

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

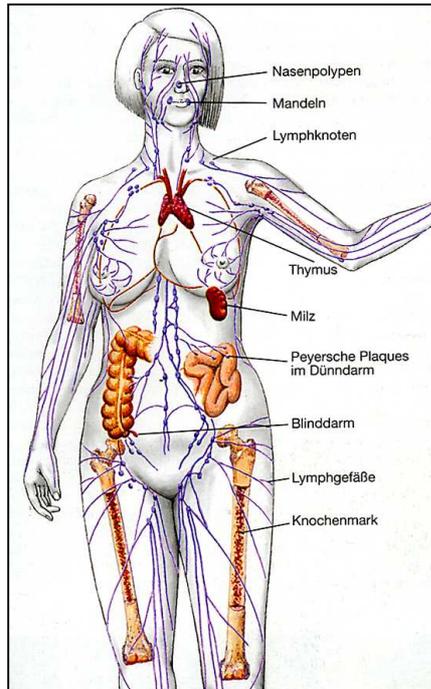


Abb.1: Das lymphatische System
(aus Nossal, 1999).

Die Hauptaufgabe eines Immunsystems (Abb. 1) ist die Abwehr von Krankheitserregern. Es schützt Vertebraten vor Infektionen durch pathogene Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilze. Die Eintrittsstellen für solche Pathogene in den menschlichen Körper sind vor allem die Haut, der Atemtrakt oder die Magen- und Darmschleimhaut. Bereits an diesen Orten wird verhindert, daß ein potentieller Krankheitserreger den gesamten Organismus befallen kann. Das Immunsystem reagiert auf einen eingedrungenen Fremdstoff innerhalb weniger Stunden mit unspezifischen Abwehrmechanismen, die generell auf der Lysis des Fremdstoffes, beispielsweise durch Phagozyten, beruhen (Abb. 2). Diese ersten Immunreaktionen werden als angeborene Immunantwort bezeichnet

und schützen vor einer ganzen Anzahl von Mikroorganismen. Zur Abwehr von infektiöseren Pathogenen sind jedoch meist weitere, dann spezifisch gegen den jeweiligen Krankheitserreger gerichtete Abwehrreaktionen notwendig, die die adaptive Immunantwort leistet. Die bei einer adaptiven Immunantwort auftretenden Reaktionen werden generell durch spezifische Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen initiiert. Ein Pathogen oder Teile davon sind antigene Fremdstoffe, die als Liganden von speziellen Rezeptoren auf den Immunzellen erkannt werden. Solche Rezeptor-tragenden Zellen sind u.a. die Haupteffektoren des adaptiven Immunsystems, die B- und T-Lymphozyten.

B-Lymphozyten sind die Initiatoren einer humoralen Immunantwort, die insbesondere die Abwehr von löslichen Antigenen, wie z.B. extrazellulären Bakterien und Toxinen, bewirkt. Der Antigenkontakt mit einem B-Zell-Rezeptor (BZR) kann zur Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen führen, die im folgenden antigenspezifische

Antikörper sezernieren (Abb. 3). Die Entstehung von Antikörper-Antigen-Komplexen führt hauptsächlich zu einer erleichterten Aufnahme von antigenen Fremdstoffen durch phagozytierende Zellen, wie z.B. Makrophagen. Durch den proteolytischen Verdau des

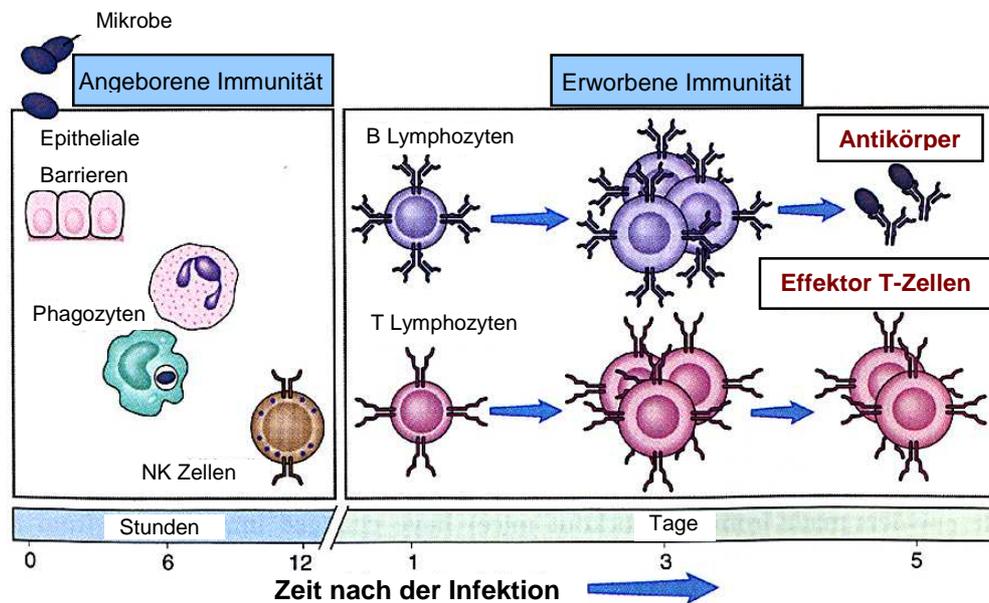


Abb.2: Der Verlauf einer Immunantwort. Angeborene Abwehrmechanismen agieren früh nach einem Infektionsereignis und beruhen auf der Eliminierung des Fremdstoffes durch Internalisierung in Phagozyten wie Makrophagen und Granulozyten. Die folgende spezifische Immunantwort wird von Lymphozyten getragen, die nach der Differenzierung zu Effektorzellen, Antikörper ausschütten und verschiedene akzessorische Immunzellen aktivieren (nach Abbas, Lichtman, Pober "Cellular and Molecular Immunology" 4th Edition. Saunders Company, 2000).

Fremdstoffes können Makrophagen im folgenden zu antigenpräsentierenden Zellen werden, die durch die Zelloberflächenexpression der Antigene zelluläre Immunantworten hervorrufen.

Zelluläre Immunreaktionen werden stets durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors von T-Lymphozyten an Antigene, die auf der Zelloberfläche von Makrophagen oder anderer professionell antigenpräsentierenden Zellen (APCs) exprimiert werden, initiiert. Der Kontakt mit solchen APCs führt zur Differenzierung von T-Lymphozyten zu Effektorzellen (Abb. 3). Reife Effektor-T-Zellen können über ihre T-Zell-Rezeptoren weitere, die gleichen Antigene tragende Zellen aufspüren, die Pathogene beherbergen. Die Gruppe der zytotoxischen Effektor-T-Zellen ist auf diese Weise in der Lage, mit Viren oder intrazellulären Bakterien infizierte Zellen zu identifizieren und sie durch Lyse zu

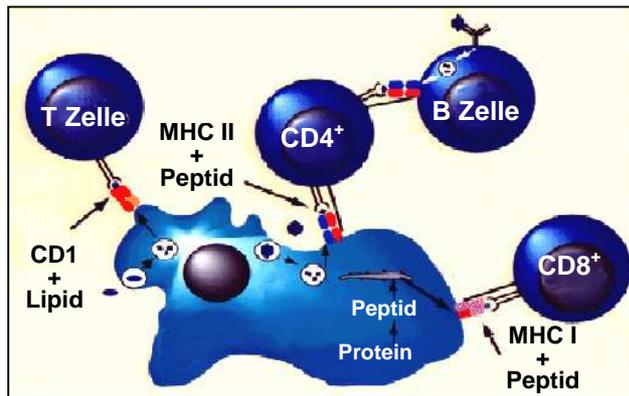


Abb.3: Aktivierung von T- und B-Lymphozyten. Den T-Zellen (CD4+ und CD8+) wird durch eine professionell antigen-präsentierende Zelle (APC) sowohl das Antigen präsentiert als auch ein kostimulatorisches Signal übermittelt. B-Zellen erkennen lösliches Antigen und erhalten durch eine T-Zelle ein zweites Signal. (nach Paul "Fundamental Immunology" 4th Edition. Lippincott-Raven, 1999).

eliminieren. Helfer-T-Zellen aktivieren Phagozyten, was zur Eliminierung von Zellen führt, die ursprünglich extrazelluläre Pathogene internalisiert haben.

Zellassoziierte Antigene werden meist durch den proteolytischen Verdau der Pathogene generiert, die von Zellen durch Internalisierung aufgenommen wurden oder durch eine Infektion ins Zellinnere gelangt sind. Dem proteolytischen Verdau der Pathogenproteine folgt die Bindung an Hilfsmoleküle und der Transport der entstandenen Komplexe zur Zelloberfläche, wo sie über T-Zell-Rezeptoren von T-Zellen erkannt werden können. Die peptidbindenden Hilfsmoleküle sind MHC-Proteine (major histocompatibility proteins), die in zwei verschiedenen Formen auftreten können: MHC-Klasse-I-Moleküle binden zytosolisch erzeugte Peptide im Endoplasmatischen Retikulum (ER). MHC-Klasse-II-Moleküle binden Peptide, die aus dem proteolytischen Verdau in endosomalen oder lysosomalen Kompartimenten stammen. MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe werden vom T-Zell-Rezeptor (TZR) auf zytotoxischen T-Zellen und von Rezeptoren auf Natürlichen Killerzellen gebunden. Der T-Zell-Rezeptor auf Helfer-T-Zellen hingegen erkennt MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe.

1.2 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Die in der Region des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) kodierten Gene wurden ursprünglich näher analysiert, weil sie als Ursache für die starken Abstoßungsreaktionen identifiziert werden konnten, die Empfänger nach der Transplantation fremden Gewebes zeigten. Es tritt dabei eine Immunreaktion gegen das Transplantat ein, weil daraus entstandene, antigene Peptide zur Stimulation der T-

Zellen des Empfängers führen. Die Antigenpräsentation wird durch die in der Region des MHC kodierten MHC-Moleküle bewerkstelligt und durch weitere Proteine gefördert, indem sie die Antigenverarbeitung (-prozessierung) zur Erzeugung von T-Zell-Liganden sicherstellen. Der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen dienen dabei die Proteine TAP, Tapasin, LMP2 und LMP7. HLA-DM und HLA-DO sind Hilfsmoleküle im MHC-Klasse-II-Weg.

1.2.1 Das MHC-Klasse-I-Molekül

MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf praktischen allen somatischen Zellen exprimiert. Sie binden im Zytosol einer Zelle generierte Peptide im Endoplasmatischen Retikulum und transportieren sie über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche.

Genomische Lokalisation

Ein MHC-Klasse-I-Molekül besteht aus einer großen Untereinheit, der Schwere Kette (HC) und einer kleinen Untereinheit, dem β_2 -Mikroglobulin (β_{2m}). Im Menschen sind die Gene der Schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 in der MHC-I-Region lokalisiert (Abb.4). Dort sind in drei Loci die klassischen, hoch polymorphen MHC-Moleküle HLA-A, -B und -C (human leucocyte antigens) und weitere Gene für nicht polymorphe HLA-E, -F, -G und -H Moleküle kodiert. Bis heute sind mehr als 40 HLA-A, 80 HLA-B und 25 HLA-C Allele identifiziert. Der Genlocus der nichtpolymorphen kleinen Untereinheit, β_{2m} , befindet sich auf Chromosom 15. In der Maus werden die drei hoch polymorphen MHC-Klasse-I-Moleküle H-2D, H-2K und H-2L auf Chromosom 17 kodiert und β_{2m} mit sieben Allelen auf Chromosom 2.

Generell läßt sich die Genstruktur einer MHC-Klasse-I-Molekül-Schwerkette folgendermaßen beschreiben: ein einzelnes Exon am 5'-Ende kodiert das Signal-Peptid, welches die Translokation des MHC-Klasse-I-Moleküls in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums bewirkt. Es folgen auf drei getrennten Exons die drei extrazellulären Domänen α_1 , α_2 und α_3 . Das nächste Exon kodiert die

Transmembranregion des Proteins. Der Rest des Gens beinhaltet drei kleine Exons, die die zytoplasmatische Region kodieren.

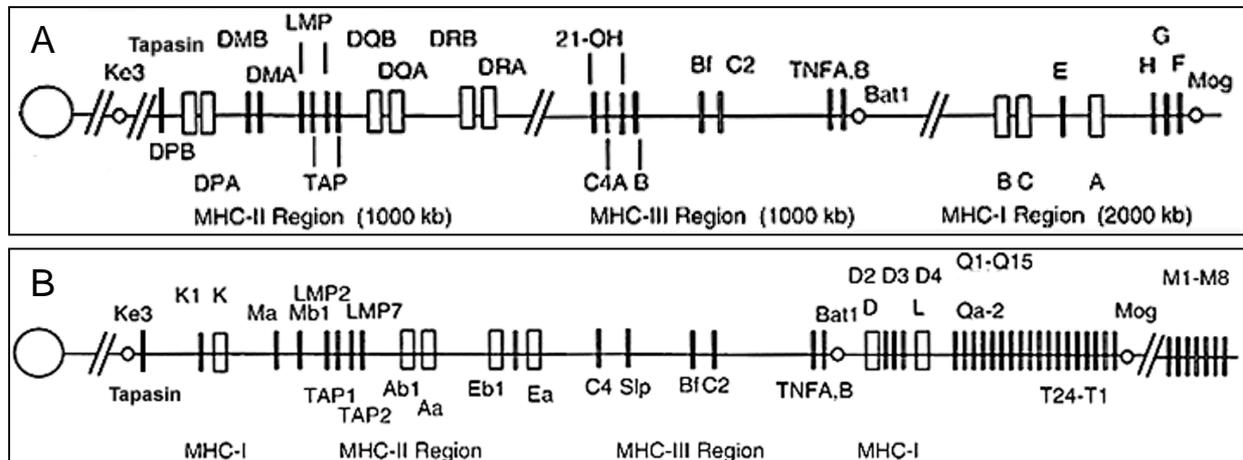


Abb.4: Genkarte des humanen (A) und murinen (B) MHC (links ist die zentromerische, rechts die telomerische Seite). A) Der humane MHC nimmt ca. 4Mb auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 ein. Vom Zentromer zum Telomer sind hintereinander die MHC II-, MHC III- und MHC I-Region angeordnet. In der MHC I-Region des Menschen sind die Gene der klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle HLA-A bis HLA-F kodiert. In der MHC II Region sind sowohl die Gene für Proteine der MHC-Klasse-II Antigenpräsentation (HLA-DR, -DQ, -DP, -DM und -DO) als auch weitere wichtige Gene, die bei der Antigenpräsentation von MHC-Klasse-I-Molekülen eine Rolle spielen, wie TAP1 und TAP2, Tapasin und LMP2 und LMP7, lokalisiert. B) Der murine MHC-Komplex auf Chromosom 17. Die MHC-I-Region ist auf dem Chromosom in zwei Bereiche geteilt, in denen die klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle H-2K, H-2D und H-2L liegen (nach Paul "Fundamental Immunology" 4th Edition. Lippincott-Raven, 1999).

Struktureller Aufbau

Die membranverankerte Schwerekette (45 kDa) ist mit der löslichen leichten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin (12 kDa), nichtkovalent assoziiert. Beide gehören zur Immunglobulin-Genfamilie, da sie wohl aus Duplikationen einer Ursprungs-Immunglobulineinheit hervorgegangen sind. Die Schwere Kette besteht größtenteils aus drei etwa gleich langen, extrazellulären Domänen, der α_1 -, α_2 - und α_3 -Region (Abb.5). Zusätzlich ist ein Bereich, der die Membran durchquert und ein kurzer zytoplasmatischer Teil vorhanden. In der α_2 - und α_3 -Domäne des MHC-Klasse-I-Moleküls befinden sich intramolekulare Disulfidbrücken. Humane MHC-Klasse-I-Moleküle sind in der α_1 -Domäne an Position 86, die sich in der Nähe des carboxyterminalen Endes des Peptids befindet, N-

glykosyliert. Murine H-2 Moleküle tragen einen weiteren Zuckerrest an Position 176, die etwa gegenüber am anderen Ende der Grube in der α_2 -Domäne liegt.

Die leichte Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls, β_2m , besitzt eine einzige Immunoglobulin-ähnliche Domäne, die vor allem asymmetrischen Kontakt mit der α_3 -Domäne der Schwere Kette aufnimmt.

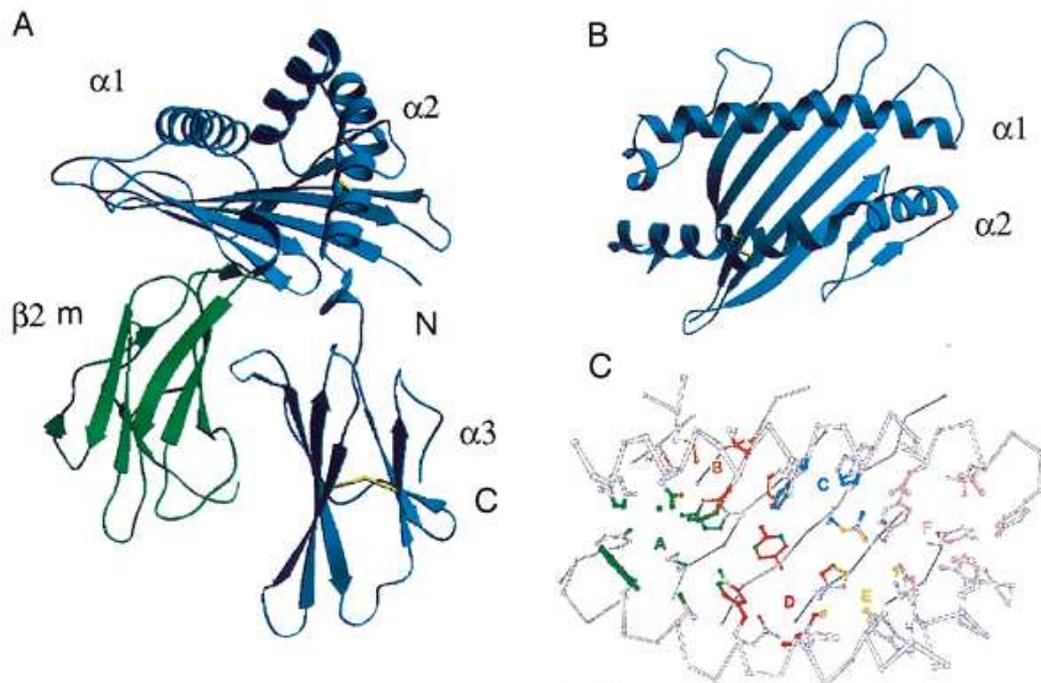


Abb.5: Schematische Darstellungen eines MHC-Klasse-I-Moleküls.

A) Anordnung der großen und kleinen Untereinheit zueinander. B) Ansicht der Peptidbindungsgrube, wobei das Peptid mit seinem N-Terminus links und dem C-Terminus rechts zum liegen kommt.

C) Peptidbindungsgrube mit den Aminosäuren, die die Taschen A bis F bilden (aus Paul "Fundamental Immunology", 4th Edition. Lippincott-Raven Publishers, 1999).

Peptidbindung an das MHC-Klasse-I-Molekül

Aus der ersten Kristallstruktur eines MHC-Klasse-I-Moleküls von Bjorkman und Kollegen konnte man erstmals folgern, daß die Bindung eines Peptides in eine speziell geformte Grube erfolgt (Bjorkman et al., 1987). Diese Peptidbindungsgrube wird im MHC-Klasse-I-Molekül durch die α_1 - und α_2 - Domäne gebildet (Abb.6). Der Boden der Grube besitzt eine acht-strängige β -Faltblattstruktur, die durch zwei α -Helizes begrenzt ist. Die Bindung des meist 8 bis 10 Aminosäuren langen, gestreckt liegenden Peptids

wird größtenteils durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen konservierten Resten in der Klasse-I-Bindungsgrube und vor allem den terminalen Aminosäureresten des Peptids bewirkt. Durch den hohen Polymorphismus der klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle werden bestimmte Positionen in der α_1 - und α_2 -

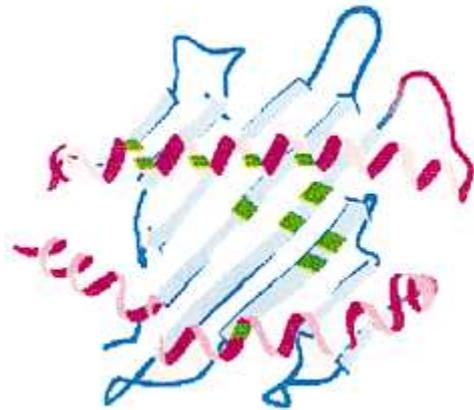


Abb.6: Lage der polymorphen Aminosäuren (grün) in der Peptidbindungsgrube des MHC-Klasse-I-Moleküls. Sowohl in der die Grube nach oben begrenzenden α_1 Helix als auch in der Bindungsgrube selbst sind polymorphe Aminosäuren lokalisiert (aus Paul "Fundamental Immunology", 4th Edition. Lippincott-Raven Publishers, 1999).

Domäne durch verschiedenartige Seitenketten besetzt, die in Richtung des gebundenen Peptides zeigen. Auf diese Weise wird die Bindung spezifischer Peptidseitengruppen ermöglicht, d.h. die Bindungstaschen A bis F formen sich mit allelspezifischen Charakteristika. Beispielsweise besitzt das HLA-B44-Molekül eine relativ tiefe F-Tasche, die die Bindung eines Peptids mit aromatischen Aminosäuren am Carboxyterminus bevorzugt (DiBrino et al., 1995). Bei der Analyse der gebundenen Peptide mehrerer Klasse-I-Allele stellte man zudem fest, daß konkrete Aminosäuren in bestimmten Positionen eines Klasse-I-Allels bevorzugt auftreten (Übersicht in Rammensee et al., 1995). Diese als Anker bezeichneten Positionen liegen meist am carboxyterminalen Ende und an Position 2 des Peptids. Aus weiteren Ergebnissen von Peptidbindungsanalysen erhält man Bindungsmotive, die insbesondere für Voraussagen potentieller von T-Zellen erkannter Peptide (T-Zell-Epitope) wertvoll sind. Die weniger konservierten Reste der Nicht-Ankeramino-säuren zeigen aus der Grube und werden vom T-Zell-Rezeptor abgetastet.

Die Aminosäurezusammensetzung und Struktur eines gebundenen Peptids bestimmt in entscheidender Weise die Lebensdauer des MHC-Peptid-Komplexes. Dabei verstärken sich die Bindung von β_2m und Peptid an die Schwere Kette in kooperativer Weise (Parker et al., 1992). Diese Tatsache schafft einerseits die Grundlage für eine erfolgreiche Peptidbindung im ER und erschwert andererseits nach der Dissoziation von β_2m an der Zelloberfläche eine Peptidbindung an die verbleibende Schwere Kette. So

kann stets die Bindung aller Peptide von den ER-Proteinen im Beladungskomplex kontrolliert werden und eine Auswahl von hochaffinen Peptiden stattfinden (weiteres siehe unter 1.4.4).

1.2.2 Der Peptid-Transporter TAP

Im Jahre 1990 wurde von drei Gruppen gezeigt, daß in den MHC-Klasse-II-Regionen der Ratte, der Maus und des Menschen zwei Gene lokalisiert sind, die denen von bekannten ABC-Transportern (ATP-binding cassette transporters) ähneln (Deverson et al., 1990; Trowsdale et al., 1990; Spies et al., 1990). Die Genprodukte bilden den aus den zwei heterologen Untereinheiten TAP1 und TAP2 bestehenden Peptid-Transporter TAP (transporter associated with antigen processing). Die humanen TAP1 und TAP2 Gene sind beide etwa 10 kb groß und besitzen jeweils 11 Exons. Sie kodieren für Proteine mit Molekulargewichten von 81kDa und 75kDa.

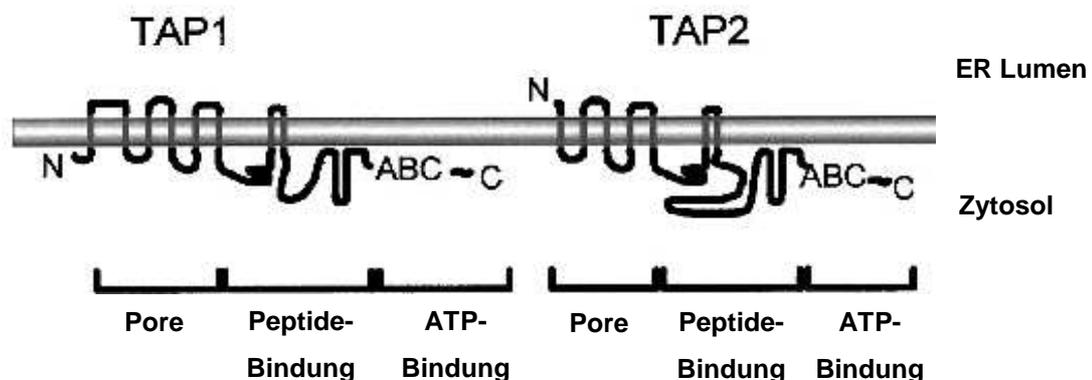


Abb.7: Schematische Darstellung der angenommenen Membran-Topologie und Domänen-Struktur von menschlichem TAP1 und TAP2 in der Membran des ER (nach Vos et al., 1999).

TAP ist der Familie der ABC-Transporter zuzuordnen, die als gemeinsame Merkmale hydrophile Nukleotidbindungsstellen und hydrophobe, porenbildene Transmembrandomänen aufweisen (Übersicht in Schwiebert, 1999). Sie sind in der Lage, ihr Substrat ATP-abhängig über eine Membran zu transportieren (weiteres siehe unter 1.4.3). So werden beispielsweise vom MDR (multidrug resistance related protein) und P-Glycoprotein hydrophobe Drogen, vom CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) Chlorid-Ionen und vom Opp (oligo peptide permease)-

Transporter aus *Salmonella typhimurium* kurze Peptide transportiert (Gottesman und Pastan, 1993; Riordan et al., 1989; Hiles et al., 1987).

Nach neuesten Analysen besitzt humanes TAP1 acht Membrandurchgänge und einen im Zytoplasma liegenden Aminoterminus (Vos et al., 1999). TAP2 durchquert die Membran nur sieben Mal, wobei der Aminoterminus im ER lokalisiert ist (Abb. 7). In der im Zytoplasma liegenden carboxyterminalen Domäne von TAP1 und TAP2 (etwa 280 Aminosäuren) befindet sich die ATP-Bindungskassette (Müller et al., 1994; Wang et al., 1994). Sie besteht aus den sogenannten Walker A und B Motiven und der dazwischen liegenden C-Schleife, die möglicherweise Kontakt mit der letzten zytoplasmatischen Schleife vor der ATP-Kassette hat (Cotten et al., 1996). Die Peptidbindungsstellen am TAP-Molekül liegen in den jeweils letzten beiden zytoplasmatischen Schleifen N-terminal vor der ATP-Bindungsregion (Nijenhuis et al., 1996; Nijenhuis und Hämmerling, 1996).

Da TAP weder eine ER-Signalsequenz noch ein ER-Retentionssignal der bekannten Art besitzt, weiß man bislang nicht, welche Chaperone für die Faltung und ER-Membraninsertion vonnöten sind. Ein möglicher Faltungshelfer könnte das Protein Tapasin sein. Ortmann und Kollegen konnten bereits zeigen, daß die Expression von TAP in Abwesenheit von Tapasin deutlich geringer ist (Ortmann et al., 1996).

1.2.3 Tapasin

Im Jahr 1994 wurde erstmals ein etwa 48 kD großes Protein beschrieben, das nach Lyse von Zellen im milden Detergenz Digitonin mit dem Peptidtransporter TAP kopräzipitiert werden konnte (Ortmann et al., 1994). Das Protein wurde als Akronym von "TAP-associated glycoprotein" Tapasin benannt.

Das Gen für humanes Tapasin ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 in der sogenannten „ausgedehnten“ MHC-II-Region, 180 kb zentromerisch von den MHC-Klasse-II-HLA-DP-Genen und ca. 500 kb von TAP1 und TAP2 lokalisiert (Herberg et al., 1998a). Die 8 Exons kodieren ein 448 Aminosäuren langes Transmembranprotein vom Typ I, dessen überwiegender Teil im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums liegt. Dem luminalen, aminoterminalen Bereich folgt ein Membrandurchgang und ein relativ kurzer zytoplasmatischer Carboxyterminus.

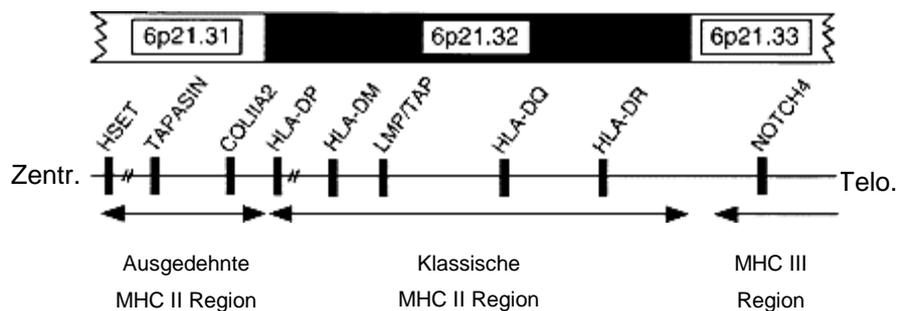


Abb.8: Schematische Darstellung der Lokalisation des humanen Tapasin-Gens auf Chromosom 6. Tapasin ist in der ausgedehnten MHC II Region, zentromerisch von der klassischen MHC-II-Region, ca. 500 kb von TAP entfernt kodiert (nach Herberg et al., 1998a).

Die Domäneneinteilung ist in Abbildung 9 angedeutet. Nach der Abspaltung der 20 Aminosäuren langen Signalsequenz entsteht das reife Tapasinprotein. Der N-terminale Bereich des Proteins hat keine Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen, enthält jedoch eine halbe Ig-ähnliche Domäne, die zwei Cysteinreste beinhaltet. Zwischen den Aminosäuren 136 und ca. 380 befinden sich eine rudimentäre und eine vollständige Ig-ähnliche Domänen. In der membranproximalen Ig-ähnlichen Domäne bildet sich eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cysteinresten an Position 295 und 362 aus (Frangoulis et al., 1999). Tapasin zählt man aus diesem Grund zur Immunoglobulingen-

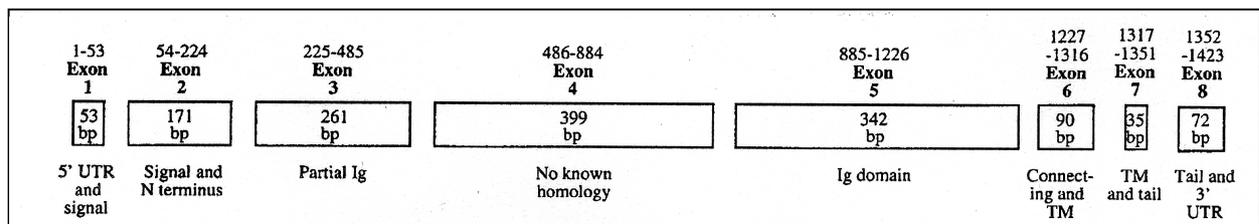


Abb.9: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur des humanen Tapasin-Gens (nach Herberg et al., 1998b).

Superfamilie. Am Asparaginrest 233 wird Tapasin N-glykosyliert. Der Membrandurchgang wird durch die Aminosäuren 394 bis 416 gebildet, wobei die positiv geladene Aminosäure Lysin an Position 408 ungewöhnlich ist. Die Abfolge von drei Leucinresten in der Transmembrandomäne in Abständen von sieben bis acht Aminosäuren ist ebenfalls auffällig. Es kann spekuliert werden, ob sich ein „Leucin-Reißverschluss“ bildet, eine Helix mit einem Band aus übereinander liegenden hydrophoben Leucin-Seitenketten, die mit einer zweiten Helix dieser Art oder anderen

hydrophoben Strukturen in Wechselwirkung treten kann. Am carboxyterminalen Ende befindet sich ein Dilysinmotiv, das als ER-Retentionssignal agieren könnte (Pääbo et al., 1987).

Die ersten Hinweise zur Funktion von Tapasin ergeben sich aus Experimenten mit der Tapasin-defizienten, humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie 721.220 (.220). Diese Zelllinie, die von DeMars und Kollegen Anfang der 80er Jahre generiert wurde, zeigt allelspezifische Defekte in der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen (DeMars et al., 1985). Grandea und Kollegen konnten nachweisen, daß in .220-Zellen die Wechselwirkung zwischen dem MHC-Klasse-I-Molekül und TAP gestört ist. In anderen Zelllinien konnte Tapasin hingegen sogar bei Fehlen von TAP mit dem MHC-Klasse-I-Molekül oder bei Abwesenheit von β_2m mit TAP isoliert werden (Granda et al. 1995). Tapasin verkürzt demnach als ein Brückenmolekül die Entfernung zwischen dem Ort der Peptidzufuhr (TAP) und dem peptidbindenden MHC-Molekül.

Granda und Kollegen beobachteten bei Abwesenheit von Tapasin eine verminderte Stabilität des HC/ β_2m -Dimers (Granda et al., 1997). Da durch Peptidzugabe eine Stabilisierung des MHC-Klasse-I-Moleküls erreicht wird, vermutet man, daß Tapasin die Peptidbindung verbessert oder an manche MHC-Klasse-I-Allele erst ermöglicht. Auf welche Weise Tapasin diese Funktion ausübt, sollte innerhalb der vorliegenden Promotionsarbeit geklärt werden.

1.3 Chaperone für MHC-Klasse-I-Moleküle

MHC-Klasse-I-Moleküle müssen vor der Peptidbindung im ER glykosyliert werden und ihren korrekten Faltungszustand einnehmen. Sie werden wie jedes neu synthetisierte ER-Protein durch Chaperone bei der Faltung unterstützt, wobei sie insbesondere mit den lektinartigen Chaperonen Calnexin und Calretikulिन assoziieren (Übersicht in Hauri et al., 2000). Auch die Bildung ihrer intramolekularen Disulfidbrücken wird vor dem Transport zur Plasmamembran überprüft, wobei diese Aufgabe wohl die Thioisomerase ER60 übernimmt. Die Faltungskontrolle ("ER quality control") durch ER-Chaperone wirkt sich unmittelbar auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression aus, da mißgefaltete Proteine im ER zurückgehalten werden. So ist anzunehmen, daß die Fehlfunktion eines dieser Faltungshelfer zu einer Störung der Peptidpräsentation führt.

1.3.1 Calnexin (p88 oder IP90)

Calnexin ist ein im ER lokalisiertes, 65 kDa großes, Typ-I-Transmembranprotein. Es bindet, möglicherweise direkt in der Nähe des Translokationsapparates, insbesondere an translozierte Glykoproteine (Ihara et al., 1999). Für Calnexin sind Interaktionen mit mehreren Membran- und sekretorischen Proteinen nachgewiesen worden, was auf eine Funktion als recht abundantes Chaperon schließen läßt (Ou et al., 1993). Calnexin scheint als ein Faltungshelfer zu agieren, der die unspezifische Aggregation von ER-Proteinen verhindert (Hebert et al., 1996). Die initiale Bindung von Calnexin an die neu translozierte Schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls erfolgt über die Erkennung des Kohlenhydratrestes, wird aber wohl über Strukturen der Proteineinheit verstärkt (Degen et al., 1991; Hochstenbach et al., 1992; Zhang et al., 1995; Vassilakos et al., 1996). Calnexin dissoziiert von der Schwere Kette der meisten menschlichen MHC-Klasse-I-Allele, sobald β_2m an HC bindet (Nöbner und Parham, 1995). Das Calnexin-ähnliche Chaperon Calretikulin wird stattdessen mit dem humanen HC/ β_2m -Dimer assoziiert gefunden (Sadasivan et al., 1996). Jedoch konnte Calnexin in Maus-Zellen noch nach der Assoziation von β_2m am TAP-Beladungskomplex detektiert werden (Carreno et al., 1995; Suh et al., 1996). Diese Tatsache spricht dafür, daß Unterschiede im Kohlenhydratrest größeren Einfluß auf diese Chaperon-Interaktionen ausüben (Zhang und Salter, 1998). Calnexin scheint für die MHC-Klasse-I-Assemblierung abkömmlich zu sein. Die Calnexin-negative T-Zelllinie CEM.NKR zeigt keine offensichtlichen Defekte in der Peptid-Beladung und Funktionalität der MHC-Klasse-I-Komplexe (Scott und Dawson, 1995). Es wird vermutet, daß ein weiteres ER-Chaperon, wahrscheinlich BiP (Immunoglobulin Binding Protein), die Rolle von Calnexin übernimmt (Balow et al., 1995).

1.3.2 Calretikulin

Das Chaperon Calretikulin ist ein 46 kDa großes Lektin, das zu Calnexin einige Sequenzhomologien aufweist (Krause und Michalak, 1997). Es ist ein lösliches Protein, das vor allem im ER lokalisiert ist, jedoch auch schon im Zellkern, an der Plasmamembran und im Zytosol von Zellen nachgewiesen werden konnte (Peterson et al., 1995). Wie bei Calnexin werden Glykoproteine anhand der Kohlenhydratkette der

Form $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ über den ersten Glukoserest und vier angrenzende Mannosereste erkannt (Otteken und Moss, 1996). Die Bindung an verschiedene Substrate im ER, die auch nicht glykosylierte Proteine sein können, ist calciumabhängig, und Zink scheint für bestimmte Konformationsänderungen zwischen dem Substrat und Calretikulin notwendig zu sein (Saito et al., 1999; Corbett et al., 2000). Durch seine Calcium-Speicher-Aktivität oder seine Chaperonaktivität scheint Calretikulin die Aktivität von ER60, PDI und BiP zu modulieren (Corbett et al., 1999). An der MHC-Klasse-I-Schwere Kette wurde Calretikulin bisher nur gefunden, wenn diese mit $\beta_2\text{m}$ assoziiert vorlag (Sadasivan et al., 1996). Es ist anzunehmen, daß die von $\beta_2\text{m}$ induzierte Konformation der Schweren Kette die Assoziation mit Calretikulin stärkt (Rodan et al., 1996).

1.3.3 ER60 (ERp57, grp58, ERp61)

ER60 ist ein 57kDa großes, lösliches ER-Protein mit Thioisomerase-Aktivität (Hirano et al., 1995). Man nimmt an, daß ER60 Cysteinreste sowohl oxidieren als auch reduzieren und auf diese Weise Disulfidbrücken knüpfen wie auch lösen kann. Aufgrund dieser Funktion ist ER60 in der Lage, die Bildung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken in Proteinen auszuführen. ER60 weist Sequenzhomologien zu PDI (Proteindisulfid isomerase) auf und zeigt eine ähnliche Chaperonaktivität (Freedman et al., 1994). Die Thioisomeraseaktivität von ER60 scheint effizienter zu sein, wenn Calretikulin oder Calnexin ebenfalls im Substratkomplex vorhanden sind (Zapun et al., 1998; Oliver et al., 1999). Lindquist und Kollegen fanden schon zu einem frühen Zeitpunkt in der MHC-Klasse-I-Assemblierung eine Bindung von ER60 an die Schwere Kette (Lindquist et al., 1998). Andere Gruppen haben zusätzlich beobachtet, daß ER60 Teil des Beladungskomplexes um TAP ist (Morrice und Powis, 1998; Hughes und Cresswell, 1998). Ob sich ER60 zwischenzeitlich vom Klasse-I-Molekül löst, war bislang unklar. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß ER60 zusätzliche eine Cysteinproteaseaktivität besitzt (Urade et al., 1992). Es kann spekuliert werden, ob ER60 mit dieser Aktivität das Zurechtschneiden (trimming) von MHC-Klasse-I-Liganden im ER bewirken kann. Trifft diese Vermutung zu, hätte das Protein eine ganz spezifische Funktion bei der Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen mit optimierten Peptidsubstraten.

1.4 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle

Zur Präsentation von Antigenen auf ihrer Plasmamembran muß eine Zelle einige zelluläre Mechanismen aktivieren:

- Peptide müssen im Zytosol proteolytisch generiert und dabei auf eine für die MHC-Klasse-I-Bindung passende Länge gespalten werden,
- sie müssen durch TAP über die Membran ins ER-Lumen gebracht werden und
- im ER stabil an MHC-Klasse-I-Moleküle binden.

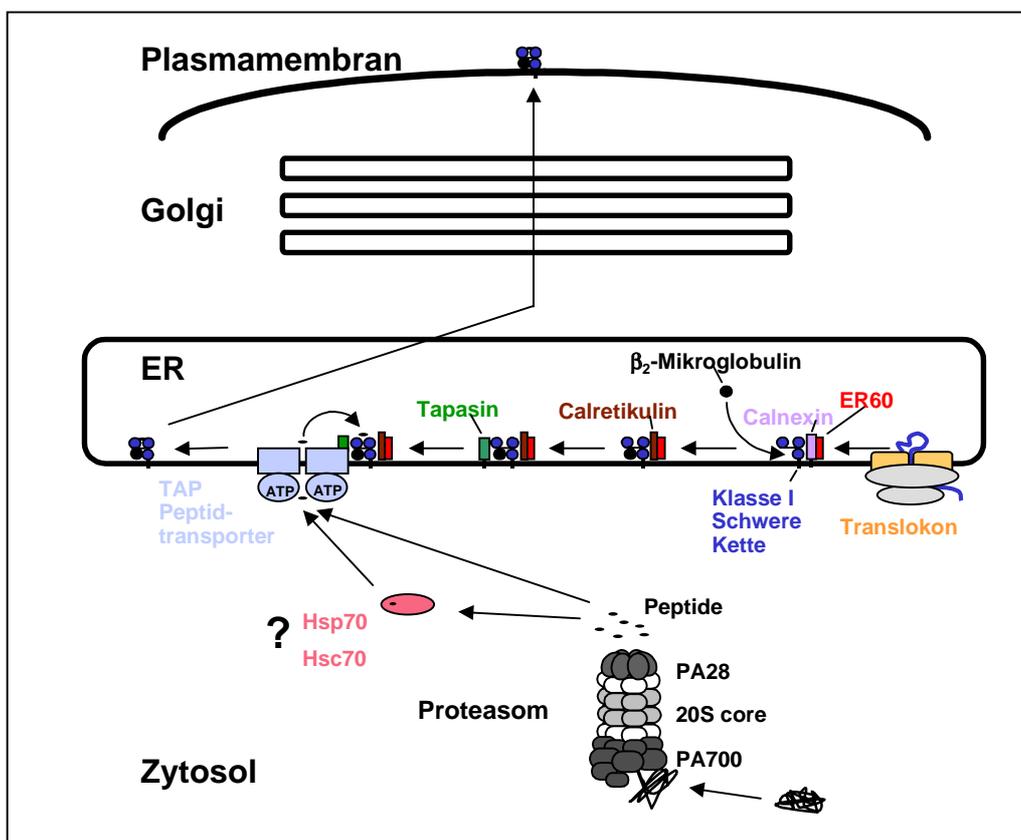


Abb. 10: Antigenpräsentation im MHC-Klasse-I-Weg. Nach der proteolytischen Degradation von Proteinen im Zytosol werden die entstandenen Peptide durch TAP ins ER transportiert. Durch die Wirkung von Tapasin wird eine Brücke zwischen dem vorgefalteten Klasse-I-Molekül und TAP gebildet, und die Peptidbeladung erfolgt. Hat sich ein ausreichend stabiler Komplex formiert, wird dieser über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche gebracht (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. F. Momburg).

1.4.1 Antigenprozessierung im Zytosol

Praktisch jede Zelle generiert permanent aus allen zytosolischen Proteinen durch Proteolyse kurze Peptidfragmente. Alle eukaryontischen Zellen besitzen für diese Aufgabe Proteasomen, multikatalytische Proteinkomplexe aus mehreren Untereinheiten (Übersicht in Baumeister et al., 1998). Das ca. 700 kDa große 20S Proteasom besteht aus 28 Untereinheiten, die zu vier Ringen gestapelt sind. Dieser Kernkomplex kann sich mit dem PA28-Aktivator-Komplex oder dem PA700-Aktivator zusammenlagern und das 26S-Proteasom bilden. Hauptsächlich gewährleisten die konstitutiv exprimierten Proteasekomplexe den Abbau ausgedienter zelleigener Proteine (Übersicht in Hilt und Wolf, 1996). Gelangen jedoch zellfremde Proteine ins Zytosol, werden zudem weitere, antigene Peptidfragmente für die MHC-Klasse-I-Bindung produziert (Übersicht in Niedermann et al. 1999). So wird ein erster Schritt zur Identifizierung von Viruspartikeln, Proteinen aus endogenen Mikroben und tumorassoziierten Onkogenprodukten gemacht (Übersichten in Goldberg und Rock, 1992; Ploegh, 1997). Die zur MHC-Klasse-I-Bindung notwendige Peptidlänge von 8-12 Aminosäuren kann durch die Aktion von mindestens drei verschiedenen Endopeptidase-Aktivitäten des Proteasoms erreicht werden. Die Peptidbindungsspaltung wird so hinter basischen, sauren oder hydrophoben Aminosäuren möglich (Übersichten in Hilt und Wolf, 1996). Zwei nicht-konstitutive Untereinheiten des Proteasoms LMP2 und LMP7 (low molecular mass proteins) sind in der MHC-Region kodiert (Glynne et al., 1991; Ortiz-Navarrete et al., 1991; Kelly et al., 1991) und können wie andere Komponenten des Antigenprozessierungsweges durch $\text{INF-}\gamma$ induziert werden, um Teil des sogenannten Immunoproteasoms zu werden (Übersichten in Lehner und Cresswell, 1996; Groettrup et al., 1996). Welche Rolle diese induzierbaren Untereinheiten bei der Generierung von antigenen Peptidepitopen spielen, bleibt jedoch offen. Es gibt sowohl Hinweise, daß die durch sie induzierte Änderung der proteolytischen Aktivität des Proteasoms neue T-Zellepitope produziert als auch ursprüngliche zerstört werden (Luckey et al., 1998; Morel et al., 2000). Zur Generierung bestimmter Peptidfragmente für die MHC-Klasse-I-Beladung sind wohl teilweise auch andere zytosolische und ER-residente Proteasen nötig (Übersicht in York et al., 1999). Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, daß Proteasomen bestimmte Spaltprodukte generieren, die N-terminal verlängerte MHC-Klasse-I-Liganden darstellen. Zudem werden manche natürlichen

Epitope durch die Addition flankierender Sequenzen besser von TAP transportiert (Neisig et al., 1995).

Der Weg der im Zytosol erzeugten Peptidfragmente zum Endoplasmatischen Retikulum, wo die Bindung an MHC-Klasse I Moleküle geschieht, ist weitestgehend unaufgeklärt. Einen Schutz vor frühzeitiger Degradation bieten möglicherweise Hitzeschockproteine vom Hsp70- oder Hsp90-Typ (Srivastava et al., 1994). Am ER angekommene Peptide werden durch den TAP-Peptid-Transporter TAP ins Lumen gebracht.

1.4.1 Peptidtransport ins ER

Der Peptidtransport vom Zytosol in das Lumen des ER durch TAP geschieht in mehreren Schritten (Übersicht in Reits et al., 2000).

Es wurde gefunden, daß der Peptidtransport ins ER grundsätzlich von ATP angetrieben

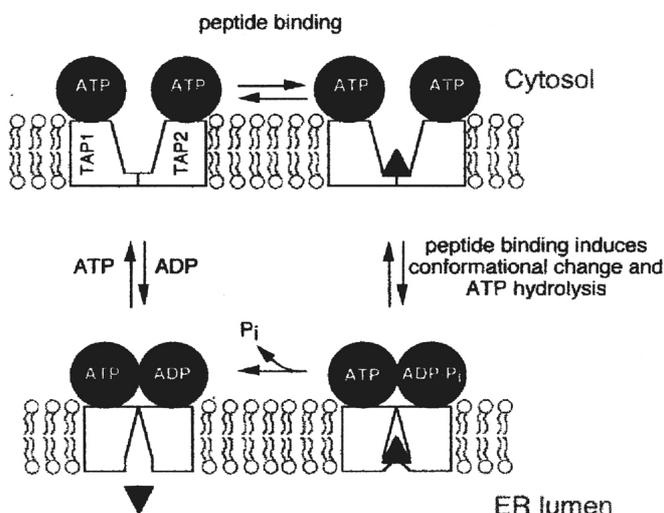


Abb.11: Schematische Darstellung eines hypothetischen Transportzyklus von TAP. Peptid (Dreiecke) und ATP binden unabhängig voneinander an TAP. Die Peptidbindung induziert eine strukturelle Reorganisation des TAP-Komplexes, bewirkt die ATP-Hydrolyse und daraus folgend die Translokation des Peptids (aus Lankat-Buttgereit und Tampé, 1999).

wird (Neefjes et al., 1993b; Androlewicz et al., 1993). Andere Trinukleotide können ebenfalls als Energielieferanten dienen. Sowohl die Bindung von ATP als auch von Peptid an TAP sind nach bisherigen Ergebnissen voneinander unabhängig (Endert et al., 1994; Androlewicz und Cresswell, 1994; Russ et al., 1995). Es wird angenommen, daß die Peptidbindung substratspezifisch eine Konformationsänderung in der Nukleotidbindungsregion hervorruft (Abb. 11). Demgemäß erfolgt die ATP-Hydrolyse und der Peptidtransport nur dann, wenn an TAP ein passendes Peptid gebunden hat. Möglicherweise ist dabei zusätzlich eine konzertierte Aktivierung beider ATP-

Bindungsdomänen, wie schon bei anderen ABC-Transporter beschrieben, für den Transport eines Substratmoleküls notwendig.

TAP transportiert bevorzugt Peptide mit einer Länge von 8 bis 12 Aminosäuren (Momburg et al., 1994a; Heemels und Ploegh, 1994). Peptide dieser Größe werden auch von MHC-Klasse-I-Molekülen am effizientesten gebundenen (Elliott et al., 1992). Es wurde in vitro der Transport von bis zu 40 Aminosäuren langen Peptiden beobachtet (Koopmann et al., 1996). Diese langen Peptide werden wahrscheinlich vor der Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle von Proteasen, die entweder ER-resident sind oder das Peptid nach einem Rücktransport ins Zytosol erkennen, weiter verkürzt (Falk et al., 1990; Roelse et al., 1994; Paz et al., 1999).

TAP-Peptid-Transporter-Moleküle aus verschiedenen Spezies transportieren Peptide mit unterschiedlicher Präferenz, wobei die carboxyterminale Aminosäure die Spezifität bestimmt (Momburg et al., 1994b; Neefjes et al., 1995). Murines TAP und der Ratten-Transporter, der aus rTAP1 und dem rTAP2^u-Allel zusammengesetzt ist, transportieren solche Peptide bevorzugt, die verzweigte aliphatische oder aromatische (hydrophobe) Aminosäurereste am C-Terminus besitzen (Schumacher et al., 1994, Momburg et al., 1994b). Humanes TAP und rTAP1/rTAP2^a hingegen zeigen einen permissiven Phänotyp und selektieren nach diesen Kriterien keine Peptide (Neefjes et al., 1995). Die Transportmuster von Peptiden stimmen erstaunlicherweise mit den speziesspezifisch bevorzugten Peptidepitopen überein, die am effizientesten an MHC-Klasse-I-Moleküle (insbesondere in die F-Tasche) binden (Powis et al., 1996). Diese Tatsache spricht dafür, daß sich die Substratspezifitäten von TAP und Klasse-I-Molekülen koevolutionär entwickelt haben.

Die peptidselektionierenden Aminosäuren befinden sich jeweils bei TAP1 und TAP2 in den letzten beiden zytoplasmatischen Schleifen vor der ATP-Bindungsdomäne in der Nähe der Membran (Nijenhuis et al., 1996). Speziell die Aminosäure an Position 374 von hTAP2 moduliert die Transportspezifität (Armandola et al., 1996). Die Substratelektion wird beim TAP-Transporter der Ratte besonders von den zytoplasmatisch gelegenen Aminosäuren 217/218 und 374/380 kontrolliert (Momburg et al., 1996).

Neben seiner Peptidlängenselektion beeinflusst TAP das Repertoire an potentiellen MHC-Klasse-I-Substraten jedoch relativ wenig. Es ist anzunehmen, daß die eigentliche Funktion von TAP vor allem die Zufuhr von möglichst großen Peptidmengen und nicht

eine Selektion von bestimmten T-Zellepitopen ist. So werden sogar manche immunodominanten Epitope mit einem Prolin an Position 3 weniger effizient transportiert als nach einem Aminosäureaustausch an dieser Position (Neisig et al., 1995). Es ist daher anzunehmen, daß verschiedene aminoterminal verlängerte Vorläuferpeptide ins ER gebracht werden, die von einer ER-residenten Aminopeptidase auf die für MHC-Klasse-I-Moleküle passende Länge getrimmt werden (Paz et al., 1999; Lauvau et al., 1999).

1.4.3 Assemblierung des Peptidbeladungskomplexes im ER

Zur Bildung eines stabilen, ternären MHC-Komplexes aus der Schwere Kette (HC), β_2m und dem Peptid sind konzertierte Interaktionen mit mehreren Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum notwendig, die in ihrer Art und Funktion nur teilweise verstanden sind (Übersicht in Cresswell et al., 1999).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, daß die Schwere Kette des MHC-Moleküls nach seiner Translokation ins ER-Lumen, vom Lektin Calnexin gebunden wird (Hochstenbach et al., 1992; Degen et al., 1992). Nach der Assoziation mit β_2m wird die Konformation des Klasse-I-Moleküls erreicht, die die Bildung eines Peptids erlaubt. Erfolgt zu diesem Zeitpunkt keine stabile Peptidbeladung, wird das MHC-Klasse I Molekül wohl mit Calretikulin (David et al., 1993), ER60 (Lindquist et al., 1998; Hughes

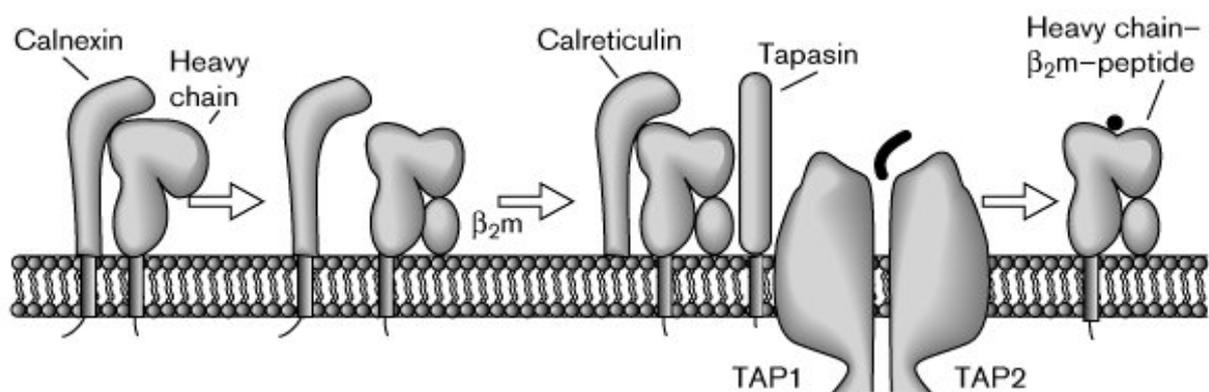


Abb. 12: Schematische Darstellung der MHC-Klasse-I-Assemblierungsschritte im ER. Bildung des Superkomplexes aus TAP, Tapasin, β_2m , der Schwere Kette (HC) und Calretikulin nach Ablösen von Calnexin. Die Peptidbindung an die Schwere Kette und führt zum Abdissoziieren des MHC-Peptid-Komplexes von TAP (aus Koopmann et al., 1997).

und Cresswell, 1998; Morrice und Powis, 1998) und Tapasin in den Beladungskomplex um TAP integriert (Ortmann et al., 1994; Grandea et al., 1995). Anhand der Ergebnisse von Ortmann und Kollegen, die die Stöchiometrie der TAP1-assoziierten Komponenten bestimmten, kann die kleinste Einheit als ein Komplex aus einem TAP1-Molekül, einem TAP2-Molekül, durchschnittlich vier Tapasin-Molekülen, vier HC-Molekülen, zwei bis drei Calretikulin-Molekülen und einem Calnexin-Molekül definiert werden (Ortmann et al., 1997).

1.4.4 Peptidbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle

Die Struktur der Peptidbindungsgrube ermöglicht und bevorzugt die Bindung eines 8 bis 10 Aminosäuren langen Peptids. Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der MHC-Klasse-I-Bindungsgrube und bestimmten Aminosäureresten des Peptids entsteht eine stabile Struktureinheit. Man nimmt an, daß Peptide, die den ternären Komplex nur schwach stabilisieren können, entweder im ER durch höher affine Peptide ersetzt werden oder auf dem Weg zur Zelloberfläche vom MHC-Klasse-I-Molekül dissoziieren (Sijts und Pamer, 1997). Neben der Länge eines Peptides bestimmt seine Aminosäurezusammensetzung entscheidend die Bindungsstärke zum MHC-Molekül. Es kann für die Bindung ein ähnlicher Mechanismus wie für MHC-Klasse-II-Moleküle postuliert werden (Übersicht in Vogt und Kropshofer, 1999). Demgemäß würden zunächst die Ankeraminosäuren und die freien Amino- und Carboxylendgruppen in starke Wechselwirkungen mit der Bindungsgrube treten, und anschließend stufenweise weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den anderen Aminosäuren des Peptids und dem MHC-Molekül aufgebaut werden. Beim erfolgreichen Verlauf der ersten Stufe des Bindungsprozesses kann bereits ein stabiler ternärer Komplex nachgewiesen werden, der jedoch noch nicht seine höchste Stabilität besitzt. In der zweiten Phase könnte eine Konformationsänderung erfolgen, die den Gesamtkomplex aus einer offenen in eine geschlossenen Form überführt (Smith et al., 1993; Bluestone et al., 1993; Springer et al., 1998). Es ist gezeigt worden, daß die Bindung einer ganzen Anzahl von Peptiden an vorgeformte HC/ β_2m -Dimere zur Erhöhung der Stabilität des MHC-Komplexes führt (Elliott et al., 1991). Jedoch ist vermutlich nicht jedes Peptid in der Lage, auch die Konformation der Schweren Kette so

ändern, daß sie den geschlossenen, transportkompetenten Zustand erlangt. Bindet ein Peptid in den Nicht-Ankerpositionen nur ungenügend stark, wird ein solches Peptid wahrscheinlich wieder aus der Grube dissoziieren. Diese "Qualitätskontrolle", d.h. die Selektion von möglichst affinen Peptiden ist für eine Zelle enorm wichtig, weil eine lange Verweilzeit auf der Zelloberfläche gleichbedeutend mit einer potentiell längeren Erkennungsdauer für T-Zellen ist. Zudem sollte die exogene Peptidbeladung auf MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zelloberfläche möglichst vermieden werden, da sonst die Gefahr besteht, daß eine unkontrollierte Peptidbeladung geschieht, die Autoimmunreaktionen hervorrufen könnte. Aus diesen Gründen ist es sehr sinnvoll anzunehmen, daß sich während der Evolution der Antigenpräsentationswege Mechanismen entwickelt haben, die zur schnellen Beladung und effektiven Auswahl hochaffiner Peptide für MHC-Klasse-I-Moleküle führen. Eine unmittelbare Wirkung auf die Peptidbindung hat offensichtlich die β_2m -Assoziation mit der Schwere Kette. Es konnte gezeigt werden, daß die Affinität von Peptid an freie Schwere Kette sehr gering ist und die Dissoziation von β_2m direkt von der Bindungsaffinität des gebundenen Peptids abhängt (Parker et al., 1992; Cook et al., 1998). Zudem erhöht eine künstlich eingeführte kovalente Bindung von β_2m an die Schwere Kette die antigene Wirkung von normalerweise suboptimalen T-Zell-Epitopen erheblich (Uger et al., 1999).

Erst die Bildung eines stabilen ternären Komplexes durch die Bindung eines hoch affinen Peptids an das Klasse-I-Molekül sollte also zum Ablösen vom TAP-Transporter und dem Entlassen aus dem ER führen (Suh et al., 1994). Der Komplex gelangt zum Golgi-Apparat und durch das Trans-Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche.

1.4.5 Rezeptorbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle

Die Expression eines Klasse-I-Moleküls auf der Plasmamembran schafft die Voraussetzung zur Erkennung einer Zelle durch zytotoxische T-Zellen. Dabei interagiert sowohl der T-Zell-Rezeptor (TZR) als auch der CD8-Korezeptor mit dem MHC-Klasse-I-Komplex (Übersicht in Garcia, 1999). Aus Kristallstrukturen wird offensichtlich, daß der TZR direkten Kontakt mit der Peptidbindungsgrube aufnimmt, wobei die $V\alpha$ Domäne des TZR wohl über der α_2 -Helix des MHC-Moleküls und die $V\beta$ Domäne über der α_1 -Helix zum liegen kommt. Dabei sind auch Wechselwirkungen zu bestimmten

exponierten Aminosäureseitenketten des Peptids möglich (Abb. 13a). Der CD8-Korezeptor bindet im Bereich der α_3 -Domäne des MHC-Klasse-I-Moleküls und hat Kontakt mit β_2m (Abb.13c). Diese Interaktionen dienen der stärkeren Assoziierung von zytotoxischen T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen. Die Bindung des TZR an MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe kann dann die Sekretion zytotoxischer Proteine und Cytokine durch die T-Zelle auslösen, die zum Zelltod einer infizierten Zelle führen. Auch

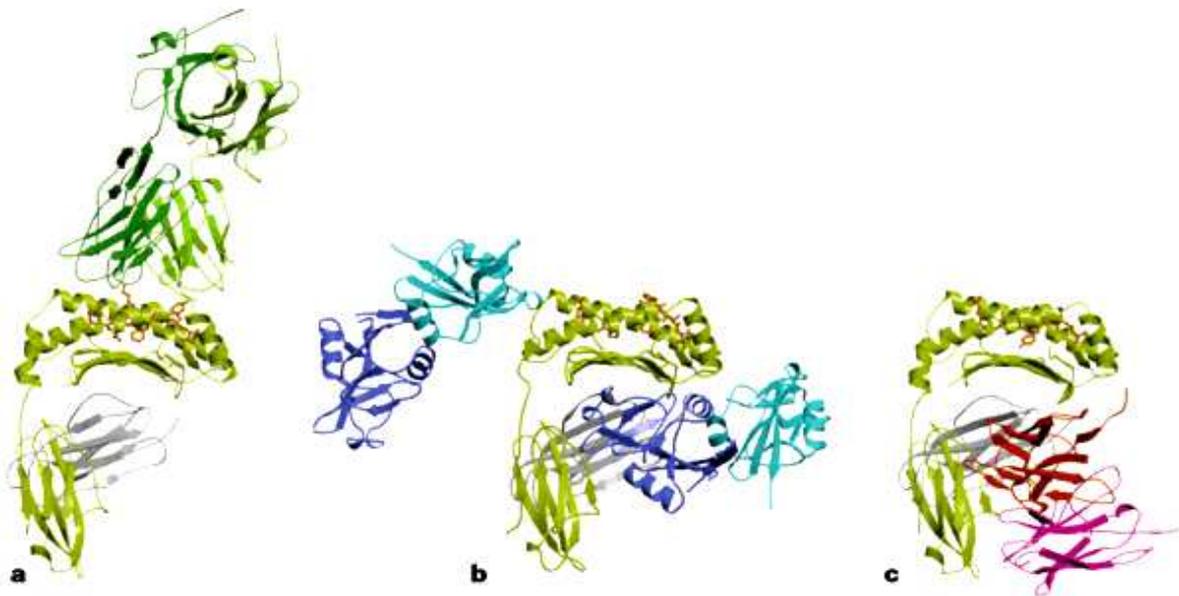


Abb.13: Bindung verschiedener Rezeptoren an MHC-Klasse-I-Moleküle.

a) Die Bindung des TCR (dunkelgrün) an die Peptidgrube. b) NK-Zell-Rezeptor-Bindung: zwei Einheiten aus jeweils einem Ly49A-1(cyan) und einem Ly49A-2 (dunkelblau) treten mit unterschiedlichen Bereichen des MHC-Klasse-I-Moleküls in Kontakt. Die erste Assoziationsstelle befindet sich am Ende der Peptidbindungsgrube, am Kohlenhydratrest der α_1 Domäne, die zweite Bindungsstelle liegt zwischen der α_2 - und α_3 -Domäne und überlappt teilweise die CD8-Bindungsregion. c) Bindung des Homodimers CD8 $\alpha\alpha$ (rot und pink) im Bereich der α_3 -Domäne der MHC-Klasse-I-Schwerkette (gelbgrün) und β_2m (grau) (aus Tormo et al., 1999).

die direkte Bindung von T-Zell-exprimiertem Fas-Ligand an Fas (APO1) auf der antigenpräsentierenden Zelle kann den programmierten Zelltod auslösen (Übersicht in Scaffidi et al., 1999; Shresta et al., 1998).

Nicht nur zytotoxische T-Zellen sondern auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) können den Zelltod einer infizierten Zelle induzieren (Übersicht in Valés-Gómez et al., 2000). Bisher konnten mehrere aktivatorische und inhibitorische Rezeptoren identifiziert werden, die zelloberflächenexprimierte MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen (Übersicht in

Lanier et al., 1998). Der Aufbau ihrer zytoplasmatischen Domänen entscheidet über ihre Wirkung als Inhibitoren oder Aktivatoren der Zellyse. Die Rezeptoren können desweiteren in zwei strukturelle Gruppen eingeteilt werden, solche mit einer Lektin-artigen Struktur sowie Rezeptoren, die der Immunoglobulingen-Superfamilie angehören. Die Bindung der aktivatorischen Rezeptoren scheint die molekulare Erklärung für frühere Beobachtungen zu sein, daß Zellen, die eine schwache MHC-Klasse-I Expression aufweisen, durch Natürliche Killerzellen lysiert werden. Inhibitorische NK-Rezeptoren verhindern hingegen den Zelltod der Zielzelle. Es wird zu klären sein, wie sich aktivatorische und inhibitorische Signale addieren, um die Endreaktion einer NK-Zelle bestimmen.

1.5 Die Bedeutung der Peptidpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle

Der Vorgang der Peptidpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle ist für die Entwicklung und Aktivität des adaptiven Immunsystems essentiell (siehe Paul, "Fundamental Immunology", 4th Edition, 1999). Die Präsenz nicht-selbstreaktiver, im Infektionsfall aber aktivierbarer T-Lymphozyten in einem Organismus hängt direkt von einer funktionellen Peptidpräsentation ab.

Ein erster Kontakt zwischen antigenpräsentierenden Zellen und T-Lymphozyten im Thymus gewährleistet die Reifung naiver T-Zellen. Bei diesem Vorgang präsentieren Thymuszellen den unreifen T-Lymphozyten im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen körpereigene Peptide. T-Lymphozyten, die über ihren T-Zell-Rezeptor eine gewisse Zeitspanne mit hoher Affinität an einen MHC-Peptid-Komplex binden, werden bei diesem Vorgang der T-Zell-Selektion eliminiert. Auf diese Weise reift ein körpereigenes T-Zell-Repertoire, das durch T-Lymphozyten mit verschiedenen MHC-Klasse-I-spezifischen T-Zell-Rezeptoren gekennzeichnet ist und gegenüber den zelleigenen MHC-Peptid-Komplexen nicht selbstreaktiv auftritt. Nach der Selektion im Thymus gelangen T-Zellen in die peripheren lymphatischen Organe, wie z.B. die Lymphknoten. In die Peripherie ausgeschüttete naive T-Lymphozyten müssen erst zu Effektorzellen differenzieren, bevor sie eine Immunreaktion auslösen können. Da die Differenzierung

nicht von gewöhnlichen Körperzellen ausgelöst werden kann, wird eine Reaktion von T-Zellen, z.B. auf gewebespezifische Selbstpeptide, verhindert.

Für die Differenzierung von T-Lymphozyten zu Effektor-T-Zellen ist ein zweites Mal der Kontakt zwischen einem MHC-Peptid-Komplex und einem T-Zell-Rezeptor notwendig. Bei diesem Vorgang muß die Präsentation von antigenen Peptiden, z.B. aus Virusproteinen, durch die professionell antigenpräsentierenden Zellen geschehen. So sind nur Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen sind in der Lage, der T-Zelle ein kostimulatorisches Signal zu übermitteln, was die Entstehung von Effektor-T-Zellen bewirkt.

Die eigentliche Immunreaktion gegen infizierte Körperzellen erfolgt durch diese aktivierten Effektor-T-Zellen, indem der T-Zell-Rezeptor ein drittes Mal an einen Peptid-MHC-Komplex bindet. Dieser Komplex entspricht demjenigen, der die Aktivierung der T-Zelle ausgelöst hat in bezug auf das MHC-Klasse-I-Allel und gebundene Peptid. Die Eliminierung einer infizierte Zelle erfolgt dann, wenn die T-Zelle auf das gleiche antigene Fragment im Komplex mit dem gleichen MHC-Allel trifft.

Ein keimbahnbasierter Defekt in einer Komponente des MHC-Klasse-I-Präsentationsweges führt wegen der notwendigen Peptidpräsentation im Thymus zur Reduktion der Zahl an reifen T-Lymphozyten. So ist z.B. die Zahl der T-Zellen in der Peripherie von $\beta_2m^{-/}$ -Mäusen wegen einer sehr schwachen Expression (fehlgefalteter) MHC-Klasse-I-Schwerketten äußerst gering (Zijlstra et al., 1990). In $TAP1^{-/}$ Mäusen ist die Peptidzufuhr ins ER nahezu eliminiert, und man findet nur ca. 1% der Menge an $CD8^+$ -T-Zellen vom Wildtyp (van Kaer et al., 1992). Nur wenige $CD8^+$ -T-Zellen, die zytotoxisch reagierten, fand man bei Zwillingen mit einer homozygoten Stop-Mutation in den $TAP2$ -Genen. Die HLA-Mengen auf den untersuchten Zellen liegen bei 1-3% von normalen Werten, was zur Bezeichnung "Bare lymphocyte syndrome" Typ 1 führte (de la Salle et al., 1994). Eine weitere Einschränkung der Repertoires an T-Zellen ergibt sich zudem nach neuen Beobachtungen durch ihre begrenzte Lebensdauer. Es scheint so, als wenn sie in der Pheripherie eine Art Überlebenssignal erhalten müssen, um später als Effektor reagieren zu können.

Die Aktivität von T-Zellen wird wahrscheinlich nicht nur durch die Quantität der Peptidpräsentation im Thymus sondern auch durch die Qualität des Peptids auf einer antigenpräsentierenden Zelle bestimmt. Es wird vermutet, daß Störungen innerhalb der

thymischen Selektion zu Autoimmunreaktionen führen können. Eine T-Zelle im Thymus könnte der negativen Selektion entgehen, wenn sie wegen der Präsentation eines suboptimalen Peptids durch Thymuszellen ein zu schwaches Signal erhält, um den Zelltod zu erfahren. Wird im Gegenzug in der Peripherie jedoch das passende Selbstpeptid extrem stark exprimiert und die T-Zelle dadurch aktiviert, könnte möglicherweise eine zytotoxische T-Zell-Reaktion folgen.

Es ist dazu auch die Frage zu beantworten, welche Komponenten des MHC-Klasse-I-Präsentationsweges die Qualität des präsentierten Peptids beeinflussen. Dieser Punkt ist aus dem Grund wichtig, weil die Art des Peptids sich direkt auf die Stabilität und Lebensdauer des MHC-Peptid-Komplexes an der Zelloberfläche auswirkt. Es sind mittlerweile mehrere Studien mit MHC-Klasse-I-Molekülen durchgeführt worden, die nach Einführung einer Punktmutation eine veränderte Peptidpräsentation zeigen. Die Mutation T134K im HLA-A2-Molekül beispielsweise führt zur erhöhten Dissoziation von HC/β₂m-Dimeren im ER und zum Oberflächentransport leerer MHC-Moleküle (Peace-Brewer et al., 1996, Lewis et al., 1996). Die Ursache für die defekte Peptidbindung wird hier in der fehlenden Interaktion des MHC-Moleküls mit Calretikulin und TAP gesehen. Anhand dieses Beispiels wird deutlich, daß Störungen in der Assemblierung des MHC-Klasse-I-Beladungskomplexes zur unphysiologischen Peptidpräsentation führen. Aus diesem Grund konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf die Analyse der Interaktionen zwischen MHC-Klasse-I-Molekülen und den Proteinen im Peptidbeladungskomplex.

1.6 Störungen der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle

Virale Inhibitionsmechanismen

In den letzten Jahren wurden immer mehr Virusproteine identifiziert, die den MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg stören. Durch diese Maßnahme wird es bestimmten Viren möglich, einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion zu entkommen und im Zellinneren zu persistieren (Übersichten in Ploegh, 1998; Früh et al., 1999). Die Verhinderung einer Peptidpräsentation kann in manchen Fällen auch direkt zur Tumorentwicklung führen,

da die virusinfizierten Zellen nicht mehr unter der Kontrolle von T-Zellen stehen (Übersicht in Ehrlich, 1997).

Der Adenovirus 12 wirkt sehr onkogen, indem er mit der Transkription mehrerer in der MHC-Region kodierten Gene interferiert (Rotem-Yehudar et al., 1994 und 1996). Das adenovirale Protein E3-19K bewirkt, wie auch Virusproteine aus dem murinen oder humanen Cytomegalovirus die Retention von MHC-Klasse-I-Komplexen im ER (Burgert und Kvist, 1985). Ein Inhibitor der Peptidzufuhr durch TAP ist das Protein ICP47 des Herpes-simplex-Virus (HSV), das mit Peptiden um die Bindungsstelle an hTAP konkurriert (Hill et al., 1995, Früh et al., 1995). Auch durch mehrere Virusproteine des humanen Cytomegalovirus (HCMV) wird die Plasmamembranexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen unterdrückt. US6 beispielsweise wechselwirkt von der luminalen Seite mit TAP und verhindert ebenfalls den Peptidtransport ins ER (Hengel et al., 1997; Ahn et al., 1997). Zum Rücktransport aus dem ER und zur zytosolischen Degradation von MHC-Klasse-I-Molekülen führt die Expression von US2 und US11 (Jones und Sun, 1997; Beersma et al., 1993). Das HIV-Nef-Protein bewirkt demgegenüber die endosomale Degradation von ursprünglich zelloberflächen-exprimierten MHC-Klasse-I-Molekülen (LeGall et al., 2000).

Da die Herabregulation der Peptidpräsentation normalerweise zur Aktivierung Natürlicher Killerzellen führt, haben Viren (und auch Tumoren) weitere Mechanismen entwickelt, um ihrer Eliminierung zu entkommen. Neben der differentiellen Unterdrückung bestimmter MHC-Klasse-I-Allele ist insbesondere die Änderung der CTL-Epitope durch genetische Variation zu nennen. Diese Reaktion verhindert die Generierung und Präsentation bisher immunogener Peptidfragmente.

Störung der Antigenpräsentation in Tumoren

Abweichungen von einer normalen Peptidpräsentation sind auch in Tumorzellen zu beobachten, da sie für transformierte Zellen einen Weg darstellen, um dem Angriff zytotoxischer T-Zellen zu entgehen (Übersicht in Seliger et al., 2000). Eine Herunterregulation der Proteasomuntereinheiten LMP2 und LMP7, TAP1/TAP2, MHC-Klasse-I-Schwereketten und β_2m konnte man bisher in Lymphomen, Karzinomen, Myelomen und Melanomen nachweisen. Transformierte Zellen entstehen oft aus

virusinfizierten Zellen, in denen die Expression von Proteinen der Antigenpräsentationswege unterdrückt ist. Oft vermindern sie aber auch durch die genetische Instabilität im Rahmen der malignen Transformation die Expression dieser Gene (Übersicht in Ehrlich, 1997). Transformierte Zellen sind zudem vor der Eliminierung durch das Immunsystem geschützt, weil sie hauptsächlich nicht immunogene Antigene präsentierten. Ansätze, die sich mit der Tumorstimmung beschäftigen, sind aus diesem Grund schwierig und erfordern zudem die Identifizierung von Peptiden, die ausschließlich auf Tumoren exprimiert werden. Zur Einschleusung des Peptidantigens sind z.Z. zwei Methoden vielversprechend: die Immunisierung mit Adenoviren, die Antigene mitkodieren und die Verabreichung von Dendritischen Zellen, die mit dem entsprechenden Peptid beladen wurden. Desweiteren werden in der Immuntherapie von Tumoren insbesondere die Zytokine INF- γ , INF- α und TNF- α eingesetzt, die über die Steigerung der Präsentation tumorassoziierter Antigene zu einer verbesserten Erkennung durch zytotoxische T-Zellen führen (White et al., 1998).