

**Die Rolle von Tapasin bei der Antigenpräsentation
durch MHC-Klasse-I-Moleküle**

DISSERTATION

von

Pamela Tan

Heidelberg / Berlin

März 2001

Eingereicht am

Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Diese Dissertation wurde in der Zeit von Januar 1998 bis März 2001 in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Frank Momburg der Abteilung Molekulare Immunologie (Leiter: Prof. Dr. Günter J. Hämmerling) des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Frank Momburg (Heidelberg)
2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Erdmann (Berlin)

Tag der Disputation: 29. Oktober 2001

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Recruitment of MHC class I molecules by tapasin into the TAP-associated complex is essential for optimal peptide loading

P. Tan, H. Kropshofer, O. Mandelboim, G. J. Hämmerling & Frank Momburg

Journal of Immunology (eingereicht)

Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice

N. Garbi, P. Tan, A. D. Diehl, B. J. Chambers, H.-G. Ljunggren, F. Momburg & G. J. Hämmerling

Nature Immunology 1(3), S. 234-238, 2000

Das Leben kommt, auf alle Fälle, aus einer Zelle.

Doch manchmal endet` s auch - bei Strolchen - in einer solchen.

Heinz Erhard

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)	3
1.2.1	Das MHC-Klasse-I-Molekül	4
1.2.2	Der Peptid-Transporter TAP	8
1.2.3	Tapasin	9
1.3	Chaperone für MHC-Klasse-I-Moleküle	11
1.3.1	Calnexin (p88 oder IP90)	12
1.3.2	Calretikulin	12
1.3.3	ER60 (ERp57, grp58, ERp61)	13
1.4	Antigenprozessierung und Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle	14
1.4.1	Antigenprozessierung im Zytosol	15
1.4.1	Peptidtransport ins ER	16
1.4.3	Assemblierung des Peptidbeladungskomplexes im ER	18
1.4.4	Peptidbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle	19
1.4.5	Rezeptorbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle	20
1.5	Die Bedeutung der Peptidpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle	22
1.6	Störungen der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle	24
2.	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	27
3.	MATERIAL	28
3.1	Geräte	28
3.2	Verbrauchsmaterialien	28

3.3	Chemikalien	29
3.4	DNA	31
3.4.1	Vektor	31
3.4.2	cDNA	31
3.5	Proteine	33
3.5.1	Enzyme	33
3.5.2	Antikörper	33
3.5.3	Peptide	35
3.6	Kits	35
3.7	Puffer und Lösungen	36
3.7.1	Molekularbiologie	36
3.7.2	Proteinchemie	37
3.7.3	Zellbiologie	40
3.8	Zelllinien	42
3.9	Mausstämme	42
4.	METHODEN	43
4.1	Molekularbiologische Methoden	43
4.2	Proteinchemische Methoden	46
4.2.1	Analytische Methoden	46
4.2.2	Biochemische Methoden	50
4.3	Zellbiologische Methoden	52
4.3.1	Zellkultur	52
4.3.2	Zellfärbungen	54
4.3.3	Metabolische Assays	55

5.	ERGEBNISSE	57
5.1	Generierung von 721.220.Tapasin-Transfektanten	57
5.1.1	Expression von Tapasin-Mutanten in B-LCL721.220-Zellen	58
5.1.2	Zelluläre Lokalisation der Tapasin-Konstrukte	59
5.2	Der Einfluß von Tapasin auf den Peptidtransport ins ER	60
5.2.1	Expression des TAP-Peptidtransporters	61
5.3	Tapasin als Chaperon für HC/β₂m Dimere	64
5.3.1	Thermostabilität von MHC-Klasse-I-Molekülen	64
5.3.2	Stabilisierung des MHC-Klasse-I-Moleküls durch die Immunoglobulin-Domäne von Tapasin	65
5.4	Die Assemblierung des Peptidbeladungskomplexes	67
5.4.1	Tapasin-vermittelte Assemblierung des Subkomplexes an MHC-Klasse-I-Molekülen	67
5.4.2	Tapasin-vermittelte Rekrutierung von ER60 an TAP	69
5.5	Der Einfluß von Tapasin auf zelloberflächenexprimierte MHC-Klasse-I-Moleküle	74
5.5.1	Quantitative Daten: Gesamtmenge an MHC-Klasse-I-Molekülen	74
5.5.2	Qualitative Daten: Expression allospezifischer Epitope	76
5.6	Der Einfluß von Tapasin auf die Peptidbeladung von MHC-Klasse-I-Molekülen	79
5.6.1	Peptidbeladene MHC-Klasse-I-Moleküle auf .220.B44-Transfektanten	79
5.6.2	Stabilität von MHC-Klasse-I-Molekülen im Detergenzlysat	81
5.6.2	Induktion des Bw4-Epitops durch exogene Beladung mit Peptiden	84
5.6.4	In vivo-Stabilität von MHC-Klasse-I-Molekülen aus .220.B44-Transfektanten	85
5.6.5	Massenspektroskopische Analyse der Peptide auf .220.B44-Transfektanten	87

6.	DISKUSSION	90
7.	ZUSAMMENFASSUNG	106
7.1	Summary	107
8.	ANHANG	108
8.1	Literaturverzeichnis	108
8.2	Abkürzungsverzeichnis	121
8.3	Danksagungen	122

7. Zusammenfassung

Infizierte Zellen präsentieren dem Immunsystem auf ihrer Zelloberfläche antigene Peptide, die aus eingedrungenen Pathogenen generiert werden. Der Präsentation der Peptide geht die korrekte Assemblierung des MHC-Peptid-Komplexes im Endoplasmatischen Retikulum (ER) voraus. Innerhalb dieser Arbeit wird gezeigt, daß das ER-residente Protein Tapasin die Peptidbeladung auf MHC-Klasse-I-Moleküle sowohl in quantitativen als auch in qualitativen Aspekten positiv beeinflusst. Die Rekonstitution der Peptidbeladung in der B-lymphoblastoiden Zelllinie 721.220 durch die Expression von Tapasin führt auf der Plasmamembran der Zellen zu einer Steigerung der Menge an langlebigen MHC-Klasse-I-Molekülen, an die Peptide optimaler Länge binden.

Die Selektion stabiler MHC-Peptid-Komplexe geschieht durch Tapasin im ER, indem das MHC-Klasse-I-Molekül in einen TAP-assoziierten Beladungskomplex rekrutiert und dort die Peptidbeladung optimiert wird. Tapasin induziert zunächst die Bildung zweier Subkomplexe: zum einen wird Calretikulin an das MHC-Molekül rekrutiert, zum anderen wird die Thioerduktase ER60 Tapasin-vermittelt an TAP gebunden. Die Tapasin-vermittelte Brückenbildung zwischen diesen beiden Subkomplexen führt auf den untersuchten HLA-B*4402- und HLA-B8-Molekülen zur verbesserten Ausbildung allospezifischer Bw4-/Bw6-Epitope. Lösliche Tapasin-Konstrukte und Maus-Tapasin sind nicht in der Lage, den vollständigen Beladungskomplex aus dem MHC-Klasse-I-Molekül, Calretikulin, ER60 und TAP zu assemblieren. Die in diesen Fällen suboptimale Peptidbeladung ist durch eine kürzere Lebensdauer an der Zelloberfläche und eine geringere Thermostabilität der MHC-Moleküle im Lysat gekennzeichnet.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann Tapasin in funktionelle Domänen eingeteilt werden. Es wurde gezeigt, daß die N-terminale Domäne von Tapasin für die Peptidbeladung auf HLA-B8 und HLA-B*4402 Moleküle essentiell ist. Schon die Deletion von 19 Aminosäuren am N-Terminus von Tapasin verhindert die Plasmamembran-expression dieser MHC-Moleküle. Unverkürztes Humanes und murines Tapasin sind darüberhinaus in der Lage, die Expression von TAP über ihre Membranregion bis auf das 10fache zu steigern. Fehlt die Membran- und zytoplasmatische Domäne, ist keine Steigerung der TAP-Expression nachweisbar. Die Unterbrechung eines Leucin-Reißverschlußmotivs im Transmembranbereich von Tapasin durch den Aminosäureaustausch L410F hebt die ER-Retention von Tapasin teilweise auf und führt zu einem um 70-80% erniedrigten TAP-Expressionsniveau.

7.1 Summary

An infected cell is recognized by the immune system via pathogen-derived antigenic peptides. The surface presentation of these peptides is achieved by the assembly of a MHC class I-peptide complex in the endoplasmic reticulum (ER). In this PhD thesis tapasin is shown to positively influence peptide loading on MHC class I molecules in quantitative as well as in qualitative terms. Reconstituting the peptide loading defect in the B-lymphoblastoid cell line 721.220 by the expression of tapasin induces the plasma membrane expression of long-lived MHC class I molecules carrying an optimized spectrum of peptides.

Tapasin facilitates the selection of peptides in the ER by recruiting the MHC class I molecule into the TAP loading complex. The assembly of two subcomplexes is promoted by tapasin: on one hand calreticulin is recruited to the MHC molecule, and on the other hand the thioreductase ER60 is recruited to TAP through tapasin. On the HLA alleles investigated (HLA-B*4402 and HLA-B8), the bridging of both subcomplexes by tapasin leads to enhanced binding of optimal length peptides and to the improved formation of Bw4/Bw6 epitopes. Soluble tapasin constructs and mouse tapasin are not able to assemble the complete loading complex consisting of the MHC molecule, calreticulin, ER60 and TAP. In these cases a suboptimal peptide loading is observed, characterized by a reduced half-time of class I molecules on the cell surface and a lower thermostability in lysates.

With the findings of this work, we can define functional domains of tapasin. It is shown, that the N-terminal domain of tapasin is essential for peptide loading onto HLA-B8 and HLA-B44 molecules. The deletion of only 19 amino acids at the N-terminus of tapasin abolishes surface expression of these alleles. The transmembrane region of tapasin interacts with TAP. In the presence of membrane-anchored human and murine tapasin the expression of TAP is enhanced by a factor of ten. By contrast, when the transmembrane region is missing, no enhancement of the steady-state levels of TAP were detectable. The importance of the membrane domain of tapasin has also become clear by the fact that a sole amino acid substitution (L410F) in the human protein sequence leads to 70-80% less TAP protein expression. This point mutation putatively destroys a leucine zipper motive which partially abolishes ER retention of tapasin.