheit

Das Bare Lymphocyte Syndrome (BLS) ist eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die zuerst von Touraine et al. beschrieben wurde.^[179] Man unterscheidet drei Typen von BLS. Patienten mit BLS Typ I, II oder III weisen einen Mangel an MHC I, MHC II bzw. sowohl von MHC I als auch von MHC II auf.^[180] Bei Patienten mit BLS Typ II oder III kann weder eine zelluläre noch eine humorale Immunantwort ausgelöst werden, und die Patienten sterben meist innerhalb der ersten drei oder vier Lebensjahre. Patienten mit BLS Typ I erreichen hingegen meist das Erwachsenenalter, sterben dann aber oft wegen fortschreitender Lungenschäden.^[181,182] Die Ursache für BLS Typ I sind Mutationen in TAP1 oder TAP2, die zu einem vorzeitigen Translationsstopp der *tap*-mRNA führen. Folglich wird durch das Fehlen funktionaler TAP-Komplexe die Versorgung mit antigenen Peptiden unterbunden und damit indirekt die MHC-I-Oberflächenpräsentation supprimiert.^[11,12,183,184]

Typische Symptome von BLS Typ I sind wiederkehrende und chronische bakterielle Infektionen und nekrotisierende granulomatöse Hautläsionen. Überraschenderweise tragen virale Infektionen nicht zum Krankheitsbild bei. Ferner wurde eine TAP2-defiziente Person beschrieben, die völlig symptomfrei ist.^[185] Es scheint daher, dass die zelluläre Immunantwort zumindest in begrenztem Maße aktiviert werden kann. Zellen ohne MHC-I-Moleküle an der Oberfläche werden normalerweise von „natürlichen Killerzellen“ (NKs) erkannt und eliminiert. Die NK-Zellen sind möglicherweise an der Entstehung der Hautläsionen beteiligt, da sie bei anhaltender Aktivierung durch bakterielle Infektionen Entzündungsreaktionen fördern können. Bei den meisten Patienten mit BLS Typ I wurde eine vermehrte Zahl an NKs in den peripheren Blutzellen gefunden, die sich aber als unfähig zur Tötung der MHC-I-defizienten Zellen erwiesen. Eine mögliche Ursache könnte die beobachtete verstärkte Expression inhibitorischer NK-Zell-Rezeptoren sein.^[186]

7.2. TAP und Tumorentwicklung

Viele Tumore haben die Fähigkeit zur Antigenpräsentation verloren und sind daher für cytotoxische T-Zellen unsichtbar. Dennoch werden die Tumorzellen oft von NK-Zellen ignoriert.^[187] Der Grund hierfür ist nicht bekannt, es könnten aber MHC-I-ähnliche Proteine wie das UL18-Protein des ubiquitären humanen Cytomegalie-Virus beteiligt sein.^[188]

Es gibt mehrere Ursachen für den Verlust der Antigenpräsentation in malignen Zellen. In einer Lungenkrebs-Zelllinie wurde beispielsweise eine einzige Punktmutation in TAP1 gefunden, die zum Aminosäureaustausch R659Q innerhalb der P(Pro)-Schleife führt.^[189] Die mutierte TAP-

Untereinheit führt trotz Expression zu einem Defekt in der Antigenprozessierung und -präsentation. Diverse Tumore weisen aufgrund von fehlerhaften Regulationsmechanismen eine verringerte TAP-Expression auf.^[175–177,190] Ein Mechanismus könnte über inaktives p53-Tumor-Suppressor-Protein wirken, das normalerweise die Expression von TAP1 induzieren kann.^[191] Mehr als 50 % der humanen Tumore haben Mutationen im p53-Gen, und die daraus resultierenden nichtfunktionellen Proteine sind unfähig zur Induktion von TAP1 und verringern so die Gesamtmenge an TAP in der Zelle. In Zellkulturmodellen unterschiedlicher Lungenkarzinome und Melanome konnte die MHC-I-Oberflächenpräsentation durch Transfektion von TAP-Genen verstärkt werden.^[192–194] Außerdem können Defekte in der Regulation der TAP-Expression oft durch Einsatz von IFN- γ korrigiert werden.^[194–196]

7.3. Viren unterlaufen die TAP-abhängige Antigenpräsentation

Während Millionen von Jahren der Coevolution mit ihrem Wirt haben Viren ausgefeilte Mechanismen entwickelt, mithilfe derer sie der adaptiven Immunantwort ihres Wirtes entkommen oder diese ganz verhindern können. Dadurch können Viren akute, chronische und latente Infektionen verursachen und in einigen Fällen auch die Entstehung von Tumoren begünstigen.^[7] Die meisten Viren verlassen sich dabei nicht auf eine einzige Strategie, sondern nutzen mehrere parallel. Eine von mehreren DNA-Viren angewendete Methode ist die Unterbrechung des Antigen-Präsentationswegs, wobei die Unterbrechung in mehreren Fällen an der Stelle von TAP erfolgt.

Virale Proteine können die MHC-I-Antigenpräsentation an der Zelloberfläche entweder direkt hemmen oder aber indirekt, indem sie den TAP-abhängigen Peptidtransport in das ER unterbinden. Adenoviren verursachen leichte Infektionen der oberen Atemwege in immunkompetenten Kindern, sie können aber zu schweren Infektionen in immungeschwächten Patienten führen. Adenoviren der Homologiegruppe E hemmen die Expression von MHC I an der Zelloberfläche dadurch, dass ihr 19K-Protein an MHC-I-Moleküle bindet und diese im ER festhält.^[197–199] Das E3/19K-Protein kann sowohl an MHC I als auch an TAP binden, aber – anders als Tapasin – nicht gleichzeitig. Die Bindung entweder an TAP oder an MHC I verhindert eine effiziente Peptid-Beladung der MHC-I-Moleküle. In der Folge werden instabile freie MHC-I-Moleküle im Cytosol abgebaut.^[200]

Mehrere Vertreter der Familie der Herpes-Viren (Epstein-Barr-Virus, Herpes-simplex-Virus, humanes Cytomegalie-Virus, humanes Herpes-Virus 8) hemmen ebenfalls die Antigenpräsentation auf der Stufe von TAP.^[178,201–211]

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert B-Lymphocyten. Die primäre Infektion von immungeschwächten Personen kann Mononucleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) verursachen, eine mit Fieber, Halsschmerzen und geschwollenen Lymphknoten verbundene Krankheit. Die Infektion bewirkt eine T-Zell-Antwort, die EBV durch Etablierung eines Latenz-Stadiums übersteht. In diesem Zustand wird ein spezifisches Protein, das LMP-1 (*latent membrane protein*

1), nicht exprimiert. Bei einer späteren Aktivierung, bei der mehrere „latente“ Gene exprimiert werden, trägt EBV zur Entstehung maligner Krankheiten wie der Hodgkinschen Krankheit und dem Burkitt-Lymphom bei.^[178] Während der akuten Phase einer EBV-Infektion induziert LMP-1 die Expression von TAP2, während die von TAP1 verringert wird. Das entstehende Ungleichgewicht von TAP1 und TAP2 bewirkt möglicherweise, dass nur wenige funktionelle TAP-Komplexe gebildet werden können und damit die Antigenpräsentation beeinträchtigt wird.^[178,200] Die TAP-Expression wird auch vom BCRF1-Gen-Produkt von EBV beeinflusst. BCRF1 codiert ein virales Interleukin-10-Homolog (vIL-10), das die TAP1-Expression herabsetzt, ohne aber die von TAP2 zu verändern.^[212] vIL-10 verhindert die MHC-I-abhängige Antigenpräsentation nicht vollständig. Es wird sogar ein Signalsequenzepitop von vIL-10 präsentiert, das eine T-Zell-Antwort induziert. Die fortdauernde Antigenpräsentation erfolgt wahrscheinlich auf einem TAP-unabhängigen Weg.^[213,214]

Sowohl das Herpes-simplex-Virus als auch das humane Cytomegalie-Virus codieren Proteine (ICP47 bzw. US6), die die Antigenpräsentation durch ihre direkte Bindung an TAP inhibieren, wodurch der Nachschub an Peptiden für MHC-I-Moleküle abgeschnitten wird (Abbildung 9).^[215] ICP47 (*infected cell peptide 47*) und US6 (*unique short region 6*) sind besonders wertvolle Hilfsmittel zur Aufklärung der Funktion von TAP (siehe Abschnitte 4.1, 4.2 und 5.2). Das Herpes-simplex-Virus (HSV) tritt in zwei Serotypen auf. HSV-I

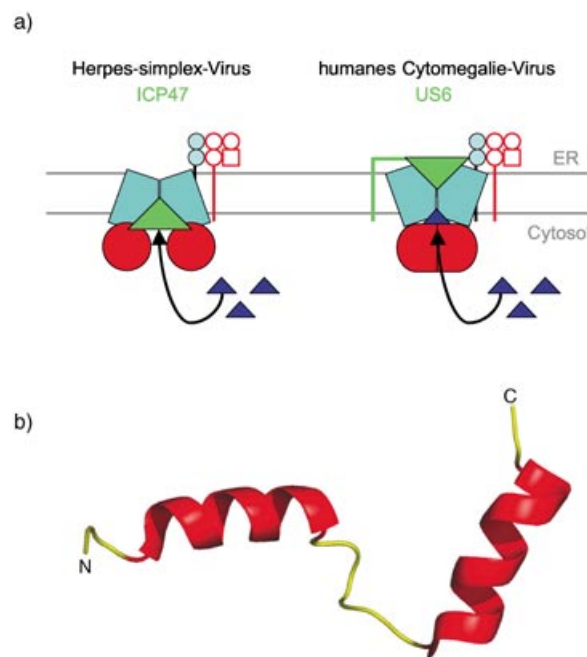


Abbildung 9. Strategien des Herpes-simplex-Virus (HSV) und des humanen Cytomegalie-Virus (HCMV) zur Umgehung der Immunreaktion durch Wechselwirkung mit TAP. a) ICP47 von HSV bindet an TAP von der cytosolischen Seite, wodurch Peptid-Bindung und -Translokation verhindert werden. Das Typ-I-Glycoprotein US6 von HCMV bindet an ER-luminale Regionen von TAP und inhibiert die Peptidtranslokation durch Blockierung der ATP-Bindung an TAP; b) NMR-Struktur der aktiven Domäne von ICP47(2–34) (PDB-Code 1QLO).^[217]

infiziert Gesichtsepithelien, während HSV-2, das gemeinhin als Genital-Herpes bezeichnet wird, Läsionen an den Genitalien, der Harnröhre und der Blase verursacht. Beide Serotypen führen zu persistenten Infektionen.

TAP ist der Angriffspunkt von ICP47 von HSV-1 und HSV-2. Obwohl die ICP47-Proteine beider Serotypen (88 bzw. 86 Aminosäuren, ≈ 10 kDa) eine Sequenzidentität von nur 42 % aufweisen, unterscheiden sie sich nicht signifikant in ihrer Wirkung auf TAP.^[204] Die größte Sequenzähnlichkeit tritt in der N-terminalen Proteinhälfte auf. Weiterhin konnte der Bereich von Aminosäure 3–34 als aktive Region identifiziert werden.^[205] Diese aktive Domäne erscheint in wässriger Lösung größtenteils unstrukturiert. Durch Membranadsorption wird allerdings eine α -helicale Struktur induziert.^[216] Diese besteht aus zwei Helices (Aminosäure 4–15 und 22–32), die über eine flexible Schleife miteinander verbunden sind (Abbildung 9b).^[217]

ICP47 blockiert die Peptidbindungsstelle von TAP, sodass Peptiderkennung und -transport in das ER verhindert werden.^[147,206,218,219] Ferner scheint die Bindung von ICP47 eine Konformationsänderung von TAP zu bewirken, die zur Destabilisierung des TAP1/2-Heterodimers führt.^[112] ATP- und ADP-Bindung werden nicht beeinträchtigt.^[218] Die hoch affine Assoziation von ICP47 mit TAP ($K_D \approx 50$ nM) ist reversibel und kann durch Peptide kompetitiv gehemmt werden. Da Peptide mit der Größe von ICP47 und N- oder C-terminalen Modifikationen nur mit sehr niedriger Affinität an TAP binden, scheint ICP47 anders als Peptide an TAP zu binden.^[39,40,207] Gegenwärtig ist nicht bekannt, welche Regionen von ICP47 mit TAP wechselwirken.

Das humane Cytomegalie-Virus (HCMV) codiert ein weiteres Protein, das die MHC-I-Oberflächenpräsentation durch seine direkte Wechselwirkung mit TAP hemmt. Die primäre HCMV-Infektion verläuft meistens ohne oder nur mit leichten Symptomen, kann aber bei immungeschwächten Personen komplexe Krankheitsbilder verursachen, z. B. Netzhaut-, Lungen-, Magen-Darm- und Leberentzündungen. Bei Säuglingen und Kleinkindern kann eine HCMV-Infektion die schwere Krankheit CID (*cytomegalic inclusion disease*) verursachen, die oft mit Taubheit und neurologischen Störungen verbunden ist. Im Anschluss an die primäre Infektion kann HCMV eine lebenslange Persistenz in einem latenten Zustand etablieren, ohne irgendeine Krankheit zu verursachen. Im aktivierten Zustand kann HCMV der Immunantwort des Wirts dadurch entkommen, dass es die Oberflächen-Expression von MHC I supprimiert (siehe Übersichten Lit. [7,9,208,215,220]). An diesem Prozess sind mehrere virale Genprodukte beteiligt, die an verschiedenen Punkten im Antigen-Präsentationsweg angreifen. TAP ist der Angriffspunkt des frühen Genprodukts US6, eines Typ-I-Membranglycoproteins aus 183 Aminosäuren (23 kDa).^[210,211,221] US6 besteht aus einer N-terminalen Leitsequenz gefolgt von einer ER-luminalen Domäne, einer Transmembranhelix und einem kurzen cytosolischen Abschnitt. Studien mit verkürzten US6-Konstrukten zeigten, dass die ER-luminale Domäne (Aminosäuren 20–139) hinreichend für die TAP-Inhibition ist.^[124,211] Interessanterweise ist auch ein nichtglycosyliertes US6 voll funktional.^[124] Die Bindung von US6 an den ER-luminalen Teil von TAP

verhindert den Peptidtransport, aber – anders als ICP47 – nicht die Peptid-Bindung.^[211,221] Durch die Bindung an ER-luminale Regionen von TAP stabilisiert US6 möglicherweise eine TAP-Konformation, in der keine ATP-Bindung und keine Peptid-stimulierte ATPase-Aktivität möglich sind.^[123,124]

8. Zusammenfassung und Ausblick

Der Peptidtransporter TAP bildet ein Nadelöhr der Antigenprozessierung. Peptidbindungsstudien zeigen, dass beide TMDs bei der Erkennung von Peptiden mit 8–30 Aminosäuren durch ihre N- und C-terminalen Reste kooperieren, während die internen Aminosäuren nur unbedeutende Kontakte zur Bindungsstelle ausbilden. Basische und hydrophobe Aminosäuren werden am C-Terminus bevorzugt, und auch die drei N-terminalen Reste tragen zur Bindungsaffinität bei. Die Peptid-Spezifität von TAP überlappt mit der von MHC I. Da der TCR hauptsächlich die internen Aminosäuren eines Peptids bindet, begrenzt TAP nicht das Reservoir an verfügbaren Peptiden für die Antigenpräsentation und Erkennung durch den T-Zell-Rezeptor. Diese feine Abstimmung der Spezifitäten deutet auf eine lange Geschichte der Coevolution von TAP, MHC I und TCR hin, die es dem Immunsystem ermöglicht, infizierte Zellen effizient zu erkennen und zu zerstören.

Viren haben vielfältige Mechanismen zur Blockierung der Antigenpräsentation entwickelt. Die beiden viralen TAP-Inhibitoren ICP47 und US6 wurden detailliert untersucht. Beide verhindern den Peptidtransport in das ER durch ihre direkte Wechselwirkung mit TAP. Die an der Bindung beteiligten Reste sind bislang nicht bekannt. Dennoch konnten diese Inhibitoren erfolgreich zur Untersuchung des Transportmechanismus von TAP eingesetzt werden. Auf der Basis dieser viralen Hemmstoffe können therapeutische Arzneistoffe konzipiert werden, die als Immunsuppressoren wirken oder die in neuen Impfstrategien gegen Viren verwendet werden können, wodurch unser Immunsystem wieder in die Lage versetzt wird, die infizierten Zellen zu erkennen und zu töten.

Die ATP-Bindung und -Hydrolyse an den NBDs ist für den fortschreitenden Peptidtransport durch die ER-Membran essenziell. Es gibt Hinweise darauf, dass ein ATP pro Motordomäne des TAP-Komplexes für die Peptidtranslokation benötigt wird, aber das Verhältnis von ATP zu Peptid konnte bisher noch nicht bestimmt werden. Vermutlich wird das Peptid durch eine Pore transportiert, die von den TMDs gebildet wird. Die Architektur dieser vermeintlichen Pore ist derzeit nicht bekannt und kann wahrscheinlich nur durch hoch aufgelöste Kristallstrukturen des TAP-Komplexes während unterschiedlicher Phasen des Translokationszyklus bestimmt werden. Strukturelle sowie weitere kinetische Studien sind notwendig, um die Kommunikation zwischen den NBDs sowie zwischen den NBDs und den TMDs zu entschlüsseln und die Natur der Konformationsänderungen, die mit der intramolekularen Signalübertragung einhergehen, zu verstehen. Andere noch nicht geklärte Fragen bezüglich des Translokationsmechanismus sind, ob ATP in sequen-

zieller oder paralleler Weise an den beiden NBDs hydrolysiert wird, und was der eigentliche Antrieb für den Peptidtransport ist.

Im Zeitalter der Proteom-Forschung können weitere interessante Fragen untersucht werden: Wie genau ist der PLC zusammengesetzt? Wie kommunizieren die unterschiedlichen Proteinkomponenten innerhalb des PLC zeitlich und räumlich miteinander, um die Peptid-Beladung zu koordinieren? Trotz intensiver Forschung über die letzte Dekade bleiben noch viele Fragen der Antigenprozessierung und -präsentation zu beantworten. Viren demgegenüber bearbeiten dieses Gebiet über Millionen von Jahren und haben ausgefeilte Strategien entwickelt, der Immunerkennung zu entgehen. Wir haben nun die Chance, das immense „Wissen“ der Viren zu nutzen, um tiefere Einsicht in das faszinierende Feld der Antigenprozessierung und -präsentation zu erhalten.

Abkürzungen

ABC	ATP-Bindungskassette
BLS	Bare Lymphocyte Syndrome
CD4 ⁺	T-Helferzelle
CD8 ⁺	cytotoxische T-Zelle
ER	endoplasmatisches Retikulum
HC	schwere Kette
HCMV	humanes Cytomegalie-Virus
HSV	Herpes-simplex-Virus
ICD	intrazelluläre Domäne
IM	innere Membran
MHC I	Hauptkompatibilitätskomplex I
NBD	Nucleotidbindungsdomäne
NK	natürliche Killerzelle
PLC	Peptidbeladungskomplex
TAP	mit der Antigenprozessierung assoziierter Transporter
TCR	T-Zell-Rezeptor
TMD	Transmembrandomäne
TM	Transmembranhelix

Wir danken allen jetzigen und früheren Mitgliedern unserer und kooperierender Arbeitsgruppen. Ohne ihren Enthusiasmus würde es viele Einsichten in die Funktion von TAP nicht geben. Wir danken auch Dr. Lutz Schmitt für seine Hilfe mit den PyMOL-Präsentationen und Dr. Rupert Abele für hilfreiche Diskussionen und sorgfältiges Lesen des Manuskripts. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB628, „Functional Membrane Proteomics“) unterstützte diese Arbeit.

Eingegangen am 1. Dezember 2003 [A642]

Online veröffentlicht am 30. Juni 2004

- [1] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5. Aufl., Garland, New York, 2001.
- [2] P. C. Doherty, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2014; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1926.

- [3] R. M. Zinkernagel, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2026; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1938.
- [4] K. Eichmann, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 56; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 54.
- [5] K. Falk, O. Rötzschke, S. Stevanović, G. Jung, H. G. Rammensee, *Nature* **1991**, 351, 290.
- [6] K. Udaka, K. H. Wiesmüller, S. Kienle, G. Jung, P. Walden, *J. Exp. Med.* **1995**, 181, 2097.
- [7] H. L. Ploegh, *Science* **1998**, 280, 248.
- [8] J. W. Yewdell, A. B. Hill, *Nat. Immunol.* **2002**, 3, 1019.
- [9] E. W. Hewitt, *Immunology* **2003**, 110, 163.
- [10] H. L. Chen, D. Gabrilovich, R. Tampé, K. R. Girgis, S. Nadaf, D. P. Carbone, *Nat. Genet.* **1996**, 13, 210.
- [11] H. de la Salle, D. Hanau, D. Fricker, A. Urlacher, A. Kelly, J. Salamer, S. H. Powis, L. Donato, H. Bausinger, M. Laforet, M. Jeras, D. Spehner, T. Bieber, A. Falkenrodt, J.-P. Cazenave, J. Trowsdale, M. M. Tongio, *Science* **1994**, 265, 237.
- [12] H. Teisserenc, W. Schmitt, N. Blake, R. Dunbar, S. Gadola, W. L. Gross, A. Exley, V. Cerundolo, *Immunol. Lett.* **1997**, 57, 183.
- [13] M. M. Gottesman, S. V. Ambudkar, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2001**, 33, 453.
- [14] P. Borst, R. O. Elferink, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 537.
- [15] R. Abele, R. Tampé, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1461, 405.
- [16] L. Schmitt, R. Tampé, *ChemBioChem* **2000**, 1, 16.
- [17] B. Lankat-Buttgereit, R. Tampé, *Physiol. Rev.* **2002**, 82, 187.
- [18] J. Sprent, D. Lo, E. K. Gao, Y. Ron, *Immunol. Rev.* **1988**, 101, 173.
- [19] P. S. Ohashi, *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, 8, 808.
- [20] J. Sprent, H. Kishimoto, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2001**, 356, 609.
- [21] K. Falk, O. Rötzschke, H.-G. Rammensee, *Nature* **1990**, 348, 248.
- [22] H. G. Rammensee, K. Falk, O. Rötzschke, *Annu. Rev. Immunol.* **1993**, 11, 213.
- [23] N. Sastri, S. Schwab, T. Serwold, *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, 20, 463.
- [24] W. Baumeister, J. Walz, F. Zühl, E. Seemüller, *Cell* **1998**, 92, 367.
- [25] A. L. Goldberg, P. Cascio, T. Saric, K. L. Rock, *Mol. Immunol.* **2002**, 39, 147.
- [26] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, 268, 533.
- [27] M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, 386, 463.
- [28] M. P. Belich, R. J. Glynn, G. Senger, D. Sheer, J. Trowsdale, *Curr. Biol.* **1994**, 4, 769.
- [29] D. Nandi, H. Jiang, J. J. Monaco, *J. Immunol.* **1996**, 156, 2361.
- [30] M. Groettrup, R. Kraft, S. Kostka, S. Standera, R. Stohwasser, P. M. Kloetzel, *Eur. J. Immunol.* **1996**, 27, 863.
- [31] M. Rechsteiner, C. Realini, V. Ustrell, *Biochem. J.* **2000**, 345, 1.
- [32] P. M. Kloetzel, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, 2, 179.
- [33] B. Ehling, T. H. Meyer, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, R. Tampé, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 235, 404.
- [34] A. F. Kisselev, T. N. Akopian, K. M. Woo, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 3363.
- [35] R. E. Toes, A. K. Nussbaum, S. Degermann, M. Schirle, N. P. Emmerich, M. Kraft, C. Laplace, A. Zwiderman, T. P. Dick, J. Müller, B. Schönfisch, C. Schmid, H. J. Fehling, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, H. Schild, *J. Exp. Med.* **2001**, 194, 1.
- [36] G. Niedermann, E. Geier, M. Lucchiari-Hartz, N. Hitziger, A. Ramsperger, K. Eichmann, *Immunol. Rev.* **1999**, 172, 29.
- [37] G. Niedermann, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2002**, 268, 91.
- [38] J. Driscoll, M. G. Brown, D. Finley, J. J. Monaco, *Nature* **1993**, 365, 262.
- [39] S. Uebel, T. H. Meyer, W. Kraas, S. Kienle, G. Jung, K. H. Wiesmüller, R. Tampé, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 18512.

- [40] S. Uebel, W. Kraas, S. Kienle, K. H. Wiesmüller, G. Jung, R. Tampé, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8976.
- [41] J. Beninga, K. L. Rock, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 18734.
- [42] L. Stoltze, M. Schirle, G. Schwarz, C. Schröter, M. W. Thompson, L. B. Hersh, H. Kalbacher, S. Stevanovic, H. G. Ramensee, H. Schild, *Nat. Immunol.* **2000**, *1*, 413.
- [43] T. Serwold, S. Gaw, N. Shastri, *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 644.
- [44] T. Saric, S. C. Chang, A. Hattori, I. A. York, S. Markant, K. L. Rock, M. Tsujimoto, A. L. Goldberg, *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 1169.
- [45] K. Falk, O. Röttschke, *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 1121.
- [46] I. A. York, A. X. Mo, K. Lemerise, W. Zeng, Y. Shen, C. R. Abraham, T. Saric, A. L. Goldberg, K. L. Rock, *Immunity* **2003**, *18*, 429.
- [47] T. Saric, J. Beninga, C. I. Graef, T. N. Akopian, K. L. Rock, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36474.
- [48] R. J. Binder, N. E. Blachere, P. K. Srivastava, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 17163.
- [49] P. Srivastava, *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 395.
- [50] J. Kunisawa, N. Shastri, *Mol. Cell* **2003**, *12*, 565.
- [51] J. W. Yewdell, *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 294.
- [52] E. Reits, A. Griekspoor, J. Neijssen, T. Groothuis, K. Jalink, P. van Veelen, H. Janssen, J. Calafat, J. W. Drijfhout, J. Neeffes, *Immunity* **2003**, *18*, 97.
- [53] A. Townsend, C. Ohlen, J. Bastin, H. G. Ljunggren, L. Foster, K. Karre, *Nature* **1989**, *340*, 443.
- [54] A. Townsend, T. Elliott, V. Cerundolo, L. Foster, B. Barber, A. Tse, *Cell* **1990**, *62*, 285.
- [55] K. M. Paulsson, P. Wang, P. O. Anderson, S. Chen, R. F. Pettersson, S. Li, *Int. Immunol.* **2001**, *13*, 1063.
- [56] K. Paulsson, P. Wang, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1641*, 1.
- [57] M. R. Farmery, S. Allen, A. J. Allen, N. J. Bulleid, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14933.
- [58] S. J. Kang, P. Cresswell, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44838.
- [59] B. Sadasivan, P. J. Lehner, B. Ortmann, T. Spies, P. Cresswell, *Immunity* **1996**, *5*, 103.
- [60] B. Ortmann, J. Chopeman, P. J. Lehner, B. Sadasivan, J. A. Herberg, A. G. Grandea, S. R. Riddell, R. Tampé, T. Spies, J. Trowsdale, P. Cresswell, *Science* **1997**, *277*, 1306.
- [61] G. Raghuraman, P. E. Lapinski, M. Raghavan, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 41786.
- [62] N. Garbi, N. Tiwari, F. Momburg, G. J. Hammerling, *Eur. J. Immunol.* **2003**, *34*, 264.
- [63] S. Li, K. M. Paulsson, S. Chen, H. O. Sjogren, P. Wang, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1581.
- [64] C. A. Peh, N. Laham, S. R. Burrows, Y. Zhu, J. McCluskey, *J. Immunol.* **2000**, *164*, 292.
- [65] M. J. Barnden, A. W. Purcell, J. J. Gorman, J. McCluskey, *J. Immunol.* **2000**, *165*, 322.
- [66] M. E. Paquet, D. B. Williams, *Int. Immunol.* **2002**, *14*, 347.
- [67] A. P. Williams, C. A. Peh, A. W. Purcell, J. McCluskey, T. Elliott, *Immunity* **2002**, *16*, 509.
- [68] B. Park, K. Ahn, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 14337.
- [69] C. F. Higgins, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1992**, *8*, 67.
- [70] M. Dean, A. Rzhetsky, R. Allikmets, *Genome Res.* **2001**, *11*, 1156.
- [71] J. E. Walker, M. Saraste, M. J. Runswick, N. J. Gay, *EMBO J.* **1982**, *1*, 945.
- [72] S. C. Hyde, P. Emsley, M. J. Hartshorn, M. M. Mimmack, U. Gileadi, S. R. Pearce, M. P. Gallagher, D. R. Gill, R. E. Hubbard, C. F. Higgins, *Nature* **1990**, *346*, 362.
- [73] M. M. Gottesman, T. Fojo, S. E. Bates, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 48.
- [74] D. Sanglard, K. Kuchler, F. Ischer, J. L. Pagani, M. Monod, J. Bille, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2378.
- [75] S. Perea, J. L. Lopez-Ribot, W. R. Kirkpatrick, R. K. McAtee, R. A. Santillan, M. Martinez, D. Calabrese, D. Sanglard, T. F. Patterson, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2676.
- [76] C. Zimmerman, K. C. Klein, P. K. Kiser, A. R. Singh, B. L. Firestein, S. C. Riba, J. R. Lingappa, *Nature* **2002**, *415*, 88.
- [77] M. Ehrmann, R. Ehrle, E. Hofmann, W. Boos, A. Schlosser, *Mol. Microbiol.* **1998**, *29*, 685.
- [78] J. Young, I. B. Holland, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1416*, 177.
- [79] M. J. Welsh, A. E. Smith, *Cell* **1993**, *73*, 1251.
- [80] J. M. Pilewski, R. A. Frizzell, *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, S215.
- [81] A. P. Babenko, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan, *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 667.
- [82] P. Manavalan, D. G. Dearborn, J. M. McPherson, A. E. Smith, *FEBS Lett.* **1995**, *366*, 87.
- [83] L. Schmitt, R. Tampé, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 754.
- [84] G. Chang, C. B. Roth, *Science* **2001**, *293*, 1793.
- [85] G. Chang, *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 419.
- [86] G. Verdon, S. V. Albers, B. W. Dijkstra, A. J. Driessen, A. M. Thunnissen, *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 343.
- [87] P. C. Smith, N. Karpowich, L. Millen, J. E. Moody, J. Rosen, P. J. Thomas, J. F. Hunt, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 139.
- [88] N. Karpowich, O. Martsinkevich, L. Millen, Y. R. Yuan, P. L. Dai, K. MacVey, P. J. Thomas, J. F. Hunt, *Structure* **2001**, *9*, 571.
- [89] L. W. Hung, I. X. Wang, K. Nikaido, P. Q. Liu, G. F. Ames, S. H. Kim, *Nature* **1998**, *396*, 703.
- [90] K. Diederichs, J. Diez, G. Greller, C. Müller, J. Breed, C. Schnell, C. Vornrhein, W. Boos, W. Welte, *EMBO J.* **2000**, *19*, 5951.
- [91] R. Gaudet, D. C. Wiley, *EMBO J.* **2001**, *20*, 4964.
- [92] Y. R. Yuan, S. Blecker, O. Martsinkevich, L. Millen, P. J. Thomas, J. F. Hunt, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 32313.
- [93] K. P. Locher, A. T. Lee, D. C. Rees, *Science* **2002**, *296*, 1091.
- [94] L. Schmitt, H. Benabdelhak, M. A. Blight, I. B. Holland, M. T. Stubbs, *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 333.
- [95] K. Nikaido, P. Q. Liu, G. F. Ames, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 27745.
- [96] K. A. Kennedy, B. Traxler, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 6259.
- [97] E. Janas, M. Hofacker, M. Chen, S. Gompf, C. van der Does, R. Tampé, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 26862.
- [98] K. P. Hopfner, A. Karcher, D. S. Shin, L. Craig, L. M. Arthur, J. P. Carney, J. A. Tainer, *Cell* **2000**, *101*, 789.
- [99] R. A. Shilling, L. Balakrishnan, S. Shahi, H. Venter, H. W. van Veen, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2003**, *22*, 200.
- [100] L. Homolya, Z. Holl, U. A. Germann, L. Pastan, M. M. Gottesman, B. Sarkadi, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21493.
- [101] H. Bolhuis, H. W. van Veen, D. Molenaar, B. Poolman, A. J. Driessen, W. N. Konings, *EMBO J.* **1996**, *15*, 4239.
- [102] J. S. Patzlaff, T. van der Heide, B. Poolman, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29546.
- [103] A. E. Senior, M. K. al-Shawi, I. L. Urbatsch, *FEBS Lett.* **1995**, *377*, 285.
- [104] A. E. Senior, D. C. Gadsby, *Semin. Cancer Biol.* **1997**, *8*, 143.
- [105] M. Matsuo, N. Kioka, T. Amachi, K. Ueda, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37479.
- [106] L. Aleksandrov, A. A. Aleksandrov, X. B. Chang, J. R. Rioridan, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15419.
- [107] P. Alberts, O. Daumke, E. V. Deverson, J. C. Howard, M. R. Knittler, *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 242.
- [108] T. Spies, R. DeMars, *Nature* **1991**, *351*, 323.
- [109] S. J. Powis, A. R. Townsend, E. V. Deverson, J. Bastin, G. W. Butcher, J. C. Howard, *Nature* **1991**, *354*, 528.
- [110] T. H. Meyer, P. M. van Endert, S. Uebel, B. Ehring, R. Tampé, *FEBS Lett.* **1994**, *351*, 443.
- [111] S. Urlinger, K. Kuchler, T. H. Meyer, S. Uebel, R. Tampé, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 266.
- [112] V. G. Lacaille, M. J. Androlewicz, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17386.

- [113] G. Velarde, R. C. Ford, M. F. Rosenberg, S. J. Powis, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 46054.
- [114] M. J. Kleijmeer, A. Kelly, H. J. Geuze, J. W. Slot, A. Townsend, J. Trowsdale, *Nature* **1992**, 357, 342.
- [115] K. M. Müller, C. Ebensperger, R. Tampé, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 14032.
- [116] Y. R. Yuan, O. Martsinkevich, J. F. Hunt, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2003**, 59, 225.
- [117] G. Schmees, A. Stein, S. Hunke, H. Landmesser, E. Schneider, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 266, 420.
- [118] S. Hunke, M. Mourez, M. Jehanno, E. Dassa, E. Schneider, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 15526.
- [119] E. W. Hewitt, P. J. Lehner, *Eur. J. Immunol.* **2003**, 34, 422.
- [120] E. Bakos, I. Klein, E. Welker, K. Szabo, M. Müller, B. Sarkadi, A. Varadi, *Biochem. J.* **1997**, 323, 777.
- [121] G. Szakacs, C. Ozvegy, E. Bakos, B. Sarkadi, A. Varadi, *Biochem. J.* **2001**, 356, 71.
- [122] P. M. van Endert, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 14632.
- [123] E. W. Hewitt, S. S. Gupta, P. J. Lehner, *EMBO J.* **2001**, 20, 387.
- [124] C. Kyritsis, S. Gorbulev, S. Hutschenreiter, K. Pawlitschko, R. Abele, R. Tampé, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 48031.
- [125] B. Lankat-Buttgereit, R. Tampe, *FEBS Lett.* **1999**, 464, 108.
- [126] J. Koch, R. Guntrum, S. Heintke, C. Kyritsis, R. Tampé, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 10142.
- [127] S. Heintke, M. Chen, U. Ritz, B. Lankat-Buttgereit, J. Koch, R. Abele, B. Seliger, R. Tampé, *FEBS Lett.* **2003**, 533, 42.
- [128] U. Ritz, F. Momburg, H. P. Pircher, D. Strand, C. Huber, B. Seliger, *Int. Immunol.* **2001**, 13, 31.
- [129] M. Nijenhuis, S. Schmitt, E. A. Armandola, R. Obst, J. Brunner, G. J. Hämmerling, *J. Immunol.* **1996**, 156, 2186.
- [130] L. Neumann, R. Tampé, *J. Mol. Biol.* **1999**, 294, 1203.
- [131] M. J. Androlewicz, P. Cresswell, *Immunity* **1994**, 1, 7.
- [132] M. Colonna, M. Bresnahan, S. Bahram, J. L. Strominger, T. Spies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 3932.
- [133] S. H. Powis, I. Mockridge, A. Kelly, L. A. Kerr, R. Glynn, U. Gileadi, S. Beck, J. Trowsdale, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 1463.
- [134] R. Obst, E. A. Armandola, M. Nijenhuis, F. Momburg, G. J. Hämmerling, *Eur. J. Immunol.* **1995**, 26, 2170.
- [135] S. Daniel, S. Caillat-Zucman, J. Hammer, J. F. Bach, P. M. van Endert, *J. Immunol.* **1997**, 159, 2350.
- [136] P. M. van Endert, R. Tampé, T. H. Meyer, R. Tisch, J. F. Bach, H. O. McDevitt, *Immunity* **1994**, 1, 491.
- [137] G. E. Jung, *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, Wiley-VCH, Weinheim, **1996**.
- [138] J. C. Shepherd, T. N. Schumacher, P. G. Ashton-Rickardt, S. Imaeda, H. L. Ploegh, C. A. Janeway, Jr., S. Tonegawa, *Cell* **1993**, 74, 577.
- [139] S. Uebel, R. Tampé, *Curr. Opin. Immunol.* **1999**, 11, 203.
- [140] I. Bačák, H. L. Snyder, L. C. Antón, G. Russ, W. Chen, J. R. Bennink, L. Urge, L. Otvos, B. Dudkowska, L. Eisenlohr, J. W. Yewdell, *J. Exp. Med.* **1997**, 186, 479.
- [141] M. Gromme, R. van der Valk, K. Slidregt, L. Vernie, R. Liskamp, G. Hämmerling, J. O. Koopmann, F. Momburg, J. Neefjes, *Eur. J. Immunol.* **1997**, 28, 898.
- [142] D. N. Garboczi, P. Ghosh, U. Utz, Q. R. Fan, W. E. Biddison, D. C. Wiley, *Nature* **1996**, 384, 134.
- [143] S. Arora, P. E. Lapinski, M. Raghavan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 7241.
- [144] J. T. Karttunen, P. J. Lehner, S. S. Gupta, E. W. Hewitt, P. Cresswell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 7431.
- [145] M. R. Knittler, P. Alberts, E. V. Deverson, J. C. Howard, *Curr. Biol.* **1999**, 9, 999.
- [146] L. Saveanu, S. Daniel, P. M. van Endert, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 22107.
- [147] R. Tomazin, A. B. Hill, P. Jugovic, I. York, P. van Endert, H. L. Ploegh, D. W. Andrews, D. C. Johnson, *EMBO J.* **1996**, 15, 3256.
- [148] L. Neumann, R. Abele, R. Tampé, *J. Mol. Biol.* **2002**, 324, 965.
- [149] J. J. Neefjes, F. Momburg, G. J. Hämmerling, *Science* **1993**, 261, 769.
- [150] S. Gorbulev, R. Abele, R. Tampé, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 3732.
- [151] M. Chen, R. Abele, R. Tampé, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 29686.
- [152] A. J. Fisher, C. A. Smith, J. B. Thoden, R. Smith, K. Sutoh, H. M. Holden, I. Rayment, *Biochemistry* **1995**, 34, 8960.
- [153] C. A. Smith, I. Rayment, *Biochemistry* **1996**, 35, 5404.
- [154] S. Sharma, A. L. Davidson, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 6570.
- [155] K. Szabo, G. Szakacs, T. Hegeds, B. Sarkadi, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 12209.
- [156] K. Ueda, N. Inagaki, S. Seino, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 22983.
- [157] Y. Hou, L. Cui, J. R. Riordan, X. Chang, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 20280.
- [158] S. Arora, P. E. Lapinski, M. Raghavan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 7241.
- [159] O. Daumke, M. R. Knittler, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 4776.
- [160] E. A. Reits, A. C. Griekspoor, J. Neefjes, *Immunol. Today* **2000**, 21, 598.
- [161] P. M. van Endert, L. Saveanu, E. W. Hewitt, P. Lehner, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, 27, 454.
- [162] A. Rudensky, S. Rath, P. Preston-Hurlburt, D. B. Murphy, C. A. Janeway, Jr., *Nature* **1991**, 353, 660.
- [163] R. M. Chicz, R. G. Urban, J. C. Gorga, D. A. Vignali, W. S. Lane, J. L. Strominger, *J. Exp. Med.* **1993**, 178, 27.
- [164] H. G. Rammensee, *Curr. Opin. Immunol.* **1995**, 7, 85.
- [165] S. M. Shawa, J. M. Vyas, J. R. Rodgers, R. G. Cook, R. R. Rich, *J. Exp. Med.* **1991**, 174, 941.
- [166] S. M. Shawa, J. R. Rodgers, R. G. Cook, R. R. Rich, *Immunol. Res.* **1991**, 10, 365.
- [167] E. Hermel, E. Grigorenko, K. F. Lindahl, *Int. Immunol.* **1991**, 3, 407.
- [168] D. L. Hogue, L. Liu, V. Ling, *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 379.
- [169] F. Zhang, D. L. Hogue, L. Liu, C. L. Fisher, D. Hui, S. Childs, V. Ling, *FEBS Lett.* **2000**, 478, 89.
- [170] M. Chloupkova, L. S. LeBard, D. M. Koeller, *J. Mol. Biol.* **2003**, 331, 155.
- [171] Y. Yamaguchi, M. Kasano, T. Terada, R. Sato, M. Maeda, *FEBS Lett.* **1999**, 457, 231.
- [172] R. Allikmets, B. Gerrard, A. Hutchinson, M. Dean, *Hum. Mol. Genet.* **1996**, 5, 1649.
- [173] F. Zhang, W. Zhang, L. Liu, C. L. Fisher, D. Hui, S. Childs, K. Dorovini-Zis, V. Ling, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 23287.
- [174] A. Kobayashi, M. Kasano, T. Maeda, S. Hori, K. Motojima, M. Suzuki, T. Fujiwara, E. Takahashi, T. Yabe, K. Tanaka, M. Kasahara, Y. Yamaguchi, M. Maeda, *J. Biochem.* **2000**, 128, 711.
- [175] N. P. Restifo, F. Esquivel, Y. Kawakami, J. W. Yewdell, J. J. Mule, S. A. Rosenberg, J. R. Bennink, *J. Exp. Med.* **1993**, 177, 265.
- [176] D. P. Singal, M. Ye, J. Ni, D. P. Snider, *Immunol. Lett.* **1996**, 50, 149.
- [177] T. Kageshita, S. Hirai, T. Ono, D. J. Hicklin, S. Ferrone, *Am. J. Pathol.* **1999**, 154, 745.
- [178] L. Zhang, J. S. Pagano, *J. Virol.* **2001**, 75, 341.
- [179] J. L. Touraine, H. Betuel, G. Souillet, M. Jeune, *J. Pediatr.* **1978**, 93, 47.
- [180] A. Bernaerts, J. E. Vandevenne, J. Lambert, L. S. De Clerck, A. M. De Schepper, *Eur. J. Radiol.* **2001**, 11, 815.
- [181] C. Klein, B. Lisowska-Grospierre, F. LeDeist, A. Fischer, C. Griscelli, *J. Pediatr.* **1993**, 123, 921.
- [182] S. D. Gadola, H. T. Moins-Teisserenc, J. Trowsdale, W. L. Gross, V. Cerundolo, *Clin. Exp. Immunol.* **2000**, 121, 173.

- [183] H. Furukawa, S. Murata, T. Yabe, N. Shimbara, N. Keicho, K. Kashiwase, K. Watanabe, Y. Ishikawa, T. Akaza, K. Tadokoro, S. Tohma, T. Inoue, K. Tokunaga, K. Yamamoto, K. Tanaka, T. Juji, *J. Clin. Invest.* **1999**, 103, 755.
- [184] H. de la Salle, J. Zimmer, D. Fricker, C. Angenieux, J. P. Cazenave, M. Okubo, H. Maeda, A. Plebani, M. M. Tongio, A. Dormoy, D. Hanau, *J. Clin. Invest.* **1999**, 103, R9.
- [185] H. de la Salle, X. Saulquin, I. Mansour, S. Klayme, D. Fricker, J. Zimmer, J. P. Cazenave, D. Hanau, M. Bonneville, E. Hous-saint, G. Lefranc, R. Naman, *Clin. Exp. Immunol.* **2002**, 128, 525.
- [186] M. Vitale, J. Zimmer, R. Castriconi, D. Hanau, L. Donato, C. Bottino, L. Moretta, H. de la Salle, A. Moretta, *Blood* **2002**, 99, 1723.
- [187] A. K. Johnsen, D. J. Templeton, M. Sy, C. V. Harding, *J. Immunol.* **1999**, 163, 4224.
- [188] H. E. Farrell, H. Vally, D. M. Lynch, P. Fleming, G. R. Shellam, A. A. Scalzo, N. J. Davis-Poynter, *Nature* **1997**, 386, 510.
- [189] Lit. [10].
- [190] B. Seliger, T. Cabrera, F. Garrido, S. Ferrone, *Semin. Cancer Biol.* **2002**, 12, 3.
- [191] K. Zhu, J. Wang, J. Zhu, J. Jiang, J. Shou, X. Chen, *Oncogene* **1999**, 18, 7740.
- [192] D. P. Singal, M. Ye, D. Bienzle, *Int. J. Cancer* **1998**, 75, 112.
- [193] J. Alimonti, Q. J. Zhang, R. Gabathuler, G. Reid, S. S. Chen, W. A. Jefferies, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 515.
- [194] C. A. White, S. A. Thomson, L. Cooper, P. M. van Endert, R. Tampé, B. Coupar, L. Qiu, P. G. Parsons, D. J. Moss, R. Khanna, *Int. J. Cancer* **1998**, 75, 590.
- [195] M. J. Maeurer, S. M. Gollin, D. Martin, W. Swaney, J. Bryant, C. Castelli, P. Robbins, G. Parmiani, W. J. Storkus, M. T. Lotze, *J. Clin. Invest.* **1996**, 98, 1633.
- [196] M. V. Corrias, M. Occhino, M. Croce, A. De Ambrosis, M. P. Pistillo, P. Bocca, V. Pistoia, S. Ferrini, *Tissue Antigens* **2001**, 57, 110.
- [197] M. Andersson, S. Paabo, T. Nilsson, P. A. Peterson, *Cell* **1985**, 43, 215.
- [198] H. G. Burgert, S. Kvist, *Cell* **1985**, 41, 987.
- [199] H. G. Burgert, S. Kvist, *EMBO J.* **1987**, 6, 2019.
- [200] E. M. Bennett, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, F. M. Brodsky, *J. Immunol.* **1999**, 162, 5049.
- [201] C. Brander, T. Suscovich, Y. Lee, P. T. Nguyen, P. O'Connor, J. Seebach, N. G. Jones, M. van Gorder, B. D. Walker, D. T. Scadden, *J. Immunol.* **2000**, 165, 2077.
- [202] M. H. Furman, H. L. Ploegh, *J. Clin. Invest.* **2002**, 110, 875.
- [203] L. Lybarger, X. Wang, M. R. Harris, H. W. Virgin IV, T. H. Hansen, *Immunity* **2003**, 18, 121.
- [204] R. Tomazin, N. E. van Schoot, K. Goldsmith, P. Jugovic, P. Sempé, K. Früh, D. C. Johnson, *J. Virol.* **1998**, 72, 2560.
- [205] L. Neumann, W. Kraas, S. Uebel, G. Jung, R. Tampé, *J. Mol. Biol.* **1997**, 272, 484.
- [206] A. Hill, P. Jugovic, I. York, G. Russ, J. Bennink, J. Yewdell, H. Ploegh, D. Johnson, *Nature* **1995**, 375, 411.
- [207] B. Galocha, A. Hill, B. C. Barnett, A. Dolan, A. Raimondi, R. F. Cook, J. Brunner, D. J. McGeoch, H. L. Ploegh, *J. Exp. Med.* **1997**, 185, 1565.
- [208] E. Wiertz, A. Hill, D. Tortorella, H. Ploegh, *Immunol. Lett.* **1997**, 57, 213.
- [209] T. R. Jones, E. J. Wiertz, L. Sun, K. N. Fish, J. A. Nelson, H. L. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 11327.
- [210] P. J. Lehner, J. T. Karttunen, G. W. Wilkinson, P. Cresswell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 6904.
- [211] K. Ahn, A. Gruhler, B. Galocha, T. R. Jones, E. J. Wiertz, H. L. Ploegh, P. A. Peterson, Y. Yang, K. Früh, *Immunity* **1997**, 6, 613.
- [212] R. Zeidler, G. Eissner, P. Meissner, S. Uebel, R. Tampé, S. Lazis, W. Hammerschmidt, *Blood* **1997**, 90, 2390.
- [213] X. Saulquin, M. Bodinier, M. A. Peyrat, A. Hislop, E. Scotet, F. Lang, M. Bonneville, E. Houssaint, *Eur. J. Immunol.* **2001**, 32, 708.
- [214] G. Lautscham, A. Rickinson, N. Blake, *Microbes Infect.* **2003**, 5, 291.
- [215] D. Bauer, R. Tampé, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2002**, 269, 87.
- [216] D. Beinert, L. Neumann, S. Uebel, R. Tampé, *Biochemistry* **1997**, 36, 4694.
- [217] R. Pfänder, L. Neumann, M. Zweckstetter, C. Seger, T. A. Holak, R. Tampé, *Biochemistry* **1999**, 38, 13692.
- [218] K. Ahn, T. H. Meyer, S. Uebel, P. Sempé, H. Djaballah, Y. Yang, P. A. Peterson, K. Früh, R. Tampé, *EMBO J.* **1996**, 15, 3247.
- [219] K. Früh, K. Ahn, H. Djaballah, P. Sempé, P. M. van Endert, R. Tampé, P. A. Peterson, Y. Yang, *Nature* **1995**, 375, 415.
- [220] H. Hengel, U. H. Koszinowski, *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, 9, 470.
- [221] H. Hengel, J. O. Koopmann, T. Flohr, W. Muranyi, E. Goulmy, G. J. Hammerling, U. H. Koszinowski, F. Momburg, *Immunity* **1997**, 6, 623.
- [222] J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, *Comput. Appl. Biosci.* **1994**, 10, 19.