

# **Charakterisierung der asymmetrischen Funktionalität der Nukleotidbindedomänen des ABC-Transporters TAP**

Diplomarbeit an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Hicham Bouabe**

Köln, April 2002

Hätt ich gezaudert zu werden,  
Bis man mirs Leben gegönnt,  
Ich wäre noch nicht auf Erden,  
Wie ihr begreifen könnt,  
Wenn ihr seht, wie sie sich gebärden,  
Die, um etwas zu scheinen,  
Mich gerne möchten verneinen.

Goethe

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.	MHC-Klasse I-Moleküle und Antigenpräsentation	1
2.	Antigenprozessierung	5
3.	TAP-vermittelter Peptidtransport	7
4.	TAP ein Modell für ABC-Transporter	8
5.	Struktur der Nukleotidbindedomäne von TAP	13
6.	Zielsetzung der Arbeit	15
<b>II.</b>	<b>Materialien</b>	<b>20</b>
1.	Chemikalien und fertige Reagenzien	20
2.	Medien und Medienzusätze	21
3.	Radiochemikalien	22
4.	Enzyme, Gewichts- und Längenstandards	22
5.	Plasmide	22
6.	Primer	22
7.	Bakterienstämme	25
8.	Zelllinien	25
9.	Antikörper	25
10.	Peptide	26
11.	Geräte	26
12.	Software	27
13.	Einmalware	27
<b>III.</b>	<b>Methoden</b>	<b>29</b>
<b>III.1.</b>	<b>Methoden zur DNA-Analytik</b>	<b>29</b>
1.	Medien	29
2.	Klonierung von DNA-Fragmenten	29
a.	Ligation	29
b.	Herstellung kompetenter Bakterien	30
c.	Transformation	31
d.	Lagerung der Bakterien	31
3.	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab	32
4.	Präparation von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab	34
5.	Fällen von DNA	35
6.	Reinigung von DNA	35
7.	Konzentrationsbestimmung von DNA	35
8.	Endonukleolytische Spaltung von DNA	36
9.	Agarosegele	37
10.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	38
11.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39

12. Ortsgerichtete Mutagenese	39
13. Sequenzierung	41
<b>III.2. Methoden in der Zellkultur</b>	<b>43</b>
1. Kultivierung von Säugerzellen	43
2. Lagerung der Zellen	43
3. Nährzellen für die Transfektion	44
4. Stabile Transfektion	45
5. Selektion stabiler Transfektanden	45
<b>III.3. Methoden zur Proteinanalytik</b>	<b>47</b>
1. Zellaufschluß	47
2. Rohmembranenpräparation	48
3. Solubilisieren von Membranproteinen	48
4. Mikrosomenpräparation	49
5. Bestimmung der Proteinkonzentration	51
6. Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgele	51
7. Fixierung und Färbung von Proteinen im Gel	53
8. Autoradiographie von Polyacrylamidgele	54
9. Westernblotanalyse	54
10. Proteinfärbung auf Blots	55
11. Blocken	56
12. Immunfärbung auf Blots	56
13. Immunpräzipitation	58
14. Deglykosylierung von Glykoproteinen	60
15. Nukleotidbindeassay	61
16. 8-Azido-ATP Kreuzvernetzung	62
17. Aufreinigung von Peptiden	63
18. Iodierung von Peptiden	65
19. Peptidkoppelung an HSAB	67
20. Peptidbindeassay	68
21. Peptidtransportassay	69
22. Untersuchung der Expression von Proteinen an der Zelloberfläche	70
<b>IV. Ergebnisse</b>	<b>72</b>
<b>A. TAP-Chimären mit ausgetauschten V-Regionen und Kern-NBDs</b>	<b>72</b>
<b>1. Generation von chimären TAP-cDNAs</b>	<b>72</b>
a. Herstellung von TAP-Ketten mit ausgetauschten C-terminalen Regionen	72
b. Herstellung von TAP-Ketten mit ausgetauschten Kern-NBDs	79

<b>2. Etablierung von TAP-Chimären exprimierende T2-Zelllinien</b>	<b>82</b>
a. Nomenklatur der TAP-Chimären und der hergestellten T2-Zelllinien	82
b. Westernblotanalyse zur Expression von den TAP-Chimären	85
<b>3. Untersuchung des Assoziationsverhaltens der TAP-Chimären</b>	<b>88</b>
<b>4. Untersuchung der MHC-Ladekomplexbildung</b>	<b>89</b>
<b>5. Nukleotidbindeverhalten der TAP- Chimären</b>	<b>91</b>
<b>6. Peptidbindeverhalten der TAP- Chimären</b>	<b>94</b>
<b>7. Untersuchungen zur Funktionalität der TAP-Chimären</b>	<b>95</b>
7.1. Untersuchung der intrazellulären MHC-Klasse I-Reifung	95
7.2. Untersuchung der MHC-Klasse I-Zelloberflächenexpression	98
7.3. Peptidtransportassay	100
<b>8. Einfluß von ADP auf Peptidtransport durch TAP</b>	<b>101</b>
<b>B. TAP-Deletionsmutanten</b>	<b>103</b>
1. Herstellung von TAP-Ketten mit deletierten C-terminalen Regionen	103
2. Expression und Nomenklatur der TAP-Deletionsmutanten	104
3. Untersuchung des Assoziationsverhaltens	106
4. Nukleotidbindeassay	106
5. Untersuchung der intrazellulären MHC-Klasse I-Reifung	107
<b>C. Herstellung von TAP-Ketten mit ausgetauschten „Switch Regionen“</b>	<b>108</b>
<b>V. Diskussion</b>	<b>112</b>
<b>VI. Zusammenfassung</b>	<b>125</b>
<b>VII. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>127</b>

<b>VIII. Literaturverzeichnis</b>	<b>130</b>
<b>IX. Anhang</b>	<b>152</b>
Nukleotidsequenzen der hergestellten TAP-Chimären	
<b>Danksagung</b>	<b>163</b>

# I. Einleitung

## 1. MHC-Klasse I-Moleküle und Antigenpräsentation

Die Erkennung von infizierten oder entarteten Zellen ist eine der wichtigsten Voraussetzungen zu ihrer erfolgreichen Bekämpfung. Wirbeltiere besitzen hierfür ein komplexes Abwehrsystem, das solche Zellen identifiziert und eliminiert. Dieses System basiert auf die Interaktion zwischen zytotoxischen T-Lymphozyten, mittels ihres T-Zellrezeptors, und Klasse I-Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), welche endogene Peptide an der Zelloberfläche fast aller kernhaltigen Zellen präsentieren. Die Mehrheit der präsentierten Peptide sind Abbauprodukte viraler oder zelleigener neusynthetisierter Proteinen, die infolge von Translations- oder Posttranslationsdefekten die native Faltung nicht erreicht haben und als **defekte ribosomale Produkte** bezeichnet werden (DriPs) (Reits et al 2000, Schubert et al 2000). Wird das Peptid als fremd erkannt, so werden die zytotoxischen-T-Lymphozyten zur Ausschüttung von Perforin stimuliert, welches die infizierte Zelle oder Tumorzelle lysiert (Janeway und Travers 1997, Townsend & von Bodmer, 1989).

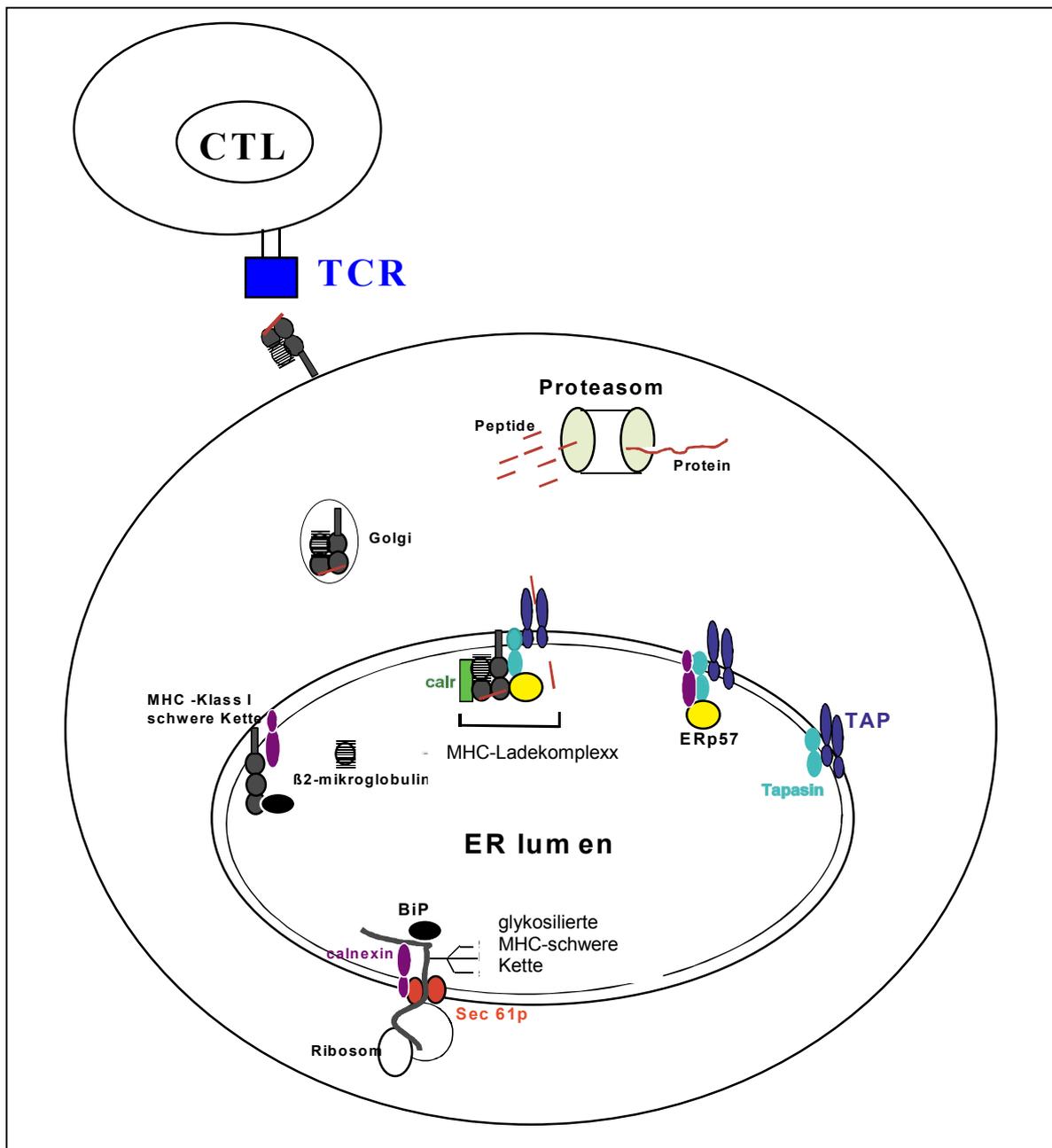
MHC-Klasse I-Moleküle bestehen aus dem nichtkovalent gebundenen, 12 kDa großen, löslichen  $\beta_2$ -Mikroglobulin und einer glykolisierten schweren Kette von 43-45 kDa, die in der Membran verankert ist. Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass die schwere Kette sich in drei Domänen,  $\alpha_1$ - $\alpha_3$ , faltet. Die Faltung der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domänen erzeugt einen langen Spalt, in dem 8-10 Aminosäure lange Peptide binden (Parmer und Cresswell 1998, Madden DR 1995, Bjorkman et al. 1987). Die Peptide binden über zwei bis drei relativ invariante allelspezifische Verankerungsreste an MHC-Moleküle. Diese meist basischen oder hydrophoben Verankerungsaminoaciden liegen in der Regel an den Positionen eins und zwei sowie am C-Terminus des Peptids. Die übrige Peptidsequenz ist in den meisten Fällen unerheblich für die MHC-Klasse I-Bindung (Schmitt und Tampe 2000, Janeway und Travers 1997 ), dadurch erweitert sich das Repertoire an Peptiden, die von einem MHC-Klasse I-Allel präsentiert werden kann. Durch das Verfügen jedes Menschen über drei verschiedene Gen-Loci, HLA-A, HLA-B und HLA-C, für die schweren Ketten der klassischen MHC-Klasse I-Moleküle und somit über 3 bis 6 unterschiedliche MHC-Klasse I-Allele, die hohen Polymorphismus hauptsächlich in der Peptidbindetasche zeigen, wird die Diversität der präsentierten Peptide noch um ein vielfaches erhöht.

MHC-Klasse I-Moleküle binden Peptide als integralen Bestandteil ihrer Struktur; ohne optimale Peptide sind sie instabil (Elliott et al. 1991, Townsend et al. 1990, Janeway und Travers 1997). Diese feste Bindung ist wichtig, um Peptidaustausche oder Peptidverluste auf dem sekretorischen Weg oder an der Zelloberfläche zu verhindern. Dadurch wird erreicht, daß Informationen über den inneren Zustand der Zelle an die zytotoxischen T-Lymphozyten weitergeleitet werden.

Die korrekte Faltung von MHC-Molekülen und ihre stabile Peptidbeladung wird durch die koordinierte Wirkung verschiedener im ER lokalisierte Proteine gewährleistet (Elliot 1997, Lehner & Trowsdale 1998, Cesswell et al. 1999), die eine Art Qualitätskontrolle durchführen. Unmittelbar nach der Translokation wird die naszierende MHC-schwere Kette durch Calnexin, ein 88-90 kDa lektinartiges Transmembranprotein, stabilisiert und in eine Konformation gebracht, die die Bindung von  $\beta_2m$  erlaubt (Vassilakos *et al.*, 1996). Die Inaktivierung des Calnexin Genes CNE1 in *Saccharomyces cerevisiae* führt zur Sekretion von unreifen Glykoproteinen, was auf seine Funktion in der Qualitätskontrolle hindeutet (Parlati et al. 1995, Arima et al. 1998). Jedoch eine menschliche Calnexin-negative Zelllinie, (CEM-NKR), die eine normale MHC-Oberflächenexpression zeigt (Scott und Dawson 1995, Sadasivan et al. 1995), läßt auf eine Redundanz bei der Qualitätskontrolle, wahrscheinlich durch BiP (Immunoglobulin Heavy Chain **b**inding **p**rotein), schließen (Nössner et al. 1995, Scott et al. 1995, Balow et al. 1995). In einer  $\beta_2m$ -negativen Zelllinie bleibt die MHC-schwere Kette mit BiP assoziiert (Nossner und Parham 1995, Paulsson et al. 2001). BiP ist ein Mitglied der 70 kDa-Hitzeschockproteinfamilie, das mit neusynthetisierten und mißgefalteten Proteinen sowie mit nichtassemblierten Untereinheiten interagiert (Leitzgen und Haas 1998, Flynn et al. 1991). Während in Mauszellen die Interaktion von Calnexin mit der MHC-schwere Kette auch nach der Anlagerung von  $\beta_2m$  fortbesteht (Suh et al. 1996, Degen et al. 1991, Carreno et al. 1995), führt die Bildung vom MHC-schwere Kette-  $\beta_2m$ -Komplex in menschlichen Zellen zur Freisetzung von Calnexin (bzw. zur Freisetzung von BiP) (Sugita und Brenner 1994, Rajagopalan und Brenner 1994, Nossner und Parham 1995, Paulsson et al. 2001). Nach Ablösung von Calnexin bindet Calreticulin (Sadasivan et al. 1996, Farmery et al. 2000), ein 46 kDa lösliches, lektinartiges Protein, das neben seiner Rolle in der intrazellulären Calcium-Homöostase (Michalak et al. 1999) auch als Chaperon in der Faltung von neusynthetisierten Glykoproteinen fungiert. In Calreticulin-negative Mausfibroblasten (K42) werden MHC-Klasse I-Moleküle mit suboptimalen Peptiden beladen, die meist schon auf dem sekretorischen Weg abfallen (Gao et al. 2002). Calreticulin zeigt auch eine Peptidbindeaktivität (Nair et al. 1999). Es könnte damit zur

Erhöhung der lokalen Konzentration von optimalen Peptiden beitragen, die wiederum in eine effizienten Beladung von MHC-Molekülen resultiert. Der Komplex aus MHC-schwere Kette,  $\beta_2m$  und Calreticulin bindet an einen präformierten Komplex aus Tapasin, ERp57 (Endoplasmatisches Retikulum Protein 57 kDa, auch ER60 genannt), Calnexin und dem heterodimeren Peptidtransporter TAP (Transporter associated with antigen processing), wobei Calnexin freigesetzt wird (Diedrich et al. 2001). Dieser makromolekulare Komplex aus TAP, MHC-Klasse I-Molekülen, Tapasin, ER60 und Calreticulin wird **TAP-Ladekomplex** genannt (Hughes et al. 1998, Ortmann et al. 1997, Sadasivan et al. 1996). Er gewährleistet eine optimale Peptidbeladung von MHC-Molekülen und stellt damit die Voraussetzung für MHC-Klasse I-Oberflächenexpression. Stöchiometrische Untersuchungen zeigten, dass Tapasin, MHC-Klasse I und TAP im Verhältnis 4 / 4 / 1 im Komplex vorliegen (Ortmann et al. 1997). Dem Tapasin (TAP associated glycoprotein, Sadasivan et al. 1996, Ortmann et al. 1997, früher gp48: glycoprotein, 48 kDa), einem membranverankerten 48 kDa großen Glykoprotein, wurden viele Schlüsselfunktionen zugeschrieben. Es stabilisiert leere MHC-Moleküle und TAP-Heterodimere und hält sie im ER zurück, es selektiert hochaffine Peptide und ermöglicht ihre Bindung an MHC-Klasse I (Owen et al. 1999, Lewis et al. 1998, Suh et al. 1994, Paulsson et al. 2002). Ferner spielt Tapasin eine entscheidende Rolle in der Assemblierung des Ladekomplexes. In der Tapasin-negativen Zelllinie 721.220 kann weder Calreticulin, noch TAP, noch ER60 mit MHC-Klasse I-Molekülen interagieren und die Peptidbeladung der MHC-Klasse I-Molekülen und ihre Oberflächenexpression ist stark beeinträchtigt (Hughes et al. 1998, Bangia et al. 1999, Barnden et al. 2000, Tan et al. 2002). Tapasin scheint, unterstützt von Calreticulin und ER60, MHC-Klasse I-Moleküle in einer peptidbindefähigen Konformation zu halten (Carreno et al. 1995). ER60 ist ein Mitglied der Protein Disulfide Isomerase (PDI)-Familie und enthält zwei unterschiedliche Thioredoxin (TR)-Motive (CXXC), es vermittelt Disulfidbrückenbildung in naszierenden monoglykosylierten Proteinen (Oliver et al. 1999, Helenius und Aebi 2001) und besitzt eine Cysteinproteaseaktivität (Urade et al. 1992 a und b, Otsu et al. 1995, Okudo et al. 2000). ER60 wird durch Tapasin zum Ladekomplex rekrutiert. Eine Tapasin-negative Zelllinie zeigt keine Interaktion zwischen ER60 und MHC-schwere Kette, TAP oder Calreticulin (Bangia et al. 1999, Diedrich et al. 2001, Hughes et al. 1998). Zwei Cysteine, ER60-Cys57 und Tapasin-Cys95, bilden eine Disulfidbrücke. Nach Substitution eines dieser Cysteine konnte ER60 nicht mehr im Ladekomplex detektiert werden (Dick et al. 2002). ER60 und Tapasin fördern die Bildung einer bei allen bekannten MHC-Klasse I-Molekülen konservierten Disulfidbrücke (Cys101-Cys164) innerhalb der  $\alpha_2$ -Domäne, die für optimale Peptidbeladung notwendig ist

(Dick et al. 2002). Eine durch die Peptidbindung induzierte Konformationsänderung, führt zur Dissoziation des Ladekomplexes (Knittler et al. 1999, Suh et al. 1996, Ortmann et al. 1994). Das MHC-schwere Kette- $\beta_2m$ -Peptid-Trimer verlässt das ER und gelangt über den Golgi-Apparat, wo der MHC-Zuckerrest modifiziert wird, an die Zelloberfläche (Bennett et al. 1999, Koopmann et al. 1997). Über ihren T-Zellrezeptor inspizieren die zytotoxischen T-Lymphozyten schließlich den MHC-Klasse I-Peptid-Komplex. Wird das präsentierte Antigen (Peptid) als fremd erkannt, so werden sie aktiviert und leiten die Apoptose der präsentierenden Zelle ein (Townsend et al. 1989).



**Abbildung I.1. schematische Darstellung der MHC-Klasse I Reifung und Zellvermittelten Immunität.** Neusynthetisierte MHC-Klasse I-schwere Ketten interagieren mit BiP und Calnexin. Diese Interaktion stabilisiert die Schwere Kette in eine Konformation, die ihre Assoziation mit  $\beta_2m$  ermöglicht. Die Interaktion zwischen MHC-Klasse I und-  $\beta_2m$  führt zur Dissoziation von BiP und Calnexin. Der MHC-Klasse I-  $\beta_2m$ -Dimer assoziiert mit Calreticulin und einem präformierten Komplex aus Tapasin, ERp57, Calnexin, und TAP (Transporter associated with antigen processing), wobei Calnexin freigesetzt wird. Die durch das Proteasom hergestellte Peptide, werden in einem ATP-abhängigen Prozess durch TAP vom Cytosol ins ER-Lumen transportiert. Der MHC-Ladekomplex ermöglicht eine optimale Peptidbeladung der MHC-Klasse I-Moleküle. Die Peptidbindung führt zur Dissoziation des Ladekomplexes. Trimer aus MHC-schwere Kette,  $\beta_2m$  und Peptid werden über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche transportiert, wo sie den T-Zellrezeptoren (TCR) der zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) präsentiert werden. (Ladekomplexbildung ist dargestellt nach Diedrich et al. 2001). (Die Größenproportionalität der Zellen und Organellen wurde nicht berücksichtigt).

## 2. Antigenprozessierung

Die von MHC-Klasse I-Molekülen präsentierten Peptidantigene werden hauptsächlich im Cytosol durch das 11S/20S- und 19S/20S-Proteasom generiert (Ciechanover und Schwartz 1998). Hinweise auf die maßgebliche Beteiligung des Proteasoms an der MHC-Klasse I-Antigenprozessierung lieferten vor allem Experimente, bei denen das Einsetzen von Peptidalddehydinhhibitoren oder des proteasomspezifischen Inhibitors Lactacystin zur ER-Retention unbeladener MHC-Moleküle führt (Rock et al. 1994, Hughes et al. 1996).

Während die katalytischen Komponenten im 700 kDa großen 20S-Proteasom enthalten sind, regulieren die 11S- und 19S-Proteinkomplexe die Substratrekrutierung und die katalytische Aktivität des Proteasoms (Ciechanover und Schwartz 1998, Chu-Ping et al. 1992, DeMartino et al. 1996). Die Kristallstruktur des 20S-Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* (Groll et al. 1997) zeigt vier aufeinandergestapelte Ringe, die aus jeweils sieben Untereinheiten bestehen. Die beiden äußeren Ringe enthalten sieben Kopien der  $\alpha$ -Untereinheit und die inneren Ringe bestehen aus jeweils sieben Kopien der  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheiten sind stark konserviert und haben eher eine strukturelle Funktion, während die  $\beta$ -Untereinheiten, und zwar  $\beta_1$  ( $\delta$  oder Y),  $\beta_2$  (Z) und  $\beta_5$  (X oder MB1), die proteolytische Aktivität besitzen. Das latente 20S-Proteasom wird erst durch die Assoziation mit den Proteasomaktivatoren, den PA700 (19S) oder PA28 (11S- Regulator) aktiviert (Ciechanover und Schwartz 1998).

Der 19S-Komplex (PA700) ist ein 700 kDa Proteinkomplex bestehend aus ca. 20 Untereinheiten und enthält eine Ubiquitinbindungsstelle und mehrere ATPase-Zentren. Er bindet als Deckel in

einem ATP-abhängigen Prozess an den beiden Enden des 20S-Komplex. Dieser Komplex wird als 26S-Proteasom (19S-20S-19S) bezeichnet. Dieses konstitutive Proteasom baut, in einem ATP-abhängigen Prozess, ubiquitinilierte Proteine ab, wobei die Erkennung und ATP-abhängige Entfaltung des Substratproteins im 19S-Komplex erfolgt (Ciechanover und Schwartz 1998, DeMartino et al. 1996, Hwang et al. 2001).

Der 11S-Regulator (REG) oder PA28 besteht aus den homologen  $\gamma$ -Interferon induzierbaren Untereinheiten PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$ , die einen hetero-hexameren oder -heptameren Ring bilden und den 19S-Komplex ersetzen (Dubiel et al. 1992, Chu-Ping et al. 1992, Mott et al. 1994, Gray et al. 1994, Groettrup et al. 1996a). Die Bindung von PA28 an den beiden Enden des 20S-Proteasoms (S11-S20-S11) ist ATP-unabhängig. Der 11S-Regulator erhöht die Aktivität des 20S-Proteasoms und verändert seine Protease- und Substratspezifität (Harris et al. 2001). Er scheint die Öffnung des 20S-Proteasoms zu vergrößern, und damit die Diffusion auch langer Peptidprodukte aus dem Proteasom, die als MHC-Ligandenvorläufer geeignet sind, zu erleichtern (Hwang et al. 2001, Kloetzel 2001). Ferner induziert PA28 das 20S-Proteasom zur Ausführung von Doppelschnitten, die zur direkten Entstehung von geeigneten Peptidepitopen für MHC-Klasse I-Moleküle führt (Groettrup und Schmidtke 1999, Dick TP et al. 1996). Ihre Überexpression in Zelllinien führt zur erhöhten Präsentation einiger T-Zellepitopen (Groettrup et al. 1996a, van Hall et al. 2000, Schwarz et al. 2000 a und b). PA28 $\alpha$ -/PA28 $\beta$ -negative Mäuse zeigen normale Prozessierung von Ovalbumin und eine zum Wildtyp vergleichbare Immunantwort gegen die Infektion mit dem Influenza A Virus. Jedoch besitzen diese Mäuse keine Fähigkeit mehr, das Melanomantigen TRP2 (tyrosinase-related protein2) zu präsentieren (Murata et al. 2001). Damit scheint PA28 $\alpha$ / $\beta$  für die Prozessierung bestimmter Antigene notwendig zu sein.

Die Stimulation von Zellen mit dem Zytokin  $\gamma$ -Interferon führt zur Bildung eines sogenannten Immunoproteasoms, in dem die drei konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheiten  $\delta$ , Z und X jeweils durch LMP2, MECL1 (LMP10) und LMP7 ersetzt sind (Groettrup et al. 1996b, Nandi et al. 1996, Woodward et al. 1995, Belich et al. 1994). Dieser Komplex liegt hauptsächlich in Assoziation mit PA28 vor (Brooks et al. 2000). Das Immunoproteasom zeigt eine veränderte proteolytische Aktivität, es spaltet in erhöhter Aktivität hinter C-terminalen hydrophoben und basischen Aminosäureresten, während die Spaltung hinter sauren Aminosäuren herabgesetzt ist (Gaczynska et al. 1993, Driscoll et al. 1993). So entstehen Peptide mit optimalen Sequenzmotiven und Verankerungsresten für TAP (siehe Abschnitt I.4.) und MHC-Klasse I-Moleküle (Rock und Goldberg, 1999). Ferner zeigten *in vitro* Experimente, dass die

proteolytische Spezifität des Immunoproteasom zu erhöhter Produktion N-terminal verlängerten antigenen Vorläuferpeptiden führt (Cascio et al 2001). Diese werden, nach ihrem Transport, von ER-Aminopeptidasen zu optimalen Bindepeptiden für MHC-Klasse I-Moleküle getrimmt (Serwold et al. 2001). Das im ER-Lumen residente Gp96, das Peptidbindeaktivität besitzt (Lammert et al. 1997), wurde als eine dieser Aminopeptidasen identifiziert (Menoret et al. 2001). Wie die generierten Peptide schließlich an den ER-Membran lokalisierten Peptidtransporter TAP gelangen ist noch nicht vollständig geklärt. Die Beobachtungen, dass das Immunoproteasom um das ER angereichert wird (wahrscheinlich durch PA28 dorthin rekrutiert) (Brooks et al. 2000), und dass das Immunoproteasom über PA28 mit TAP assoziieren kann (Hwang et al. 2001), legen die Vermutung nah, dass die Peptide direkt zum Ort der ER-Translokation gelangen.

### **3. TAP-vermittelter Peptidtransport**

Erste Hinweise auf die Existenz eines Transporters, der Peptide vom Zytosol ins ER-Lumen transportiert, lieferten Beobachtungen an Zellen, die trotz normaler Synthese der MHC-schwere Kette und  $\beta_2$ -Mikroglobulin, verminderte MHC-Klasse I-Oberflächenexpression zeigten (Townsend et al. 1989). Dieser Defekt konnte durch Zugabe oder Einführung von synthetischen Peptiden mit ER-Signalsequenz aufgehoben werden (Anderson et al. 1991). Hierauf konnten mehrere Gruppen (u.a. Deverson et al. 1990, Trowsdale et al. 1990, Monaco et al. 1990) zwei Gene im MHC-Klasse II-Locus identifizieren, die wegen ihrer Genomlokalisierung, ihrer hohen Homologie zur Familie der ATP-Binding-Cassette Transporter (ABC Transporter) und ihrer Deletion in den defekten Zellen, als Kandidaten für den Peptidtransport vermutet wurden. Die Transfektion der in MHC-Klasse I-Oberflächenexpression defekten Zelllinien mit den identifizierten Genen führte zur Wiederherstellung der MHC-Klasse I-Oberflächenexpression (Powis et al. 1991, Momburg et al. 1992). Wegen ihrer Beteiligung an der Antigenprozessierung wurden die beiden Untereinheiten des Peptidtransporters als **Transporter associated with antigen processing 1 und 2 (TAP1 und TAP2)** (WHO Nomenklature Committee 1991) bezeichnet. Der endgültige Beweis für die Peptidtransportaktivität von TAP lieferten schließlich Studien an Mikrosomen bzw. an Streptolysin O permeabilisierten Zellen (Shepherd et al. 1993, Neefjes et al. 1993, Überblick in Howard JC. 1995). Nur die TAP-haltigen Zellen bzw. Mikrosomen konnten Peptide transportieren. Ferner zeigten diese und andere Studien, dass der Peptidtransport ATP-abhängig ist und nur beide TAP-Untereinheiten als Heterodimer einen aktiven Transporter bilden (Meyer et al. 1994, Kelly et al. 1992, Spies et al. 1992). Die durch

Einzelpartikelbildanalysen (single particle image) bestimmte dreidimensionale Struktur von TAP bestätigte, dass TAP1 und TAP2 ein Komplex im Verhältnis von 1 zu 1 bilden (Velarde et al. 2001). Dass keine anderen Faktoren, zumindest des Immunsystems, für den TAP-abhängigen Peptidtransport benötigt werden, konnte durch die funktionale Expression von TAP in den Insektenzellen von *Spodoptera frugiperda* (Sf9) (Meyer et al. 1994) und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Urlinger et al. 1997) gezeigt werden. Allerdings bewirkt das Hitzeschockprotein hsp70 eine erhöhte Peptidbindung und Transportaktivität von TAP (Chen und Androlewicz 2001).

TAP transportiert Peptide mit einer Länge zwischen 8 und 16 Aminosäuren (van Endert et al. 1994). Untersuchungen mit kombinatorischen Peptidbibliotheken zeigten, dass Peptide mit basischen Aminosäuren an den N-terminalen Positionen 1 und 2, aromatischen an der Position 3 und basischen oder hydrophoben Aminosäuren am C-terminus hohe Affinität zu TAP besitzen (Uebel et al. 1997, Schmitt und Tampe 2000). Das entspricht genau den Merkmalen der Peptide, die vom Immunoproteasom generiert werden (siehe **Abschnitt I.2.**) und derer die an MHC-Klasse I-Moleküle binden (siehe **Abschnitt I.1.**). Dies und die Tatsache, dass Tap1 und Tap2 in unmittelbarer Nähe zu den Genen für die immunoproteasomalen Untereinheiten LMP2 und LMP7 liegen und auch durch  $\gamma$ -Interferon induzierbar sind (Momburg et al. 1998), und dass die Gene für LMP2 und TAP1 vom selben bidirektionalen Promotor transkribiert werden (White et al. 1996), deuten auf eine starke Koordination zwischen Peptidgenerierung, Peptidtransport und Peptidbeladung von MHC-Klasse I-Molekülen hin.

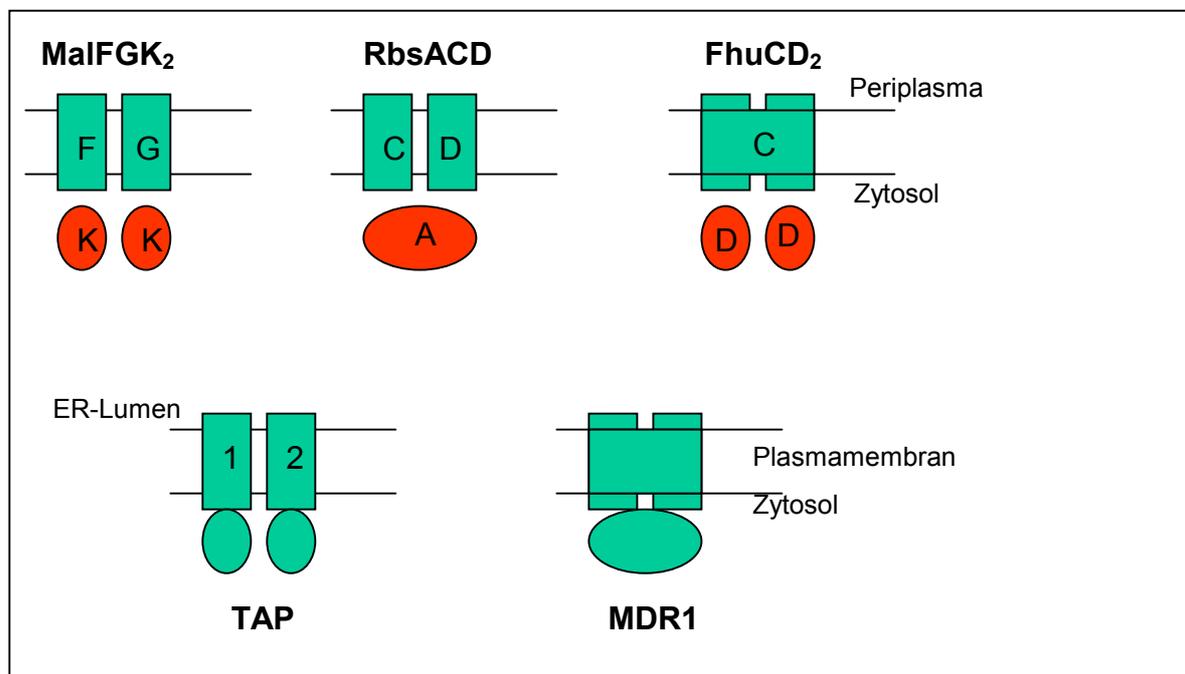
#### **4. TAP ein Modell für ABC Transporter**

TAP gehört zu der **A**TP-**B**inding-**C**assette (ABC)-Transporter Familie, der größten paralogen Transmembranproteinfamilie (Higgins 1992, Schneider und Hunke 1998). Der Name dieser Proteinfamilie beruht auf die hochkonservierte ATP-Bindedomäne. Sie liefert durch ATP-Hydrolyse die nötige Energie für den meist unidirektionalen Substrattransport.

ABC-Transporter sind in zahlreichen Lebensformen (Bakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten einschließlich den Menschen) vertreten und übernehmen unterschiedliche Funktionen wie Nährstoffaufnahme (z.B. Maltosetransporter MalFGK<sub>2</sub>), Proteinsekretion (z.B. der bakterielle Transporter Hämolyisin B), Peptidtransport (Mdl1 und TAP), Antibiotikaresistenz (P-glykoproteine) und Antigenpräsentation (TAP) (Schneider und Hunke 1998). Sie spielen zum Teil eine wichtige Rolle in unterschiedlichen pathophysiologischen Prozessen und sind daher

von großer medizinischer Bedeutung. So verursacht ein Defekt in **cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)**, welches an der Aufrechterhaltung des Chloridhaushalts von z.B. Lungenepithelzellen beteiligt ist, die Erbkrankheit Mukoviszidose (Schneider E. 2000). Das P-Glykoprotein (z.B. MDR2), welches normalerweise Phosphatidylcholine transportiert (Borst et al. 2000), verursacht in vielen Geweben die Resistenz von Krebszellen gegen die Chemotherapie, in dem es die Medikamente wieder aus den Zellen herauspumpt. Ebenfalls ist die beobachtende Resistenz des Malaria Erregers *Plasmodium falciparum* gegenüber das Medikament Chloroquin auf den ABC-Transporter pfMDR zurückzuführen (Higgins 1992, Schneider E. 2000).

Alle bis jetzt beschriebene ABC-Transporter bestehen aus vier Domänen, zwei hydrophile Nukleotidbindedomänen, die den Transportvorgang durch ATP-Hydrolyse energetisieren, und zwei Transmembrandomänen, die den Transportkanal bilden. Die vier Domänen können in unterschiedlichen Kombinationen arrangiert sein (siehe **Abbildung I.2.**). Bei bakteriellen ABC-Transportern liegen sie meist in vier getrennten Polypeptidketten vor, während bei Säugerzellen oft alle vier Domänen eine einzige Polypeptidkette bilden.



**Abbildung I.2. Strukturelle Organisation der vier Domänen einiger ABC-Transportern.**

Die obere Reihe zeigt bakterielle Transporter und die untere Reihe Säugertransporter. Die ovalen Strukturen stellen die Nukleotidbindedomänen (NBD) und die Quadraten die Transmembrandomänen (TMD) dar. Rotmarkierte NBDs sind nicht mit der TMD fusioniert. Die einzelnen Domänen können als separate Polypeptidketten (Maltosetransporter: MalK) vorliegen oder die NBDs (Ribosetransporter: Rb) bzw. die TMDs (Fe<sup>3+</sup>-ferrichrome-Transporter: Fhu)

können fusioniert sein. Im Beispiel vom Peptidtransporter TAP kann jeweils eine TMD mit einer NBD fusioniert sein. Bei dem Pharmaka- und Lipidtransporter MDR1 sind alle Domänen in einer einzigen Polypeptidkette fusioniert, wobei jede TMD von einer NBD gefolgt ist. Die periplasmatischen Bindeproteine der bakteriellen Transporter wurden nicht gezeichnet.

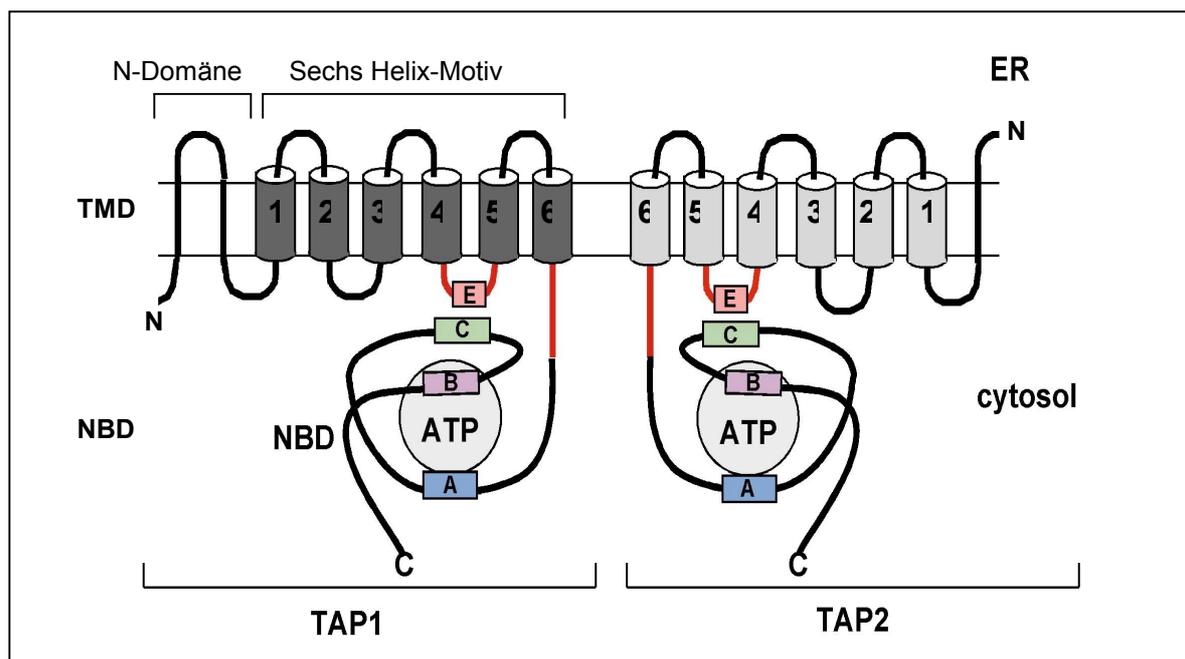
Die Transmembrandomänen (TMDs) der verschiedenen ABC-Transporter zeigen sehr geringe Sequenzhomologie. Im allgemeinen werden jeder TMD sechs Transmembranhelizes (TM) vorausgesagt (Pearce et al. 1995, Higgins 1992). Während im Falle des bakteriellen ABC-Transporters MsbA durch die Kristallstrukturaufklärung (Chang und Roth, 2001) und bei Pgp1 durch molekularbiologische Untersuchungen die Vorhersage bestätigt wurde, zeigten unterschiedliche Studien an TAP, dass möglicherweise TAP1 acht und TAP2 sieben Transmembransegmente besitzen (Vos et al. 1999, Gileadi und Higgins 1997). Durch Einzelpartikelbildanalysen an TAP ließ sich der Raum, der von jeder TMD mit ihren luminalen Schleifen besetzt ist, auf ca.  $22 \times 56 \text{ \AA}$  abschätzen. Das würde einer Fläche für 7-8 Transmembranhelizes (TMs) und ihrer zytosolischen Schleifen entsprechen (Velarde et al. 2001). Photokreuzvernetzungsstudien an TAP zeigten, dass die Peptidbindetasche von beiden Transmembrandomänen gebildet wird (Nijenhuis et al. 1996). Während die C-terminalen Transmembrandomänen TM 2-6 von TAP1 und TM 1-5 von TAP2 (siehe **Abbildung I.3.**) für die TAP-Heterodimerisierung und die Bildung der Translokationspore essentiell sind (Vos et al. 2000), ist die Funktion der N-terminalen (ca. 150 Aminosäuren) Verlängerung von TAP (siehe **Abbildung I.3.**), die keine Homologie zu anderen ABC-Transportern aufweist, unklar. Ob TAP über diese Domänen mit den Komponenten des MHC-Ladekomplexes interagiert, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Während die Transmembrandomänen (TMDs) eine geringe Sequenzhomologie aufweisen, zeigen die Nukleotidbindedomänen (NBDs) verschiedener ABC-Transporter bis zu 50 % Sequenzhomologie. Bei TAP weisen die NBDs eine Homologie von ca. 60 % auf und sind durch die für alle ABC-Transporter hochkonservierte Aminosäure-Sequenzabschnitte charakterisiert (siehe **Abbildung I.3.**): das glycinreiche **Walker A** Motiv (P-Loop) mit der Konsensussequenz **GXXGXGKS/T** (X steht für jede beliebige Aminosäure, das **Linkerpeptid** (Signatursequenz oder C-Loop) mit der Konsensussequenz **LSGGQQ/R/KQR** und das **Walker B** Motiv bestehend aus vier hydrophoben Aminosäuren und einem Aspartat oder Glutamat (**hhhhD/E**, h steht für jede hydrophobe Aminosäure). Röntgenstrukturanalysen von ATPasen wie  $F_1F_0$ -ATPase (Abrahams et al. 1994), GTPasen wie Ras p21 (Egner et al. 1987), dem

Elongationsfaktor EF-Tu (Bertchold et al. 1993) (die ebenfalls Walker A und B Motive enthalten) sowie die Strukturanalysen von HisP (die NBD der Histidinpermease) (Hung et al. 1998), der NBD des humanen TAP1 (Gaudet und Wiley 2001) und von MalK (Diederichs et al. 2000) zeigen, dass die Walker A-Sequenz Kontakt zum  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat des gebundenen Nucleotids aufnimmt. Im Falle von TAP1 konnte keine Wasserstoffbindung zu der Adenin-Base festgestellt werden. Dies erklärt die Fähigkeit von TAP, auch andere Nucleotide wie GTP, CTP und UTP für den Peptidtransport umsetzen zu können (Knittler et al. 1999). Das konservierte Aspartat des Walker B Motives interagiert direkt oder über ein Wassermolekül mit dem  $\gamma$ -Phosphat (Hung et al. 1998, Gaudet und Wiley 2001). Auch die Koordinierung des  $Mg^{2+}$ -Ions, das für die Hydrolyse von ATP essentiell ist, wird dem Aspartat zugeschrieben (Senior et al. 1993). Mutationsstudien bestätigten die maßgebliche Beteiligung von Walker A und B Motive an der Bindung und Hydrolyse von ATP. Die Substitution der konservierten Lysin in Walker A-Motiv (Schneider et al. 1994) oder Aspartat in Walker B-Motiv (Shyamala et al. 1991) führten zur Verlust der ATP-Hydrolyse. Kernresonanz (NMR)-analysen an der bakteriellen Adenylatkinase deuten auf eine mögliche Rolle des Lysin in der Positionierung des Mg-ATP in eine Konformation, die für die Hydrolysereaktion günstig ist (Byeon et al. 1995). Das Linkerpeptid (C-Loop) fungiert als Informationsüberträger zwischen der Nucleotidbindedomäne und der Substratbindetasche (Dassa 1990, Dassa et al. 1985, Manavalan et al. 1995, Schneider et al. 1998, Proff und Kölling 2001). Mutationsstudien ließen auf eine mögliche Interaktion zwischen dem Linkerpeptid und dem sogenannten **EAA-Motiv** der letzten zytosolischen Schleife der Transmembrandomänen (siehe **Abbildung I.3.**) schließen. Bei Rad50, eine zu ABC-Transportern verwandte ATPase, zeigten die Kristallstrukturanalysen, dass die konservierten Serine jedes Linkerpeptids Kontakt zum  $\gamma$ -Phosphat des an der gegenüberliegenden RAD50-Untereinheit gebundenen ATP nehmen (Hopfner et al. 2000). Ein weiteres C-terminal lokalisiertes Motiv, die **Switch Region**, wurde bei ABC-Transportern charakterisiert (Yoshida et al. 1995). Die Strukturanalysen an HisP zeigen, daß das konservierte Histidin über ein Wassermolekül mit dem  $\gamma$ -Phosphat interagiert. (Hung et al. 1998). Bei MalK führt die Substitution des Histidin zum Verlust der Transportaktivität. Suppressormutationen lassen auf eine Interaktion zwischen der Switch Region und der Transmembrandomäne schließen (Speiser et al. 1991, Beaudet et al. 1995, Mourez et al. 1997). Die substratbindungsbedingte Konformationsänderung in der Transmembrandomäne könnte über die Switch Region entsprechende strukturelle Veränderungen in der NBD auslösen.

Der  $\gamma$ -Phosphat-Linker (auch Q-Loop genannt) liegt ca.35 Aminosäuren aufwärts vom Walker-A Motiv (siehe **Abbildung I.4. und I.5.**) und ist ein weiterer Sensor, der die Bindung und Hydrolyse vom Nukleotid in der NDB mit Konformationsänderung der  $\alpha$ -helikalen Domäne (siehe **Abbildung I.4. und Abschnitt I.5.**) bzw. mit der Öffnung und Schließung des Transporters koppelt (Berger et al. 2002, Yuan et al. 2001). Ein bei fast allen ABC-Transportern konserviertes Glutamin ist ein Erkennungsmerkmal dieses Motivs. Kristallstrukturanalysen von HisP, MalK, Rad50 und MJ0796 zeigen, dass das konservierte Glutamin mit dem  $\gamma$ -Phosphat interagiert (Hung et al. 1998, Diederichs et al. 2000, Hopfner et al. 2000, Yuan et al. 2001). Die Substitution von Glutamin in Alanin bei CFTR führt zur verminderten Öffnungsfrequenz des Kanals (Berger et al. 2002).

Domänen austauschstudien zeigten, dass sowohl die beiden TMDs als auch die NBDs von TAP einander nicht ersetzen können, was auf ihre asymmetrische Funktionalität hindeutet (Daumke et al. 2001).



**Abbildung I.3. Schematische Darstellung vom Transporter associated with antigen processing (TAP)** (nach Schmitt & Tampe 2000). TAP liegt als Heterodimer vor. Jede TAP-Kette besteht aus einer N-terminalen Transmembrandomäne (TMD) und einer C-terminalen zytosolischen Nukleotidbindedomäne (NBD). Studien an Deletionsmutanten von TAP sagen acht Transmembranhelices (TM) für TAP1 und sieben TM für TAP2 voraus (Vos et al. 1999a). Die sechs typischen TM der ABC-Transporter sind als Zylinder dargestellt. Die TAP-spezifische N-terminale Verlängerung (N-Domäne) der TMDs sind als einfache Linien gezeichnet. Bereiche, die an der Peptidbindung beteiligt sind, sind rot markiert. Die Kommunikation zwischen den TMDs und NBDs erfolgt wahrscheinlich über das EAA-Motiv (E) und den C-Loop (C). Die

Walker A und B Motive (A und B) sind maßgeblich an der Nukleotidbindung und -Positionierung beteiligt.

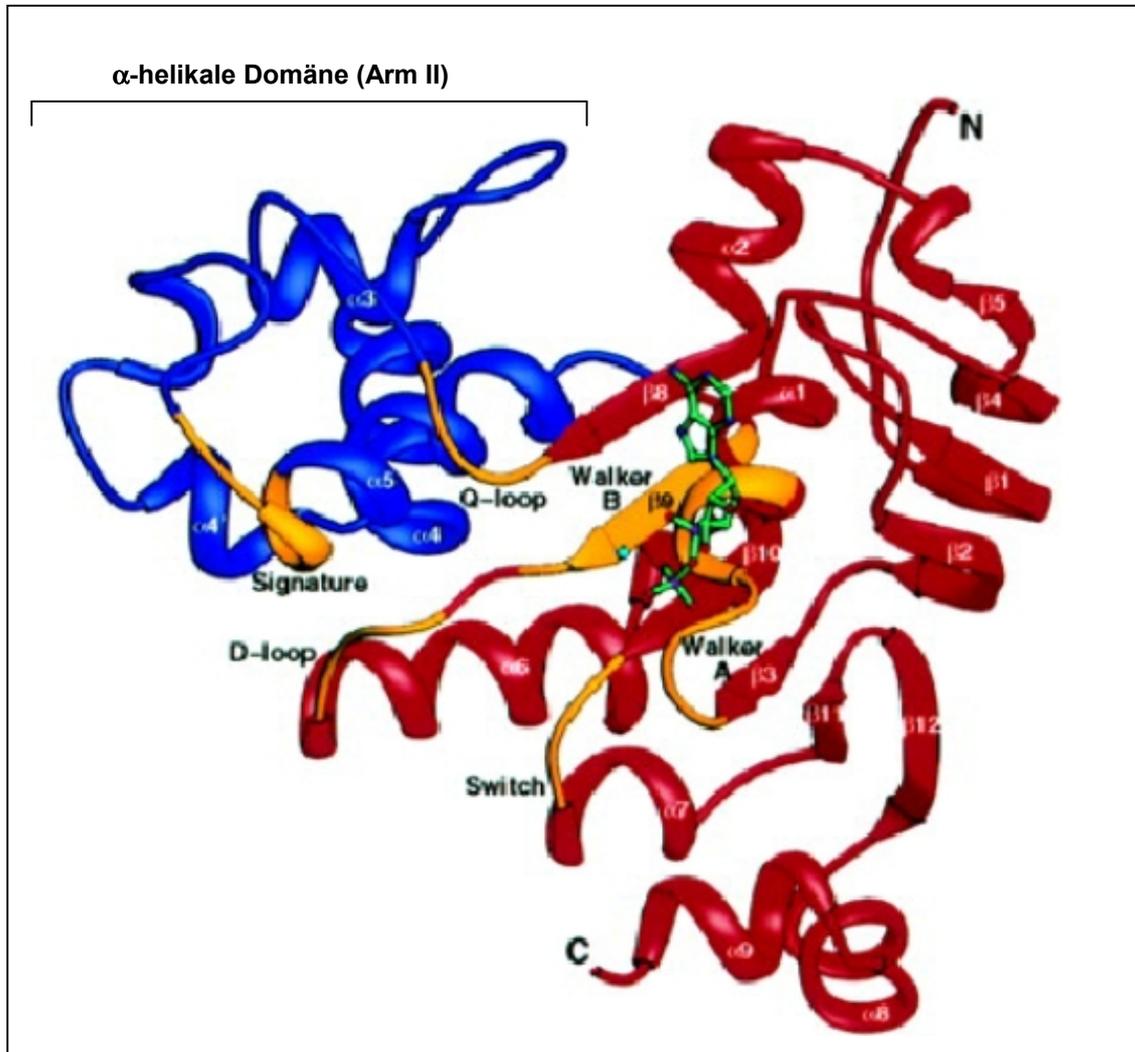
Trotz mehrerer biochemischer und molekulargenetischer Studien ist der Transportmechanismus von ABC-Transportern noch weitgehend unklar. Fest steht, dass beide Nukleotidbindedomänen für einen aktiven Transporter essentiell sind, und dass sie während des Transportprozesses asymmetrisch und wechselseitig abhängig agieren. Dies wurde durch Mutationsstudie festgestellt, in denen bestimmte Domänen zwischen NBD1 und NBD2 ausgetauscht wurden (Daumke et al. 2001, Hrycyna et al. 1999), bestimmte Aminosäure in NBD1 oder NBD2 substituiert wurden (Alberts et al. 2001, Powe et al. 2002, Lapinski et al. 2001, Proff et al. 2001) oder durch biochemische Studien (Karttunen et al. 2001, Senior et al. 1998). Das asymmetrische wechselseitig abhängige Verhalten konnte auch bei dem homodimeren HisP festgestellt werden (Kreimer et al. 2000). Die beiden identischen NBDs nehmen wahrscheinlich unterschiedliche Konformationen im Dimerkomplex ein. Bei TAP konnte durch Domänenaustauschstudien gezeigt werden, dass auch die beiden TMDs einander nicht ersetzen können, was auf ihre asymmetrische Funktionalität hindeutet (Daumke et al. 2001, Arora et al. 2001).

Basierend auf die oben erwähnten Studien wurden für CFTR und MDR1 (Senior et al. 1997) sowie für den Peptidtransporter TAP (Alberts et al. 2001) Transportzyklusmodelle vorgeschlagen. Alberts et al. gehen von einem Grundzustand aus, in dem ATP in NBD1 und ADP in NBD2 gebunden ist und TAP eine peptidkompetente Konformation hat. Die Substratbindung bedingt Konformationsänderung, die in der Hydrolyse vom NBD1-gebundenem ATP und der Freisetzung des ADP aus der NBD2 resultiert. Die freiwerdende Energie wird für den Peptidtransport umgesetzt. ATP-Bindung und Hydrolyse an der NBD2 führt schließlich den Transporter in den peptidkompetenten Ausgangszustand zurück und ein erneuter Transportzyklus kann beginnen. Karttunen et al. (2001) schlagen einen ähnlichen Zyklus vor, in dem die ATP-Hydrolyse an NBD2 für Peptidbindung und Transport verantwortlich ist, während die Hydrolyse von ATP an NBD1 den Transporter in den Ausgangszustand zurückführt.

## **5. Struktur der Nukleotidbindedomäne von TAP**

Gaudet & Wiley (2001) konnten die Struktur der Nukleotidbindedomäne (NBD) von TAP1 im ADP-gebundenen Zustand aufklären (siehe **Abbildung I.4.**). Sie zeigt die für ABC-Transporter

typische L-Form mit einer helikalen Domäne (entspricht Arm II in HisP) und einer RecA-ähnliche Domäne (entspricht Arm I in HisP). Die für ABC-Transporter typische helikale



**Abbildung I.4. Dreidimensionale Struktur der Nukleotidbindedomäne (NBD) des Transporter associated with antigen processing 1 (TAP) (Gaudet & Wiley 2001).** Die  $\alpha$ -helikale Domäne ist blau dargestellt und enthält das Linkerpeptid. Die Rec-A-ähnliche Domäne ist rot markiert. Sie enthält die Sequenzmotive Walker A und B, die Switch Region und den D-Loop. Der gebundene ADP ist grün dargestellt und liegt nahe der Walker A und B-Sequenz.

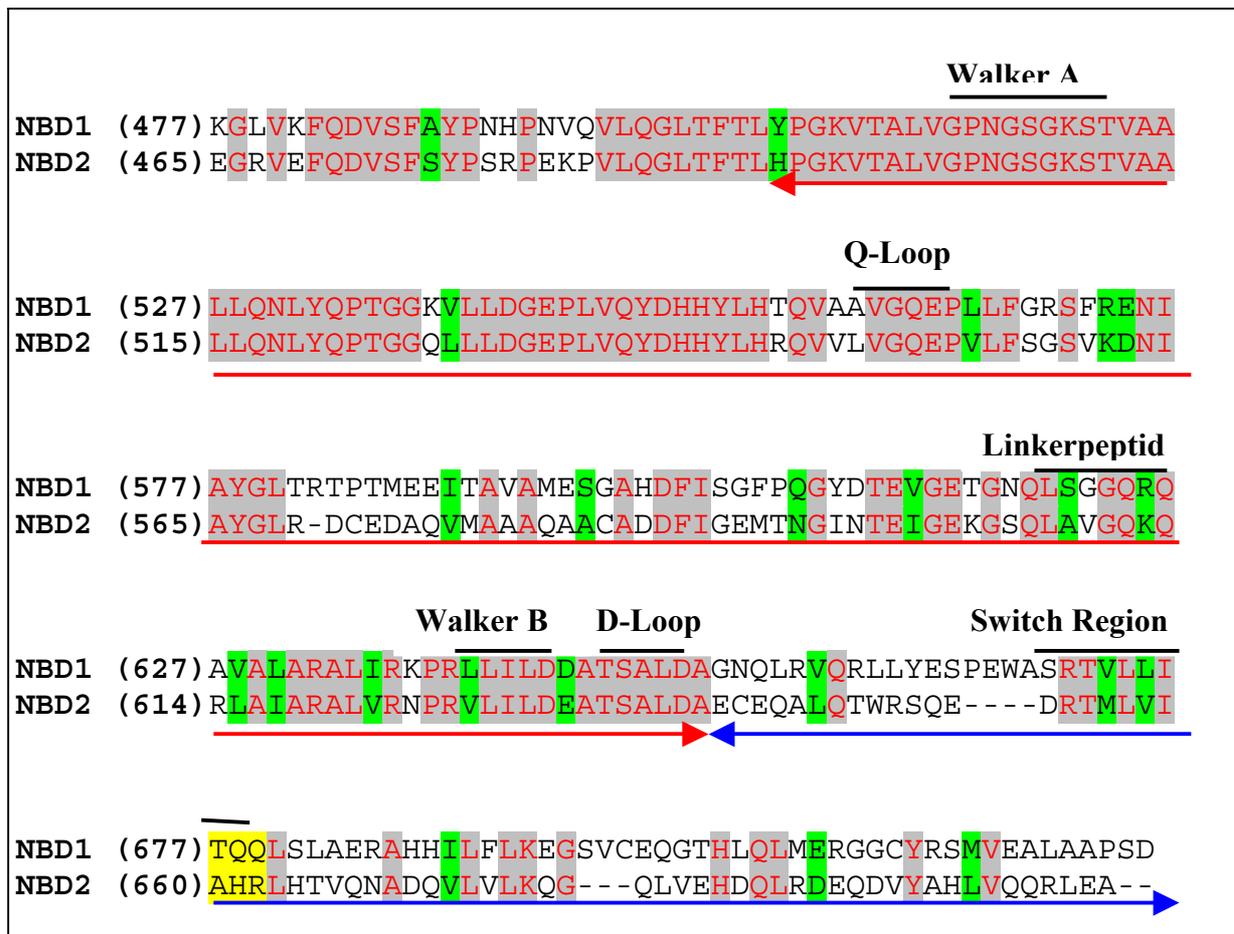
Domäne (Schneider et al. 1998) besteht aus vier  $\alpha$ -Helizes und enthält das Linkerpeptid (C-Loop, Signaturmotiv) und einen Teil des Q-Loops. Im Vergleich zu der ATP-gebundenen Form von HisP zeigt die helikale Domäne der ADP-gebundenen Form von TAP-NBD1 eine Rotation nach außen, die von der ATP-Kassette (in Arm I) wegweist. Ähnliche Konformationsunterschiede

sind beim Vergleich zum dimeren MalK zu beobachten. Dies deutet auf die Flexibilität der helikalen Domäne in Abhängigkeit vom Dimerisierungs- und Nukleotidbindezustand hin. Yuan et al. (2001) stellten ähnliche Konformationsunterschiede der helikalen Domäne von MJ0796 fest. Sie postulieren, dass im ATP-gebundenen Zustand das konservierte Glutamin im Linkerpeptid (Q-Loop) mit dem  $\gamma$ -Phosphat interagiert, und damit die helikale Domäne in die ATP-Kassette im Arm I hineinzieht. Die Lage des Q-Loop, zwischen der helikalen Domäne und der RecA-ähnliche Domäne, würde diese strukturelle Funktion erlauben. Dies unterstützt die Vermutung, dass die helikale Domäne als ein Sensor zwischen der TMD und NBD fungiert. Unterschiedliche Mutationsstudien an der helikalen Domäne von HisP führten zu einem Defekt in der Transportaktivität, die Nukleotidbindefähigkeit blieb aber erhalten (Schneider et al. 1998). Das deutet darauf hin, dass die helikale Domäne keinen direkten Einfluß auf die katalytische Aktivität hat. Der Arm I (RecA-ähnliche Domäne) enthält die Motive Walker A, Walker B und die Switch Region. Fast Alle Aminosäurereste des Walker A-Motivs nehmen Kontakt zum ADP auf. Wegen des Fehlens des  $\gamma$ -Phosphats kann nur durch Vergleich z.B. mit der Struktur von HisP oder durch Abstandsberechnungen vermutet werden, dass auch Aspartat und Glutamin des Walker B-Motivs bzw. das Glutamin der Switch Region direkten oder indirekten Kontakt zum  $\gamma$ -Phosphat nehmen könnten. TAP-NBD1 zeigt die für ABC-Transporter typische C-terminale Verlängerung, die zwei  $\alpha$ -Helizes enthält. Diese Region scheint in ihrer Länge und Struktur konserviert zu sein. Gaudet et al.(2001) vermuten, dass sie eine Rolle bei der Modellierung des Transports spielen oder mit der TMD des Transporters interagieren. In wieweit die Funktions- und Sequenzunterschiede zwischen der NBD1 und NBD2 von TAP sich auch auf struktureller Ebene widerspiegeln, müssen weitere Strukturaufklärungen von NBD2, NBD1-NBD2-Dimeren sowie von der ATP-gebundenen Form beider TAP-Untereinheiten zeigen.

## **6. Zielsetzung der Arbeit**

Studien an unterschiedlichen ABC-Transportern wie Mdr1 (Hrycyna et al. 1999), Ste6 (Proff et al. 2000), SUR (Matsuo et al. 2000), HisP (Kreimer et al. 2000), CFTR (Senior & Gadsby 1997, Aleksandrov et al. 2002) und TAP (Alberts et al. 2001, Karttunen et al. 2001, Saveanu et al. 2001, Lapinski et al. 2001) zeigen, daß die Nukleotidbindedomänen (NBDs) unterschiedliche Funktionalität besitzen. Dieses konnte z.B. durch Domänenaustausche zwischen den NBDs (Hrycyna et al. 1999) oder durch Einführung symmetrischer Mutationen in NBD1 und NBD2, die zu unterschiedlichen Phänotypen führten (Alberts et al. 2001) gezeigt werden. Der

Unterschied manifestiert sich hauptsächlich im Nukleotidbindeverhalten. Im Falle von TAP, zeigt TAP1 hohe Affinität zu ATP und ADP, während TAP2 schwache Bindung zu ATP und starke zu ADP zeigt (Alberts et al. 2001). Durch Herstellung von TAP-Mutanten, in denen die NBDs zwischen TAP1 und TAP2 ausgetauscht wurden, konnten Daumke et al. (2001) zeigen, daß dieses Nukleotidbindeverhalten auf intrinsische Eigenschaften der jeweiligen NBDs zurückzuführen ist. Unabhängig von der Transmembrandomäne konnte die NBD1 ATP binden, während NBD2 nur ADP-Bindung zeigte. Da die beiden NBDs eine Sequenzhomologie von 60 % aufweisen, stellt sich die Frage nach der Ursache dieses Unterschiedes. Sequenzvergleiche zwischen NBD1 und NBD2 zeigen ca. 70 % Sequenzidentität im Kernbereich der NBDs (Kern-NBD) (siehe **Abbildung I.5.**), während die ca. 70 Aminosäure langen C-terminalen Bereiche nur ca. 30 % Homologie aufweisen.



**Abbildung I.5. Sequenzvergleich der Nukleotidbindedomänen (NBDs) vom Ratten-TAP1 und -TAP2.** Die für ABC-Transporter typischen Sequenzmotive sind durch schwarze Linien markiert. Identische Aminosäuren sind durch rote Buchstaben angegeben und grau unterliegt. Die homologen Aminosäuren sind grün markiert. Der blaue Pfeil markiert den ausgetauschten, beziehungsweise bei TAP2 deletierten, variablen C-terminalen Bereich. Die ausgetauschten

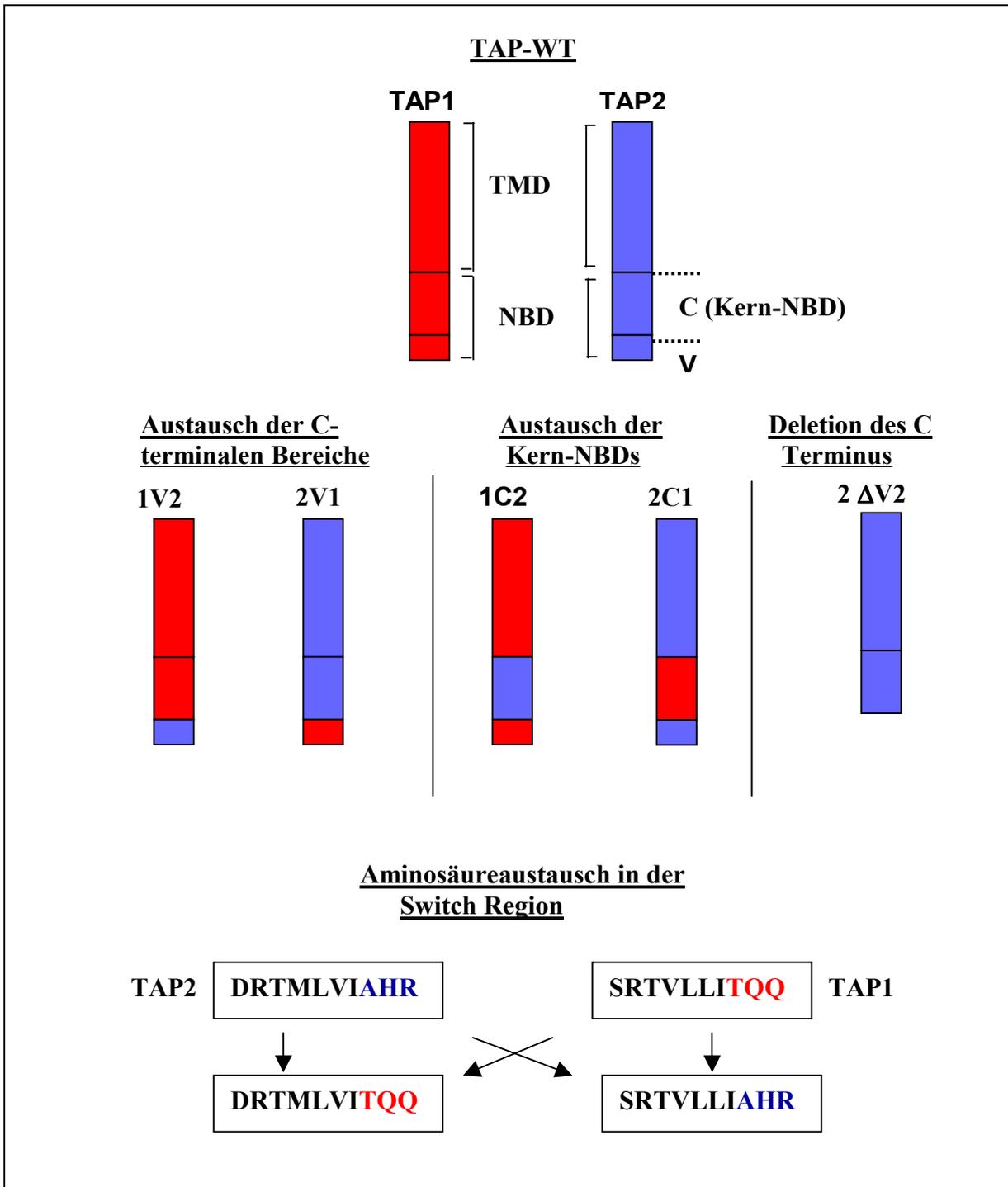
Kern-NBDs sind durch roten Pfeil markiert. Die ausgetauschten Aminosäuren der Switch Region sind gelb unterlegt.

Der Austausch der 42-Aminosäure langen C-terminalen Sequenzen zwischen SUR1 und SUR2A führte zur Veränderung ihrer Nukleotidbindeeigenschaft (Matsuoka et al. 2000). Ferner beobachtete Velarde et al. (2001) erhöhte ATP-Bindung an TAP2, wenn vor dem ATP-Bindeassay die TAP-enthaltenden Zellysate mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von TAP2 (KVYAHLVQQRLEA) vorinkubiert wurden. Ein weiterer Sequenzunterschied zwischen NBD1 und NBD2 von TAP ist im Bereich zwischen Q-Loop und Linkerpeptid zu beobachten (siehe **Abbildung I.5.**). Beaudet et al. (1995) vermuten, dass dieser Bereich zur strukturellen Organisation der NBDs beiträgt. Überdies enthält die NBD1 ein Aspartat am Ende des Walker B-Motivs anstelle des in ABC-Transportern konserviertes Glutamats und das Linkerpeptid zeigt eine deutliche Abweichung zur Konsensussequenz (LAVGQKQR in NBD2 statt LSGGQRQA in NBD1). Diese Motive sind an der Bindung und Hydrolyse von ATP beteiligt. Ferner wird dem Serin des Linkerpeptids, das der NBD2 fehlt, eine wichtige Rolle bei der Dimerisierung der NBDs zugesprochen (Hopfner et al. 2000). In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, auf welche Sequenzbereiche das unterschiedliche Nukleotidbindeverhalten und dementsprechend die unterschiedliche Funktionalität von NBD1 und NBD2 zurückzuführen ist. Hierfür sollten cDNA-TAP-Mutanten hergestellt werden, in denen die kodierenden Sequenzen für die 73 Aminosäure lange C-Terminus von TAP1 und 66 Aminosäure lange C-Terminus von TAP2 oder für die Kern-NBD-Bereiche (Kern-NBDs) ausgetauscht sind (siehe **Abbildung I.6.**). Um die Integrität der Nukleotidbindekassette (bestehend aus Walker A, Walker B und Linkerpeptid) zu erhalten wurde entschieden nicht nur den variablen Bereich zwischen Q-Loop und Linkerpeptid sondern die ganze Kern-NBD auszutauschen.

Die hergestellten cDNA-TAP-Mutanten sollten in TAP-negativen T2-Zellen einzel- oder in unterschiedlicher Kombinationen mit anderen TAP-Ketten transfiziert werden. In diesen hergestellten TAP-chimäre Zelllinien sollte das Nukleotidbindeverhalten untersucht werden und überdies der Einfluß der Domänen austausche auf die Peptidbinde- und Peptidtransportaktivität von TAP untersucht werden.

Basierend auf den ersten Ergebnissen dieser Diplomarbeit wurden weitere TAP-Mutanten hergestellt, um das Nukleotidbindeverhalten genauer zu charakterisieren. Eine TAP2-Deletionsmutante (siehe **Abbildung I.6.**), der die C-terminale Domäne fehlt sollte zeigen, ob die Kern-NBD alleine eine Nukleotidbinde-kompetente Domäne bilden kann. Darüber hinaus

wurden in der Switch-Region von NBD1 und NBD2 drei nichtkonservierte Aminosäuren wechselseitig ausgetauscht (siehe **Abbildung I.6.**). Hiermit soll in weiterführenden Studien untersucht werden, ob der beobachtete Phänotyp bei den TAP-Mutanten mit ausgetauschten C-terminalen Sequenzbereichen allein auf die unterschiedlichen Switch-Regionen zurückzuführen ist. Ein in fast allen ABC-Transportern konserviertes Histidin ist in TAP1 durch ein Glutamin substituiert. Die Struktur von HisP zeigt, dass dieses Histidin Kontakt zum  $\gamma$ -Phosphat aufnimmt (Hung et al. 1998). Die benachbarten Aminosäuren vom Histidin könnten für strukturelle Positionierung vom Histidin von Bedeutung sein, daher sollten auch sie mit ausgetauscht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die cDNAs für diese TAP-Mutanten hergestellt und in TAP-negativen T2-Zellen transfiziert.



**Abbildung I.6. Schematische Darstellung der hergestellten TAP-Mutanten.** TAP1 ist rot, TAP2 blau gefärbt. Die Nukleotidbindedomäne ist in zwei Bereiche geteilt. Das untere kleinere Quadrat entspricht der stark variablen C-terminalen Sequenz (V-Region, V). Das obere Quadrat entspricht die Kern-NBD. Die TAP-Mutanten, in denen die V-Regionen oder die Kern-NBDs ausgetauscht wurden, sind in der zweiten Reihe dargestellt. Die Deletionsmutante von TAP2 ist verkürzte Form dargestellt. In der letzten Reihe sind die Sequenzen der Switch Region von TAP1 und TAP2 dargestellt, die ausgetauschten Aminosäuren sind blau (TAP2) und rot (TAP1) dargestellt. Zur Nomenklatur siehe **Teil IV.2.a.**

## II. Materialien

Lösungen wurden mit deionisiertem und zweifach destilliertem Wasser oder mit Wasser aus dem Ultra Pure Water System Beta 75 / Delta UV / UF von USF Seral Reinstwassersysteme GmbH, Ransbach-Baumbach, angesetzt.

### 1. Chemikalien und fertige Reagenzien:

<b>Acrylamid/Bisacrylamid</b>	Roth
<b>ADP-, ATP-Agarose</b>	Sigma
<b>Agarose für Gelelektrophorese</b>	FMC, Bioproducts, Rockland, Maine USA
<b>APS</b>	Sigma
<b>ATP</b>	Böhringer
<b>Bromphenolblau</b>	Merck
<b>Borsäure</b>	Merck
<b>Chaps</b>	Sigma
<b>Chloroform</b>	Roth
<b>Concanavalin A-Sepharose</b>	Sigma
<b>Coomassie Brilliant G-250</b>	BioRad
<b>Digitonin</b>	Wako
<b>DMP</b>	Sigma
<b>DMSO</b>	Roth
<b>Dowex, 50 WX4, 50-100 mesh</b>	Supelco
<b>DTT</b>	Sigma
<b>EDTA</b>	Merck
<b>EGTA</b>	Merck
<b>Entwickler</b>	G158, AGFA
<b>Ethanolamin</b>	Sigma
<b>Ethidiumbromid</b>	Roth
<b>Fixierer</b>	G354, AGFA
<b>Glycerin</b>	Roth
<b>IgG, anti-Maus, Peroxidase gekoppelt</b>	Sigma
<b>Isoamylalkohol</b>	Roth
<b>Luminol (3-Aminophthalhydrazide)</b>	Fluka (Sigma), Artikelnr.09253

<b>Magermilchpulver</b>	Heirber (im Reformhaus erhältlich)
<b>Micro-BCA Protein Assay Reagent Kit</b>	Pierce
<b>Mitomycin C</b>	Sigma
<b>p-Cumarsäure (p-Coumaric acid)</b>	Fluka, Artikelnr.28200
<b>Phenollösung</b>	Roth
<b>Ponceau S-Konzentrat</b>	Sigma
<b>Protein A-Sepharose CL4B</b>	Pharmacia Biotech
<b>Proteininhibitor-Cocktail</b>	Böhringer
<b>SDS</b>	Sigma
<b>Sequenzierung</b>	ABI PRISM Big Dye Terminator cycle Sequencing Ready reaction Kit, ABI
<b>Sulfo-HSAB</b>	Pierce
<b>Sucrose ( Saccharose)</b>	Merck
<b>TEMED</b>	Sigma
<b>Tris</b>	ICN Biochemicals
<b>Triton X-100</b>	Sigma
<b>Tween 20</b>	Sigma
<b>Urea Ultra pure</b>	ICN Biochemicals

## 2. Medien und Medienzusätze

<b>Agar</b>	Oxoid, Hampshire
<b>Ampecillin</b>	Sigma
<b>Bacto-Hefeextrakt</b>	Oxoid, Hampshire
<b>FCS</b>	Sigma
<b>Geneticin ( G418 )</b>	PAA Laboratories oder / und Labomedic
<b>IMDM (Iscoe's Modified</b>	
<b>Dulbecco's Medium)</b>	Gibco BRL
<b>Penicillin / Streptomycin</b>	Gibco BRL
<b>Trypsin</b>	Gibco BRL
<b>Trypton</b>	Oxoid, Hampshire

### 3. Radiochemikalien

<b>Iod<sup>125</sup> :</b>	Amersham Pharmacia Biothek
<b>8-Azido-ATP (<math>\gamma^{32}\text{P}</math>) und (<math>\alpha^{32}\text{P}</math>):</b>	ICN Biochemicals

### 4. Enzyme, Gewichts- und Längenstandards

<b>1 kB Leiter für Agarosegele:</b>	Gibco
<b>Endoglykosidase H:</b>	Böhringer
<b>Rainbow-Molekulargewichtsmarker:</b>	Sigma
<b>Pfu-Polymerase:</b>	Stratagene
<b>Restriktionsenzyme:</b>	New England Biolabs
<b>RNase A:</b>	Sigma
<b>Shrimp alkaline phosphatase:</b>	USB, Amersham
<b>Streptolysin O:</b>	Murex Diagnostica

### 5. Plasmide

<b>PH<math>\beta</math>Apr1neo:</b>	siehe Gunning et al. (1987)
<b>PBluescriptKSP:</b>	Stratagene

### 6. Primer

Die Primer sind reversed phase (RP)-Kartusche gereinigt und wurden von ARK Scientific bezogen. Es wurde jeweils 10 nmol bestellt und als 50  $\mu\text{mol}$  Lösung mit autoklaviertem Wasser bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Alle bezogenen Primer waren RP-Kartusche gereinigt.

#### Sequenzierprimer:

##### Vorwärtsprimer:

<b><math>\beta</math>-actin 752 F neu:</b>	5' GGGGACGCCT CCGACCAGTG 3' ▲
<b>TAP2-283U25:</b>	5' TTCTGCCCTT GCTCTGCCTG ACTAA 3' ♣
<b>1-347neu:</b>	5' GGAGGGTGAC AACGCTGGAC TGCT 3' ▲
<b>TAP2/1-643F:</b>	5' CCAGACGCCT TTGCGAGCGC 3' ♣
<b>1-2-700Fneu:</b>	5' GCTGGAGTTT GCAGGAGATG 3' ▲

**TAP2/1-1097F:** 5' GGAGGCCTGC AGACCGTGAG 3' ♣  
**1-2-1100fneu:** 5' CCTACCGTAC GGAGCTTTGC C 3' ▲  
**1-1300U19neu:** 5' GCGGCAACCT CGTCTCCTT 3' ▲  
**TAP2-1310U19:** 5' CGGCCTGCTC TCCTTCCTG 3' ♣  
**1-2-F3-1562neu:** 5' GGGGCTGACT TTTACTCTAC ATCCTGGAAA GGTG  
ACGGC 3' ▲  
**TAP-1640f:** 5' GGTGGGACCC AATGGGTCAG GGAA 3' ▲  
**TAP2-1881Fneu:** 5' CCCCTGGTCC AGTACGATCA TCACTACCTG 3' ▲  
**TAP1-1881Fneu:** 5' TCCAGTATGA TCACCACTAC CTGCACACGC 3' ▲  
**1-2-1882Fneu:** 5' CGGGGAGAAA GGGAGCCAG 3' ▲  
**TAP2/1-1950F:** 5' GCCTTGATCC GGAAGCCACG 3' ♣  
**TAP1-2-2308Fnew:** 5' TGGTGGGTGA GGGCCAGGGG 3' ▲  
**2-1-2392Fneu:** 5' CCACAATGTT TTCCCGCCCC 3' ▲  
**TAP2-1-Fnew:** 5' GGGCCTGACG TTCACTCTAT ATCCCGGGAA GGT  
GACCG C 3' ▲  
**TAP1-1950:** 5' GGCTATGACA CAGAGGTAGG TGAAACTGG 3' ▲  
**TAP2-1950:** 5' GGAATAAACA CAGAAATCGG GGAGAAAGG 3' ▲  
Rückwärtsprimer:  
**CDV-new:** 5' CCGTCATCAC CGAAACGCGC G 3' ♣  
**1-2392Bneu:** 5' GCGGGGCGGG AAAACATTGT GGT 3' ▲  
**TAP2-2308L24:** 5' CACCCACCAA GCCCACCAA ATAA 3' ♣  
**2-1-2050B:** 5' CCGTCCGAGA GGCCACTCG 3' ▲  
**2-1884neu:** 5' TCCCTTTCTC CCCGATTTC 3' ▲  
**TAP1-1750L19:** 5' TCCCGAAAAC TTCTTCAA 3' ♣  
**TAP2-1750B:** 5' GGGTACGAGA AGGAGACATC TTGA 3' ▲  
**TAP2-1410B:** 5' GGACCTCCAC GGCCCTGGTG AACT 3' ▲  
**1-2-1100Bneuq3,0:** 5' GGCAAAGCTC CGTACGGTAG G 3' ▲  
**TAP2/1-1097B:** 5' CTCACGGTCT GCAGGCCTCC 3' ♣  
**1-2-700Bneu:** 5' CATCTCCTGC AAACCTCCAGC 3' ▲  
**TAP2-1-643Bneu:** 5' GCGCTCGCAA AGGCGTCTGG 3' ▲  
**1-2-347Bneu:** 5' GAGCAGTCCA GCGTTGTCAC C 3' ▲  
**TAP2/1-283B:** 5' GTCAGGCAGA GCAAGGGCAG A 3' ♣  
**TAP1-2220:** 5' CCATGAGCTG CAGGTGGGTG CCC 3' ▲  
**TAP2-2180:** 5' CCAAGTGAGC GTAGACATCC TGC 3' ▲

♣ : diese Primer wurden übernommen.

▲ : diese Primer wurden neu synthetisiert.

**Mutageneseprimer:**

**TAP1-FM1:** 5' GGACGATGCC ACCAGTACTC TGGATGCTGG CAACC 3'

**TAP1-BM1:** 5' GGTTGCCAGC ATCCAGAGTA CTGGCATCGT CC 3'

**TAP2-FM1:** 5' GGATGAGGCT ACCAGTACTC TGGACGCCGA GTGCG 3'

**TAP2-BM1:** 5' CGCACTCGGC GTCCAGAGTA CTGGTAGCCT CATCC 3'

**TAP1-c2F:** 5' GGACGATGCC ACCAGTGCCC TGGACGCCGA GTGCG 3'

**TAP1-c2B:** 5' CGCACTCGGC GTCCAGGGCA CTGGTGGCAT CGTCC 3'

**TAP2-c1F:** 5' GGATGAGGCT ACCAGTGCCC TGGATGCTGG CAACC 3'

**TAP2-c1B:** 5' GGTTGCCAGC ATCCAGGGCA CTGGTAGCCT CATCC 3'

**TAP-V2F:** 5' GGATGAGGCT ACCAGTGCTC TGGACGCCTA GTGCGAGCAG  
GC 3'

**TAP-V2B:** 5' AGGGCCTGCT CGCACTAGGC GTCCAGAGCA CTGGTAGCCT  
CAGCC 3'

**TAP-V1F:** 5' GGACGATGCC ACCAGTGCTC TGGATGCTTG AAACCAGCTA  
CGGGT 3'

**TAP-V1B:** 5' CCTGCTACGG TGGTCACGAG ACCTACGAAC TTTGGTCGAT  
GCCCA 3'

**NBD1-SW2F:**5' CGGACGGTTC TTCTGATCGC CCACCGGCTC AGCCTGGCAG  
AGCGG 3'

**NBD1-SW2B:**5' GCCTGCCAAG AAGACTAGCG GGTGGCCGAG TCGGACCGTC  
TCGCC 3'

**NBD2-SW1F:**5' AGGACGATGC TGGTCATTAC TCAGCAGCTG CACACGGTTC  
AGAAT 3'

**NBD2-SW1B:**5' TCCTGCTACG ACCAGTAATG AGTCGTCGAC GTGTGCCAAG  
TCTTA 3'

**NBD1L2f:** 5' CCGAGCTCGG TTCCGGTGGG CGACAAAGAC TGGATGACGG  
TCGACCAAGG GTCAAAG 3'

**NBD1L2b:** 5' GGCTCGAGCC AAGGCCACCC GCTGTTTCTG ACCTACTGCC  
AGCTGGTTCC CAGTTTC 3'

## 7. Bakterienstämme

### **Escherichia coli DH5 $\alpha$**

Genotype:  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), supE44, relA1, deoR,  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169

Erläuterungen der Genotypsymbole findet man in Bachmann (1990 und 1983) und Sambrook J. et al. (1989).

## 8. Zelllinien

**T1-Zellen:** entstanden durch Fusion einer T-Zelllinie (CEM) und einer B-Zelllinie (721.174). Sie exprimieren MHC-Klasse II-Moleküle von CEM und Klasse I-Moleküle beider parentaler Zellen (HLA-A2, -Bw4,-B5,-Bw6) (Foley et al. 1965, DeMars et al. 1984, Salter et al. 1985 ).

**T2-Zellen:** sind aus T1-Zellen durch Immunoselektion auf MHC Klasse I-Expressionsdefizienz hervorgegangen. T2-Zellen sind haploid für Chromosom 6, welches außerdem eine große Deletion im MHC Klasse II Region aufweist. Die Tap1 und Tap2 Gene, die normalerweise in dieser Region lokalisiert sind, sind damit auch deletiert. T2 exprimiert die MHC Klasse I-Allele HLA-A2 und HLA-B5 (Salter et al. 1985 ).

**T2-TAP-WT:** wurden durch stabile Transfektion von T2-Zellen mit cDNA für Ratten-TAP1<sup>a</sup> und -TAP2<sup>a</sup> hergestellt ( Momburg et al. 1992).

**HeLa Zellen:** sind mit Puromycin- und G418-Resistenzgenen transfiziert. Sie wurden von Dr. B. Ortmann zusätzlich mit Hygromycin-Resistenzgen transfiziert. Die HeLa-Zellen dienten als Futterzellen für frisch transfizierte T2-Zellen. Sie wurden freundlicherweise von Dr. Peter Cresswell zur Verfügung gestellt.

## 9. Antikörper

**D90:** Polyklonales Kaninchenantiserum, gerichtet gegen ein C-terminales Peptid von TAP1 (CYRSMVEALAAPSD) (Powis et al. 1991).

**116-5:** Polyklonales Kaninchenantiserum, gerichtet gegen ein C-terminales Peptid von TAP2 (EQDVYAHLVQQRLEA) (Momburg et al. 1992)

**Mac394:** Monoklonaler Mausantikörper gegen die Nukleotidbindedomäne von TAP2. Hergestellt im Babraham Institute, Cambridge, England; von Dr. Angela Seelig zur Verfügung gestellt (siehe dazu auch Frigge 1996). In dieser Arbeit konnte der Bereich, in dem

die Erkennungssequenz für Mac394 liegt, auf dem Sequenzbereich von Aminosäuren 494 bis 639 eingegrenzt werden (siehe Abschnitt IV.2.b.).

**1p4:** Polyklonales Kaninchenantiserum, gerichtet gegen ein intramolekulares Peptid (SEKIFEYLDRTPR) aus der vorhergesagten vierten zytosolischen Schleife von humanen TAP1. (freundlicherweise von Dr. Frank Momburg zur Verfügung gestellt).

**3B10.7:** Monoklonales Rattenantikörper, gerichtet gegen freie schwere Kette von humanen HLA-A und -B (Lutz et al. 1987).

**4E:** Konformationsspezifischer monoklonaler Mausantikörper, welcher ein Epitop von HLA-B und -C erkennt (Trapani et al. 1989).

**Anti-Calreticulin:** Polyklonales Kaninchenantiserum, gerichtet gegen ein C-terminales Peptid von humanen Calreticulin (CEEEDVPGQAKDEL) (StressGen, Biomol, Hamburg).

**Anti-Tapasin R.gp48N:** Polyklonales Kaninchenantiserum, gerichtet gegen ein N-terminales Peptid von humanem Tapasin (PAVIECWVVEDASGKGLAKC): Sequenz entspricht Aminosäuren 2 bis 20 (N-Terminal) (Sadasivan et al. 1996).

**Anti-ER60 (ER57):** Polyklonales Kaninchenantiserum, das die thiolabhängige Reduktase ER60 verschiedener Spezies erkennt (Otsu et al. 1995).

**HRP-konjugierter anti-Kaninchen bzw. anti-Ratte IgG:** Dianova, Hamburg.

**FITC-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus IgG (H+L):** Dianova, Hamburg.

**HRP-konjugierter anti-Maus IgG:** Sigma.

**Goat anti-mouse IgG:** Sigma

## 10. Peptide

**Se 8-Peptid: TVDNKTRYR:**

Eurogentec, Seraing, Belgien

## 11. Geräte

**Brutschränke:**

Heraeus instruments

**Brutschrank-Schüttler:**

inova™ 4300 incubator shaker: NEW

(für Bakterienkulturen)

BRUNSWICK SCIENTIFIC

**β-Counter:**

Beckman LS 5000TD, Fullerton, USA

**γ-Counter:**

LB 2108 Berthold, Wildbad

**Dounce Homogenisator:**

Wheaton, Millville, USA

**Elektroporator:**

Gene Pulser, Capacitance Extender, BioRad

<b>Entwicklermaschine :</b>	AGFA (Curix 60)
<b>FACScan:</b>	Becton Dickinson
<b>Geltrockner:</b>	Gel Dryer, Modell 583, BioRad
<b>HPLC:</b>	Smart, Pharmacia
<b>Phosphoimager:</b>	Raytest Isotopenmeßgeräte, Bas 1000, Fuji
<b>Quantifizierer von Westernblots:</b>	Joyce-Loebel-Chromoscan Densitometer
<b>Sterile Zellkulturarbeitsbank</b>	Heraeus Lamin Air <sup>R</sup> , LFM 2448s und HB 2448
<b>Zentrifugen:</b>	Biofuge 13, Heraeus sepatech Beckman L8-70 M Ultracentrifuge Optima <sup>TM</sup> TLX Ultracentrifuge, Beckman Sigma 201 M Sigma 3K10 Sigma 3K15

## 12. Software

<b>Alignments, Herstellung von Plasmidkarten etc.:</b>	Vektor NTI, Informax, Oxford
<b>FACScan-Auswertung:</b>	Cellquest, Becton Dickinson für
<b>Grafikprogramme:</b>	Canvas, Adobe Photoshop, PowerPoint
<b>Phosphoimager:</b>	TINA 2.08a, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
<b>Proteindatenbanken:</b>	Expasy Server, Schweiz

## 13. Einmalware

<b>Elektroporationsküvetten für eukaryotische Zellen (0,4cm):</b>	Gene Pulser Cuvette BioRad
<b>Filme:</b>	X-OMAT LS und AR, Kodak, Rochester, über Sigma bezogen
<b>Nitrozellulosemembran:</b>	Protran BA 85, Pore size 0,45 µm, Schleicher Und Schuell, über Sigma bezogen
<b>Zentrifugenröhrchen:15 und 50 ml:</b>	greiner bio-one CELLSTAR, über Labomedic bezogen.
<b>Zellkulturflaschen:</b>	Sarstedt, USA

<b>Loch-Platten:</b>	TPP, Switzerland
<b>Petrishalen für die Zellkultur:</b>	TPP, Switzerland
<b>Dunkelkammer-Glühlampe (15 W, 230 V, Typ E 27) :</b>	Philips, über Labomedic bezogen

## III. Methoden

### III.1. Methoden zur DNA-Analytik

#### 1. Medien

**LB-Medium:** 10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextract und 10g NaCl auf 1 L mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und autoklaviert.

Für Bakterienkultivierung mit Selektionsmarker wurden 100 µg Ampecillin / 1 ml LB-Medium eingesetzt.

**LB-Agarplatten:** 1 L LB-Medium wurden mit 15g Agar versetzt und autoklaviert.

Das Medium wurde auf unter 50°C gekühlt und Antibiotikum zugegeben (100 µg Ampecillin / 1 ml Medium). Die Platten wurden gegossen, bei RT getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert.

#### 2. Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Amplifikation der Inserts, die TAP-cDNA enthalten, wurden diese in Vektoren kloniert und anschließend in E.coli Bakterien mittels Transformation eingeführt. Als Vektoren dienten die Plasmide pBluescriptKSP (+) (Stratagene) und pHβApr1neo (Gunning et al. 1987). Der Vektor pHβApr1neo erlaubt die Expression von cDNA in Säugerzellen.

##### a. Ligation

Vektoren wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, so dass sie kompatible Enden zu den einzuklonierenden Inserts aufwiesen. Zur Vermeidung von Selbstligation der Vektorenden, wurden die 5'-Phosphatgruppen durch Behandlung mit alkalische Phosphatase abgespalten. Darüber hinaus wurde durch 5 minütige Inkubation (vor Zugabe von Enzym und Puffer), die Rezirkularisierung der Inserts und Vektoren inhibiert.

**Dephosphorylierung der Vektorenden:** ein großer Vorrat an dephosphoryliertem Vektor wurde angelegt:

Linearisierter Vektor: 5 µg  
Shrimp alkaline phosphatase (SAP) (1U/µl): 1,5 -2 µl  
10 x SAP-Puffer: 2 µl  
MgCl<sub>2</sub>: 0,8 µmol  
Bed. H<sub>2</sub>O: auf 20 µl auffüllen

Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Für optimale Dephosphorylierung wurden noch mal 1,5µl SAP zu dem Ansatz zugegeben und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die SAP durch Inkubation für 20 min. bei 65 °C inaktiviert.

### **Ligationsansatz:**

Linearisierter Vektor: 7- 20 ng  
Insert: 100-300 ng ( bis zu 50 fachen Überschuß)  
T4 DNA-Ligase-Puffer 10 x: 1:10 faches Verhältnis zum Gesamtvolumen  
T4 DNA-Ligase: 1 µl ( 1U / µl )  
Steriles H<sub>2</sub>O: auf 20 bis 50 µl auffüllen

Bei Fragmenten mit überhängenden Enden ist eine Inkubation für 1 Stunde bei RT ausreichend (bei Fragment-DNA mit 4-Basen-Überhang genügen 15-30 min.). Bei glatten Enden wurde für 4-18 Stunden bei 16°C inkubiert.

### **b. Herstellung kompetenter Bakterien**

( nach Hanahan, 1983)

Damit DNA in Bakterien eingeschleust werden kann, muß die Bakterienmembran durchlässig gemacht werden, man spricht hierbei von kompetenten Bakterien.

Die klassische Methode, Bakterien kompetent zu machen, funktioniert mit Calciumchlorid.

100 ml LB-Medium / 0,02M MgSO<sub>4</sub> / 0,1 M KCl wurde mit 1 ml einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C auf einem Schüttler bei 200 bis 300 Upm inkubiert, damit die Bakterien gut belüftet werden. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 wachsen gelassen (dies wurde nach ca. 3 Stunden erreicht, höhere Dichten führen zu einer geringeren Kompetenz der Bakterien). Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis bzw. im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

Die Bakterienkultur wurde auf Eis für ca. 20 min. gekühlt, dann für 5 min. bei 5400 g zentrifugiert und das Pellet in 30 ml kaltem ersten Transformationspuffer (TFB I) vorsichtig resuspendiert und 10 min. auf Eis inkubiert. Danach wurde nochmals für 5 min. bei 5400 g zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 4 ml kaltem zweiten Transformationspuffer (TFB II) resuspendiert. Aliquots von 100 µl wurden auf vorgekühlte autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Bakterien hatten eine durchschnittliche Transformationseffizienz von ca.  $10^6$ - $10^7$  transformierte Bakterien/µg-DNA.

**TFB I:** 30 mM Kaliumacetat  
50 mM  $\text{MnCl}_2$   
10 mM  $\text{CaCl}_2$   
100 mM  $\text{RbCl}$   
15 % Glycerin  
pH 5,8

**TFB II:** 10 mM Mops pH 7,5  
75 mM  $\text{CaCl}_2$   
100 mM  $\text{RbCl}$   
15 % Glycerin

### **c. Transformation**

Ein 100 µl-Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA vorsichtig gemischt. In der Regel wurde der ganze Ligations- oder PCR-Ansatz für die Transformation verwendet. Dann folgte eine Inkubation auf Eis für 20 bis 30 min., Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 40 bis 90 Sekunden (hierdurch wird die DNA in die Bakterien aufgenommen) und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Anschließend wurden 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf einen Überkopfröhrer für 1 bis 1,5 Stunden inkubiert.

Bakterien wurden bei 11300g für 1 min. abzentrifugiert, Überstand bis auf 200 µl abgenommen und die Bakterien vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Agarplatten mit Selektionsmarker ausplattiert und Übernacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### **d. Lagerung der Bakterien**

5 ml oder 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden 5 min. bei 3000-5000g abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml 10 mM  $\text{MgSO}_4$  (0,4 ml für die 1,5 ml Kultur) vorsichtig resuspendiert und 4 ml 80 % Glycerin (Glycerol) (bzw. 0,8 ml für die 1,5 ml Kultur)

zugegeben. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt, in vorgekühlte autoklavierte Gefäße aliquotiert (je 1-1,5 ml) und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **3. Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab: Mini-Präparation**

Zwei Methoden zur Plasmid-DNA-Präparation aus E.coli Bakterien wurden verwendet. Die alkalische Lyse lieferte sehr saubere DNA, war aber wegen der Phenol-Chloroform-Extraktion zeitaufwendiger (und nicht ganz ungefährlich). Diese Methode wurde deswegen nur dann verwendet, wenn es nötig war, reine DNA zu bekommen, zum Beispiel für Transfektion. Für Restriktionsanalyse wurde in der Regel die durch die schnelle Koch-Methode unsauber präparierte DNA eingesetzt.

#### **Alkalische Lyse:** ( modifiziert nach Sambrook et al. 1989 )

Mehrere Ansätze von je 3 ml LB-Medium mit Selektionsmarker (30  $\mu\text{l}$  wurden jeweils mit einer Bakterienkolonie angeimpft und auf einem Überkopffroller Übernacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden für 1 min. bei ca. 11300 g abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  Glukosepuffer resuspendiert. Durch den hypotonischen Schock, wurden die Zellwände der Bakterien aufgebrochen. Nach 5 min. Inkubation auf Eis wurden 100  $\mu\text{l}$  alkalische SDS-Lösung zugegeben und weitere 5 min. inkubiert. Das anionische Detergenz SDS löst die Membranen der Bakterien auf. NaOH denaturiert die DNA. Die vollständige Lyse ist an der leicht viskösen Konsistenz der Lösung zu erkennen. Durch die Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  Hochsalzpuffer und 5-10 min. Inkubation auf Eis wurden Proteine und bakterielle DNA präzipitiert. Die schwach saure Kaliumacetatlösung führt zur Renaturierung der DNA-Einzelstränge. Während die supercoils der Plasmid-DNA eine nahezu vollständige Renaturierung gewährleisten, wird die chromosomale DNA durch diese Behandlung quervernetzt und präzipitiert. Die Kaliumionen führen auch zur Ausfällung vom schwerlöslichen Kaliumdodecylsulfat, welches Proteine und Zellmembranbruchstücke mitpräzipitiert. Durch Zugabe von zwei Tropfen Chloroform kann das Kalium-SDS besser ausfallen. Während die Zelltrümmer, ausgefällte Proteine und bakterielle DNA durch die anschließende Zentrifugation bei 16000 g,  $4^{\circ}\text{C}$  für 15-30 min abzentrifugiert wurden, wurde die Plasmid-DNA im Überstand angereichert. Um eine proteinfreie DNA zu bekommen, wurde der Überstand einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen werden (Siehe III.1.6.). Die DNA wurde durch Zugabe von 2 x Vol. kaltem 100 % EtOH präzipitiert. Nach

Inkubation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 10-30 min. wurde die DNA bei  $4^{\circ}\text{C}$ , 16000 g für 20-30 min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde durch Zugabe von kaltem 70 % Ethanol und eine erneute Zentrifugation gewaschen. Durch den relativ hohen Wassergehalt des Ethanols wurden dadurch noch vorhandene Salzreste aus dem DNA-Pellet gelöst. Die niedrige Temperatur verhinderte zudem das Lösen der DNA. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet durch Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Das Pellet wurde in 30-50  $\mu\text{l}$  TE-Puffer /RNase (10-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) resuspendiert und 30-60 min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Glukosepuffer:** 25 mM Tris-HC, 10 mM EDTA, 50 mM Glukose

**T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>:** 10 mM Tris, 1 mM EDTA

**alkalische SDS-Lösung:** 1% SDS, 0,2 N NaOH (nach vier Wochen neu ansetzen!)

**Hochsalzpuffer:** 3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )

### **Koch-Methode:**

1,5 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur wurde für 1 min. bei 11300 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 210  $\mu\text{l}$  mp-mix mit 2  $\mu\text{l}$  RNase (10 mg/ml) resuspendiert und 10 min. auf Eis inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 15  $\mu\text{l}$  Lysozym (ca.200  $\mu\text{g}$ ) und weitere Inkubation für 10 min. auf Eis.

Die Proben wurden im kochenden Wasser für 1-2 min. inkubiert und dann für 15 min. bei 16000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und 1xVolumen Isopropanol zugegeben, gut gemischt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 10-30 min. inkubiert. Die DNA wurde anschlieschend für 20 min. bei 16000 g,  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % kaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschlieschend in 30 bis 50  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen.

**mp-mix (STET-Puffer):** 4 g Saccharose (sucrose), 5 ml 0,5 M EDTA, 0,25 ml Triton X-100, 2,5 ml 1M Tris-HCl pH 8,0. Auf 50 ml mit bedestiliertem Wasser auffüllen und bei  $4^{\circ}\text{C}$  lagern.

**RNase:** 10 mg/ml (bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 Min. inkubieren um DNase zu denaturieren, RNase ist bei dieser Temperatur resistent)

**Lysozym:** 10 mg/ml in TE

#### **4. Präparation von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab: Midi-Präparation**

##### **Alkalische Lyse**

50 ml LB-Medium mit Selektionsmarker wurden mit 1 ml einer Bakterienkultur (oder mit einer einzigen Bakterienkolonie) angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler bei 200 bis 300 Upm inkubiert. Die Bakteriesuspension wurde bei 5400 g für 5 min. abzentrifugiert. Zur Lyse der Zellwände wurde das Bakterienpellet in 3 ml Glucosepuffer resuspendiert und 10 min. auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 2 ml Lysozym-Lösung (20 mg / ml in 50 mM Tris-HCl pH 7,5) und weitere Inkubation auf Eis für 5-10 min. wurden die Zellwände vollständig zerstört. Zur Auflösung der Zellmembranen wurden 10 ml SDS-alkalische-Lösung zugegeben, vorsichtig gemischt und für weitere 10 min. auf Eis inkubiert. Zur Fällung der bakteriellen DNA und der Proteinen wurden 7,5 ml Hochsalzpuffer zugegeben, vorsichtig gemischt und 10 min. auf Eis inkubiert. Zum Pelletieren von Kalium-SDS konnte 100 µl Chloroform zugegeben werden. Es folgte eine 15-30 min. Zentrifugation bei 5400 g, 4°C. Wenn es nötig war, wurde der Überstand mit Hilfe einer Filtration durch Nylongaze gereinigt.

Nukleinsäuren (Plasmid-DNA und RNA) wurden durch Zugabe von 10 ml Isopropanol und 10 min. Inkubation auf Eis präzipitiert. Durch Zentrifugation bei 5400 g, 4°C für 15-30 min. wurden diese schließlich pelletiert und in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert. Die RNA wurde durch Zugabe von 2 ml 5 M LiCl und Inkubation für 20 min. auf Eis selektiv ausgefällt und bei weiterer Zentrifugation für 5 min bei 5400 g, 4°C. pelletiert. Um DNA auszufällen wurde der Überstand einer Ethanol-Fällung unterzogen (Zugabe von 2xVol. kaltem 100% Ethanol und Inkubation bei -20°C für 1 Stunde oder über Nacht). Die DNA wurde anschließend durch Zentrifugation für 30 min. bei 16000 g, 4°C abzentrifugiert. Um verbliebene RNA vollständig zu degradieren wurde das DNA-Pellet in 400 µl TE / RNase (10 µg /ml) resuspendiert und bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Alternativ wurde die RNase zu Beginn mit dem Glukosepuffer zugegeben. Um den Reinheitsgrad der DNA zu erhöhen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (siehe III.1.6.). Die DNA wurde ausgefällt, in dem die extrahierte wässrige obere Phase mit 0,1xVol. 3 M Na-Acetat pH 5,2 gut gemischt und mit 2,5xVol. 100% kaltem Ethanol versetzt wurde. Der Fällungsansatz wurde bei -20 °C für 1 Stunde oder über Nacht inkubiert.

Die gefällte DNA wurde schließlich durch Zentrifugation für 30 min. bei 16000 g, 4°C pelletiert und mit 70% kaltem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde getrocknet (z.B.

durch Inkubation bei 37°C für ca. 15 min.), in 200 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5 oder in Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

## **5. Fällern von DNA**

Das Prinzip der Ethanol-Fällung beruht darauf, die DNA, die in mindestens 100 µl Volumen aufgenommen werden soll, mit einem monovalenten (einfach geladenen Salz) zu versetzen und Alkohol zuzugeben. Als Salz wurde Natriumacetat oder Ammoniumacetat verwendet.

Natriumacetat wurde zu der DNA-Lösung in der Endkonzentration von 0,3 M zugegeben. Dazu wurde eine 3 M Na-Acetatlösung mit pH 4,8-5,2 verwendet. Alternativ wurde Ammoniumacetat in der Endkonzentration von 2-2,5 M verwendet. Nach gutem Mischen der DNA-Lösung mit dem Salz wurde 2,5 faches Volumen kaltes Ethanol zugegeben und auf Eis oder bei -20 °C für 15 bzw. 30-60 min. inkubiert. Die DNA wurde anschließend bei 16000 g, 4°C für 15-30 min. pelletiert. Der Überstand wurde entnommen und das DNA-Pellet mit 70 % kaltem Ethanol gewaschen, durch Inkubation bei 37 getrocknet und schließlich im gewünschten Puffer oder einfach im Wasser aufgenommen.

## **6. Reinigung von DNA**

Um die DNA von Proteinen zu reinigen wurde sie einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen.

DNA wurde in ein Volumen von mindestens 200 µl aufgenommen und mit 1xVol. Tris-gesättigten-Phenol versetzt, gut gemischt und bei 11300 g für 1-2 min. abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die DNA enthält, wurde vorsichtig und mit Vermeidung der proteinhaltigen Interphase entnommen. Zur Entfernung von Phenol- und Proteinresten wurde die DNA-Lösung mit einem Volumen Sevag ( 24:1 Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch) gut gemischt und erneut abzentrifugiert. Die DNA enthaltende obere Phase wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Es erfolgte eine DNA-Fällung und Fällung unterzogen (siehe Abschnitt III.1.5.).

## **7. Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA basiert auf ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Für die Lichtabsorption sind die Ringe der Basen verantwortlich. Die Absorption (**A**) bei 260

nm wird photometrisch in Quarzküvetten gemessen, da diese das UV-Licht nicht absorbieren. Die Quarzküvette besitzt 1 cm Schichtdicke. Eine Lösung, die **50 µg / ml** doppelsträngige DNA enthält, besitzt unter diesen Bedingungen einen Absorptionswert von 1 (sogenannte **Optische Dichte**). Dieser OD-Wert dient zur Bestimmung der Konzentration der unbekanntes DNA-Lösung (Lottspeich / Zorbas, 1998). Damit ergibt sich die folgende Gleichung zur Bestimmung der unbekanntes DNA-Menge (C):

$$C \text{ (ng / } \mu\text{l)} = A_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$C \text{ (nmol / } \mu\text{l)} = A_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} / M_w \cdot L$$

**L:** Länge in kb

**M<sub>w</sub>** :Molekulargewicht je Basenpaar (660g/mol)

Eine OD-Messung macht nur Sinn, wenn die DNA-Lösung RNA-frei ist.

Da Proteine das Licht bei 280 nm absorbieren, kann die Reinheit der DNA-Lösung durch die Bestimmung des Verhältnisses  $A_{260} / A_{280}$  abgeschätzt werden. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen  $A_{260} / A_{280}$  –Wert von 1,8. Ist die DNA-Lösung mit Proteinen oder Phenol kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner. Eine 50%ige Protein/DNA-Lösung besitzt ein Verhältnis  $A_{260} / A_{280}$  von ca. 1,5. ( Lottspeich / Zorbas, 1998).

Eine OD-Messung mit Hilfe des Photometers kann jedoch nur bei großen Mengen an DNA zuverlässige Werte liefern, da das Photometer nur in einem Bereich zwischen 0,05 und 1 OD wirklich zuverlässig ist. Wilfinger et al (1997) beobachteten ungenaue  $A_{260} / A_{280}$  –Werte in Abhängigkeit von pH und Salzgehalt des bei den Messungen verwendeten Wassers bzw. Puffers (Wilfinger et al. 1997). Sie empfehlen Messungen in einem 1-3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer pH 8,5 durchzuführen.

Alternativ wurde die DNA-Menge über die Fluoreszenz von gebundenem Ethidiumbromid bestimmt. Dieser Farbstoff interkaliert zwischen die DNA-Basen und fluoresziert, wenn man ihn mit ultraviolettem Licht bestrahlt. Ein optischer Vergleich der Fluoreszenz der untersuchten DNA mit der Probe einer Reihe von Standards (z.B. DNA-Leiter) erlaubte eine Konzentrationsabschätzung.

## 8. Endonukleolytische Spaltung von DNA

Zur Analyse von Plasmid-DNA oder zum Ausschneiden eines bestimmten DNA-Fragmentes, wurde die DNA einer endonukleolytisch Spaltung unterzogen. Der Restriktionsansatz wurde bei 37°C für mindestens eine Stunde inkubiert. Bei Restriktionsenzymen mit reduzierter

Aktivität wie Sca I oder Sal I wurde der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert, oder nach 2-3 Stunden Inkubation noch mal 1-5 Units Enzyms, je nach DNA-Menge, zugegeben und für weitere 1 bis 2 Stunden inkubiert.

Der Restriktionsansatz wurde für 1 bis 2 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Bei größeren DNA-Mengen, wurde das Volumen entsprechend erhöht und Inkubationsdauer verlängert (z.B. für 5 µg 30 µl und für 100 µg DNA 200 µl.)

Zusammensetzung des Verdauansatzes:

**DNA**

**Restriktionsenzym** ( ca. 2 bis 5 U pro µg DNA)

**10 X Puffer** des entsprechenden Enzyms (vom Hersteller mitgeliefert)

**(Wenn erforderlich: BSA)**

Mit **H<sub>2</sub>O** auf das gewünschte Volumen aufgefüllt

Die Restriktionsenzyme konnten durch anschließende Erhitzung auf 65°C für 20 min. inaktiviert werden.

Der Restriktionsverdau von PCR-Ansätze erfolgte durch Zugabe des Enzyms und Inkubation für mindestens 1,5 Stunden bei 37°C.

Die Analyse des Restriktionsansatzes erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der verdauten DNA auf einem Agarosegel (siehe Abschnitt III.1.9 und 10).

## **9. Agarosegele**

Um DNA-Fragmente von 0,5 bis 12 kb Länge zu trennen und zu identifizieren wurde die Agarosegel-Elektrophorese verwendet. Es wurde die Standardsagarose verwendet. Sie lässt sich in Konzentrationen von 0,5 bis 2 % verwenden.

Die verwendete Agarosekonzentration hängt von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmenten ab. Für die Auseinandertrennung von 2 großen Fragmenten im Bereich von 2000 Basenpaaren oder länger, die sich aber nur um ca. 200 bp oder weniger unterschieden, wurde eine hohe Agarosekonzentration von 1,4 bis 1,8 % gewählt. Sollte ein Fragment von ca. 500-10000 bp analysiert werden, so wurde eine Agarosekonzentration von 1 % gewählt. Für die Analyse von DNA-Fragmenten mit über 10 kb Länge wurde 0,7-0,8 % Agarosegel angesetzt.

Die Agarose wurde in das entsprechende Volumen 1xTAE-Puffer erhitzt anschließend 2 µl Ethidiumbromid (20 µg) pro 50 ml Gellösung zugegeben (0,4 µg EtBr / ml) (0,1 µg EtBr pro

ml reichen in der Regel aus, um Die DNA zu detektieren). Als Laufpuffer wurde 1xTAE verwendet.

EtBr ist lichtempfindlich und zerfällt im UV-Licht. Nicht verwendete EtBr-haltige Agaroselösung wurde bis zu zwei Wochen im Dunkeln aufbewahrt.

#### **50 x TAE:**

242 g Tris base

57,1 ml 100% Essigsäure (glacial acetic acid)

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Auf 1 Liter mit H<sub>2</sub>O auffüllen.

## **10. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen basiert darauf, dass Nukleinsäuren bei einem neutralen pH polyanionisch sind, das heißt, an ihren Phosphatgruppen im Phosphodiesterückgrat viele negative Ladungen tragen. Deshalb wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld auf die positive Elektrode zu. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist in einem Agarosegel als Molekularsieb antiproportional zum Logarithmus der Größe, kleinere DNA-Fragmente laufen schneller bzw. weiter als größere.

Durch die Interkalation von Ethidiumbromid wird die DNA unter UV-Licht sichtbar.

DNA-Proben wurden mit 10 x DNA-Probenpuffer versetzt und je nach verwendete Menge an Laufpuffer bei 40 bis 120 V aufgetrennt. Der DNA-Probenpuffer dient dazu, die Dichte der DNA-Lösung zu erhöhen, und damit deren Einpipettieren in die Geltaschen zu ermöglichen. Durch das Zufügen von Farbstoffen wie Bromphenolblau und Xylencyanol dem DNA-Probenpuffer lässt sich die DNA während des Gellaufs indirekt verfolgen, da diese Farbstoffe im Agarosegel wie DNA-Fragmente von ungefähr 2000, 500 bzw. 200 bp Länge migrieren (Mülhardt C. 2000). Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten DNA-Fragmenten wurde ein DNA-Größenmarker verwendet. Das Gel wurde mit Hilfe des Fotosystems Biometra Bio Doc II / NT fotografiert.

#### **10 x DNA-Probenpuffer:**

90 % Glycerin, 10 mM Tris, 50 mM EDTA, 0,01 % Bromphenolblau, 0,01 % Xylencyanol.

**kb-Marker: DNA-Größenmarker:** 500 µl Stocklösung mit 100 ng Leiter-DNA pro µl  
50 µg Leiter-DNA  
50 µl Puffer 4 von BioLabs: (50 mM K-Acetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg-Acetat,  
1mM DTT.)  
50 µl 10 x Probenpuffer  
Mit H<sub>2</sub>O auf 500 µl auffüllen

## 11. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach dem Trennen des gewünschten DNA-Fragmentes auf einem Agarosegel, wurde das kleine Gelstück, das dieses Fragment enthält, unter schwachem UV-Licht mit Hilfe eines Skalpellens herausgeschnitten. Das Ausschneiden erfolgte schnell, weil DNA sehr empfindlich auf UV-Licht reagiert. Mögliche Schäden, die das UV-Licht verursachen kann, sind Depurinierungen, Bildung von Basendimeren oder Strangbrüchen. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des Böhlinger High Pure PCR Product Purification Kit. Die Extraktion wurde nach Angaben des Kit-Protokolls durchgeführt.

## 12. Ortsgerichtete Mutagenese

(nach Stratagene, QuikChange<sup>TM</sup> Site directed mutagenesis Kit)

Um bestimmte Basen in einem doppelsträngigen DNA-Fragment gezielt auszutauschen, wurde die Ziel-DNA mit komplementären Primer, die in der Mitte die Mutation tragen, in vitro amplifiziert. Um den Anteil an mutierten Klonen zu erhöhen, wurde anschließend der Template-DNA-Strang zerstört.

Die Primer waren RP (reversed phase)-Kartusche-gereinigt und zwischen 30 und 55 bp lang. Sie besaßen einen Guanidin und Cytosin (G+C)-Anteil von 40 bis 70 % und endeten am 3'-Ende mit ein bis zwei G oder C, um eine bessere Bindung und Elongation zu erhalten. Ihre Schmelztemperatur lag ungefähr 10°C über der Synthesetemperatur von 68°C, um ausreichend hohe Annealingtemperatur zu erlauben, und damit unspezifische Hybridisierung zu vermeiden. Der Primer sollte nicht mehr als vier gleiche Basen nacheinander enthalten, um Fehlhybridisierung (frameshifts) zu vermeiden. Die Mutation soll in der Mitte des Primers liegen mit ca. 10 bis 15 korrekte Basen auf beiden Seiten.

Für die PCR wurde die Pfu-Polymerase verwendet. Die Pfu-Polymerase, isoliert aus *Pyrococcus furiosus*, besitzt eine hohe Temperaturstabilität (höher z.B. als Taq-Polymerase), ihre Halbwertszeit bei 95°C liegt bei ca. 12 Stunden, sie verfügt zusätzlich über eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die eine Korrekturaktivität erlaubt (Fehlerhäufigkeit liegt bei ca.  $10^{-6}$  je eingebauter Base). Ihre Amplifikationsprodukte besitzen deshalb keinen Basenüberhang wie Taq-generierte Produkte, sondern glatte Enden. Um den exonucleasebedingten Abbau von Primer durch Pfu auszugleichen, sollte höhere Primerkonzentration verwendet werden. Die Syntheserate von Pfu, die bei ca. 550 Nukleotiden pro Minute liegt, ist allerdings zu gering im Vergleich zu der Taq-Polymerase, die bis zu 2800 Nukleotide pro Minute synthetisiert. Diese geringe Syntheserate liegt an der geringen Prozessivität von Pfu (9 bis 12 Basen je Anlauf). Daher sollte eine hohe Enzymmenge eingesetzt werden. (Cline J et al.1996, Weiner MP et al. 1994, Mülhardt C., 2000).

Die Template DNA, die in dem E.coli Bakterienstamm DH5 $\alpha$  vermehrt wird, wird vom dam-Methylierungssystem im Sequenzkontext 5'-GATC-3' methyliert, das macht sie zum Angriffsziel der DpnI, das methylierte und hemimethylierte DNA erkennt und schneidet. Da die *in vitro* neu amplifizierte DNA unmethyliert ist, wird durch eine anschließende Inkubation des Mutagenese-PCR-Ansatzes mit DpnI, die nichtmutierte Template-DNA geschnitten, was zur Anreicherung der neu synthetisierten mutierten DNA führt. Zum PCR-Ansatz wurden 10-20 U DpnI zugegeben und für 1,5 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch anschließende Inkubation bei 65°C für 20 min. Danach wurde der gesamte PCR-Ansatzes in kompetente Bakterien transformiert (siehe Abschnitt III.2.c).

Zur Identifizierung der positiven Klone wurde die präparierte DNA sequenziert und/oder einem Restriktionsverdau unterzogen

**PCR-Ansatz für Mutagenese:**

Template DNA	10 bis 50 ng
Primer 5'-3'	200 ng
Primer 3'-5'	200 ng
10 x Pfu-Puffer	10 $\mu$ l
Nukleotidmix 10 mM (2,5 mM / Nukleotid)	1 $\mu$ l
Pfu-Polymerase	1-2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O autoklaviert	auf 50 $\mu$ l auffüllen.

**PCR-Bedingungen:**

1 Zyklus	95°C
16-17 Zyklen	95°C für 30 sec
55°C für	1 min.
68°C für	13 min. (ca. 2 min / kb-DNA-Länge)
1 Zyklus	72°C für 15 min.

**13. Sequenzierung**

Die DNA wurde nach Sanger ( Sanger et al., 1977 ) sequenziert. Diese Methode beruht auf dem Mechanismus der DNA-Synthese durch DNA-Polymerasen, wobei zu den eingesetzten Nukleotiden Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) zugesetzt werden. Wird bei der PCR-Reaktion ddNTP eingebaut, so wird die Strangverlängerung abgebrochen, da dem ddNTP die für die Bildung der nächsten Phosphodiesterbindung mit einem neuen Nukleotid notwendige 3'-Hydroxygruppe fehlt.

Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen wurde das Sequenzieren automatisiert. Der hier eingesetzte ABI PRISM Big Dye Terminator cycle Sequencing Ready reaction Kit enthält zusätzlich zu der DNA-Polymerase und den dNTP fluoreszenzmarkierte ddNTP, wobei jeder der vier ddNTP jeweils mit einer anderen Farbe versehen ist. Somit kann das am Ende eines synthetisierten Fragments liegende Nukleotid jeweils anhand der Farbe identifiziert werden.

Die eingesetzten Sequenzierprimer waren mindestens 20 bp lang.

**PCR-Ansatz für das Sequenzieren:**

DNA	0,5-1 µg
BD-Mix	2µl
Primer	5-10 pmol(100-200 ng)
H <sub>2</sub> Osteril	auf 10 µl auffüllen

**PCR-Bedingungen:**

1 Zyklus	96 °C	für 5 min.
16 Zyklen	96 °C	für 30 Sek.
	50 °C	für 15 Sek.
	60 °C	für 4 min.

### **Fällen der DNA:**

Der PCR-Ansatz wurde anschließend mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. 10 µl 3 M Na-Acetat wurden zugefügt, gemischt, dann mit 300 µl 100 % kaltes Ethanol versetzt und auf Eis für mindestens 15 min. oder bei -20 °C über Nacht inkubiert. DNA wurde bei 16000 g, 4°C (oder bei RT) für 15-30 min. abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet gewaschen und für ca. 10 min. bei 37°C getrocknet.

Das Pellet wurde in einem Standard-Probenpuffer (ABI, Weiterstadt), der Harnstoff enthält, aufgenommen, die DNA für 2 min. bei 90 °C denaturiert und auf ein Sequenziergel aufgetragen. Gellauf und Auswertung erfolgten auf einer ABI377 Sequenziermaschine.

## III.2. Methoden in der Zellkultur

### 1. Kultivierung von Säugerzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten T2-Zelllinien und HeLa-Zellen (siehe Materialien) wurden in IMD-Medium, dem 10 % fötales Kälberserum (FCS) und 1000 U Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden, kultiviert.

IMDM enthält unter anderem essentielle und nichtessentielle Aminosäuren, Vitamine und Phenolrot als pH-Indikator. FCS enthält Hormone und Wachstumsstoffe, die für die Stimulierung der Zellteilung notwendig sind. Das in FCS vorhandene Komplementsystem, wurde durch Inkubation bei 56°C für ca. 30 min. inaktiviert.

Die Antibiotika Penicillin und Streptomycin schützen die Zellen gegen Bakterienkontaminationen.

Zur Selektion stabil transfizierter Zellen wurde dem Medium zusätzlich G418 (Geneticin) in der Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Geneticin ist ein gegen Pilze, Hefe und Säugerzellen wirkendes Antibiotikum.

Die Zellkulturen wurden bei 37°C in einem Inkubationsschrank mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 10 % CO<sub>2</sub>-Anteil kultiviert.

**T2-Medium:** IMDM, 10 % FCS, 1000 U Penicillin/Streptomycin

**G418-Medium (100 %):** T2-Medium, 1 mg / ml G418

**10 x PBS:** 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: auf 1 Liter mit H<sub>2</sub>O auffüllen. Durch 1:10 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O wurde 1xPBS hergestellt.

### 2. Lagerung der Zellen

Die Zellen ( $1-8 \times 10^6$ ) wurden in kaltem FCS / 10 % DMSO aufgenommen, in spezielle Einfriergefäße überführt und für 15-30 auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C. Nach 2 Tagen wurden sie in Flüssigen Stickstoff (-180°C ) überführt. DMSO verhindert die Bildung Zellenschädigender Wasserkristalle.

Das Auftauen der Zellen erfolgte dagegen sehr schnell, um die toxische Wirkung von DMSO zu verhindern. Die Zellen wurden sofort auf 37°C erwärmt und mit vorgewärmtem

Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden sie in das entsprechende Kulturmedium überführt und bei 37°C kultiviert.

### **3. Nährzellen für die Transfektion**

HeLa-Zellen gehören zu einer epithelartigen Zelllinie. Die Zellen, die aus einem Zervix-Karzinom einer Patientin isoliert wurden, sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur etabliert wurde. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, **Henrietta Lacks**.

Transfizierte Zellen wurden in Anwesenheit von teilungsinhibierten HeLa-Zellen kultiviert. Die als Nährzellen dienende HeLa-Zellen liefern die nötigen Wachstumsfaktoren.

Die HeLa-Zellen wurden im selben Kultursmedium kultiviert, das später für die Selektion eingesetzt wurde.

Durch die stark ausgeprägten extrazellulären Proteine und Proteoglycane haften die HeLa-Zellen stark an Kunststoffoberflächen. Aus diesem Grund mussten sie zu ihrer Fütterung bzw. Überführung zuerst vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst werden. Trypsin ist ein hochaktives proteolytisches Enzym, das die Komponenten der extrazellulären Matrix abbaut. Die Zellen runden sich dadurch ab und lösen sich vom Boden.

Das Medium wurde abgenommen und die HeLa-Zellen durch Zugabe vom sterilen PBS und vorsichtiges Schwenken gewaschen. Anschließend wurde 1 x Trypsin (Gibco, in sterilem Wasser) zu den Zellen gegeben (5-10 ml, je nach Kulturflaschengröße) und ca. 5-10 min stehen lassen. Durch vorsichtiges Schwenken wurden die Zellen vollständig von der Wand gelöst. Durch Zugabe von 1 x Vol Kulturmedium wurde Trypsin inaktiviert (dem Medium zugesetztes FCS enthält Proteaseinhibitoren, die Trypsin rasch inaktivieren). Die abgelösten Zellen wurden abzentrifugiert und in frisches Kulturmedium überführt.

Für die Transfektion wurden die HeLa-Zellen auf 96-Loch-Platten ausplattiert. Sie wurden bis zur Subkonfluenz kultiviert, dann erfolgte die Behandlung mit dem hochgiftigen

Mitomycin C zur Inhibierung der Zellteilung. Das Medium wurde abgenommen und je 100 µl 20 µg /ml Mitomycin C in IMDM (ohne FCS oder Antibiotika, siehe unten) hinzugegeben. Anschließend wurden sie für 4-5 Stunden bei 37°C inkubiert. Mitomycin C interkaliert in doppelsträngiger DNA und kreuzvernetzt sie, so dass keine Replikation und damit keine Zellteilung mehr möglich sind. Nach der Inkubation wurde Mitomycin C abgenommen und die Zellen mit sterilem PBS zwei bis dreimal gewaschen, dann 200 µl G418-Medium

hinzugegeben und bei 37°C kultiviert. Nach Spätestens vier Tagen wurden die Nährzellen verwendet.

#### **Mitomycin C-Stammlösung (1 mg / ml):**

200 µl DMSO wurden mit einer Nadelspritze in die 2 g-Mitomycin C enthaltenden Flasche eingespritzt und gut gemischt (Mitomycin C löst sich besser in DMSO). Anschließend wurden 1,8 ml steriles PBS zugegeben und gut geschüttelt. Aus dieser Stammlösung wurden 20 µg /ml Mitomycin C in IMDM (ohne FCS oder Antibiotika) hergestellt.

### **4. Stabile Transfektion**

Die Transfektion wurde mittels Elektroporation durchgeführt.  $1 \times 10^7$  T2-Zellen (sollten die transfizierten Zellen ohne das Einsetzen von Nährzellen kultiviert werden, so wurden nur  $1-5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt) wurden einmal mit auf RT erwärmtem serumfreiem IMDM (ohne Antibiotika) gewaschen, anschließend in 800 µl frisches IMDM (RT warm) aufgenommen und in Elektroporationsküvetten (0,4 cm, BioRad) überführt. Für einfache Transfektion wurden 10 µg, für Doppeltransfektion jeweils 20 µg ScaI-linearisierter Expressionsvektor zu den Zellen gegeben und mit Pasteurpipette gut aber vorsichtig gemischt und bei RT für ca. 20 min. inkubiert. Anschließend wurde die Küvette in den Schlitten des Elektroporationsgeräts (Gen pulser, Capacitance Extender, BioRad) eingesetzt und die Zellen bei 270 mV und 500 µF elektroporiert. Der Widerstand der eingesetzten Zellsuspension, der durch die Zeitkonstante erfasst wird, betrug 7,5-9 Millisekunden (Die Zeitkonstante einer Reaktion entspricht jener Zeit in Millisekunden, die nach einem elektrischen Puls bis zum Abfall der Spannung auf 37% des ursprünglichen Wertes verstreicht, sie stellt ein Parameter für die Effizienz der Elektroporation dar). In der kurzen Pulsdauer ist die Membran für die DNA durchlässig. Nach ca. 10 minütiger Erholung bei RT wurden die Zellen in eine kollagenbeschichtete Petrischale überführt und in 10 ml T2-Medium (ohne Selektionsmarker) bei 37°C inkubiert.

### **5. Selektion stabiler Transfektanden**

Die Kultivierung der transfizierten Zellen erfolgte mit und ohne Nährzellen.

Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen aus den Petrischalen entnommen, abzentrifugiert und in 20 ml 50 % G418-Medium (0,5 mg / ml) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf die Löcher einer 96-Loch-Platte verteilt (je 200 µl).

Alternativ wurden die Zellen auf die vorbereitete 96-Loch-Platte mit den teilungsinhibierten HeLa-Zellen verteilt und auf jeweils ein Gesamtvolumen von 200 µl 50 % G418-Medium (0,5 mg / ml) pro Loch gebracht.

An den nächsten Tagen wurden die Zellen nach Bedarf gefüttert. Hierzu wurden 100 µl Medium vorsichtig abgenommen und frisches G418-Medium (1 mg / ml) zugegeben. Hierdurch wurde die Konzentration des Selektionsmarkers stufenweise gesteigert. Wuchsen die Zellen zu schnell, so wurden sie auf eine zweite 96-Loch-Platte verteilt. Nach spätestens einer Woche waren ca. 90 % der Zellen tot und die Fütterung war erst nach Sichtung der Klone wieder notwendig. Dies war in der Regel nach 3 – 4 Wochen.

Erst wenn ein Loch der 96-Loch-Platte vollständig mit Zellen bewachsen war, wurden ca. 70-80 % davon (ca. 150 µl) direkt in eine 24-Loch-Platte überführt. Nach ca. 2-4 Tagen wurden dann 50 % davon auf der selben Platte in benachbartes Loch gegeben. Nachdem Jeder Zellklon dicht gewachsen war, wurde der Inhalt eines Loches (ca.  $1 \cdot 10^6$ ) weggefroren und aus dem anderen Zelllysate (siehe III.3.1) für Western-Blot-Analyse (siehe III.3.9.) hergestellt. Bei Doppeltransfektanden wurden eine weitere Subklonierung durchgeführt. Hierzu wurden durchschnittlich 2-3 Zellen pro Loch auf eine 96-Loch-Platte verteilt und in G418-Medium bei 37 % inkubiert.

Alternativ wurden in einigen Fällen Einzeltransfektanden in Petrischalen kultiviert und nach 2 Tagen wurde das Medium auf 50 % G418-Konzentration (0,5 mg / ml) gebracht. Schrittweise wurde die G418-Konzentration auf 95 % gesteigert. Nach ca. 2 Wochen konnten die Zellen in eine Kulturflasche überführt und ihre Analyse durchgeführt werden. Bei schwacher TAP-Expression erfolgte eine Subklonierung zur Selektion stark exprimierender Klone.

Die Effizienz der Transfektionen war sehr unterschiedlich. In einigen Fällen konnten bis zu 60 Klone heranwachsen, sogar in Platten ohne Nährzellen. Andererseits wurden bei manchen Transfektionen nur ca. 5-10 Klone herangewachsen. Entsprechendes gilt auch für die Doppeltransfektanden. Bis zu 70 % der untersuchten Klone exprimierten beide Ketten. Bei anderen Doppeltransfektanden lag der Anteil bei 2-10 %.

**50 % G418-Medium:** T2-Medium, 0,5 mg / ml G418

### III.3. Methoden zur Proteinanalytik

#### 1. Zellaufschluß

Nachdem die Zellen ein- bis zweimal mit 1xPBS gewaschen wurden, erfolgte ihr Aufschluß durch Schockfrieren, hypotonischen Schock oder mit Hilfe von Detergenzien (hierbei wird ein sogenanntes Zelllysate hergestellt).

Bei der ersten Methode wurden die Zellen mit einer Konzentration von  $1 \times 10^7$ /ml in kaltem Puffer aufgenommen ( TBS/MgCl<sub>2</sub> oder 1xPBS ) und durch zweimaliges Schockfrieren in einem Ethanol/Trockeneis-Bad und Auftauen in einem Wasserbad bei RT aufgebrochen. Alternativ wurden die Zellen mit einer Konzentration von  $1 \times 10^7$ /ml in kaltes 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 resuspendiert und auf Eis für 10 min. inkubiert. Durch die niedrige Salzkonzentration (hypotonischer Druck) dringt Wasser in die Zellen ein und die Zellmembranen platzen, die meisten Organellen bleiben jedoch unversehrt, da 10 mM Tris einen ähnlichen osmotischen Druck wie das Innere der Organellen aufweist (Rehm H. 2000). Anschließend wurde die Zellsuspension in einem vorgekühlten Dounce-Homogenisator überführt und auf Eis durch 20-30 Stöße vollständig homogenisiert. Zellkerne und unlösliches Material wurden durch Zentrifugation bei 600-800 g, 4°C für 10 min. abzentrifugiert.

Bei der dritten Methode wurden die Zellen lysiert, indem sie in kaltem Lyse-Puffer aufgenommen (1 % Triton X-100 oder 1 % Digitonin ) und 30 min. auf Eis inkubiert wurden. Bei dieser Methode wird nicht nur die Zellmembran aufgeschlossen, sondern es findet auch eine Solubilisierung der inneren Membranen statt. Für  $1 \times 10^6$  Zellen wurden jeweils 100 µl Lyse-Puffer eingesetzt. Unlösliches Material wurde bei 11000-16000 g, bei 4°C für 10 min. abzentrifugiert.

Der Überstand (das Zelllysate) wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

**10 mM Tris-HCl, pH 7,4 und Protease-Inhibitore-Cocktail:** 1 Tablette Complete™ Mini Protease Inhibitor (von Roche) /10 ml Lösung.

**Lyse-Puffer:**

1 % Triton X-100 in 1xPBS

1 % Digitonin in 1xPBS

**10 x PBS:** 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: auf 1 Liter mit H<sub>2</sub>O auffüllen. Durch 1:10 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O wurde 1xPBS hergestellt.

**TBS/MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4 (HCl):**

40 mM Tris pH 7,4 (HCl), 150 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> oder 5 mM MgCl<sub>2</sub>

## **2. Rohmembranenpräparation**

Zellen wurden durch Schockfrieren oder hypotonischen Schock aufgebrochen und homogenisiert. Kerne und unlösliches Material wurden bei 600-800 g, 4°C für 10 min. abzentrifugiert (siehe Abschnitt III.3.1.). Der Überstand wurde in ein allomeres ultrazentrifugefestes Gefäß (von der Firma Beckman) überführt und die Membranen bei 100000 g, 4°C für 30 min. abzentrifugiert. Die Membranen wurden solubilisiert, indem das Pellet mit einer Konzentration von  $1 \times 10^{-7}$ /ml in Lysepuffer aufgenommen, gut resuspendiert und für 30 min. auf Eis inkubiert wurde (siehe Abschnitt III.3.3.). Unlösliches Material wurde bei 11000-16000 g, 4°C für 10 min. abzentrifugiert.

## **3. Solubilisieren von Membranproteinen**

Um Membranproteine zu untersuchen, werden sie zuerst in Lösung gebracht. Integrale Membranproteine lösen sich in Seifen (Detergenzien). Seifen sind molekulare Zwitter, sie bestehen aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil. der hydrophobe Teil besteht aus Phenylderivaten (wie bei Triton X-100), aliphatischen Ketten oder Steriodgerüsten (wie bei Chaps, Digitonin). Den hydrophilen Seifenteil bilden ionisierte Gruppen (z.B. bei Chaps und SDS), Zucker (Digitonin), Hydroxylgruppen oder Polyethylenoxide (Triton X-100) (Rehm H. 2000). Detergenzmoleküle bilden Mizellen. Die hydrophoben Seitenketten liegen im Inneren der Mizellen, sie verdrängen teilweise die Phospholipide und lagern sich an die hydrophoben Transmembranbereiche der Proteine an. Die hydrophilen Reste wechselwirken mit dem wässrigen Außenmedium. Lagern sich genügend Seifenmoleküle an, geht das Membranprotein in Lösung (Roth et al. 1989).

Da sich die Detergenzien mit ihren hydrophoben Seitenketten ans Protein anlagern, nehmen sie Einfluß auf die Konformation des solubilisierten Proteins. Detergenzien mit nichtionischen hydrophilen Resten wie Digitonin sind milde zum Membranprotein, und sind generell weniger denaturierend als ionische Detergenzien. Sie sind daher besonderes gut für die Isolierung von funktionell intakten Proteinkomplexen geeignet (Lottspeich / Zorbas, 1998).

Die Auswahl des verwendeten Detergenz hängt von der Art der Untersuchung ab, die durchgeführt werden sollte.

**Digitonin** bewahrt die Integrität des TAP-Ladekomplexes (Ortmann et al., 1994; Sadasivan et al., 1996) und wurde deshalb für die Untersuchung des MHC-Komplexes verwendet.

Zur Untersuchung des Assoziationsverhalten der TAP-Untereinheiten wurde **Triton X-100** verwendet.

Für Bindeassays an Nukleotidagarosen wurden die Membranen mit 2 % **Chaps** oder 1 % Triton X-100 in TBS/MgCl<sub>2</sub> solubilisiert.

Für 8-Azido-ATP-crosslink wurde 1 % Triton X-100 oder 2 % Chaps in einem geeigneten Puffer eingesetzt (siehe Abschnitt III.3.16).

Die Detergenzien wurden in den folgenden Konzentrationen verwendet:

**1 % Digitonin-Lösung in 1xPBS**

**1 % Triton X-100 in 1xPBS oder in TBS/MgCl<sub>2</sub>.**

**2 % Chaps in 1xPBS oder in TBS/MgCl<sub>2</sub>.**

**Für 8-Azido-ATP-crosslink wurde 1 % Triton X-100 oder 2 % Chaps in ATP-Bindepuffer** (50 mM Hepes (pH 7,5), 150 mM Kaliumacetat, 5 mM Mg-Acetat, 250 mM Saccharose, 1 mM DTT, 2 mM EGTA, Protease inhibitor ( 1 Tablette pro 20-50 ml) (siehe Abschnitt III.3.16.).

In der Regel wurden Membranen von ca.  $1 \times 10^7$  Zellen in jeweils 100 bis 200 µl resuspendiert und für 30 min. auf Eis inkubiert. Nichtlösliches Material wurde bei ca. 11000-16000g, 4°C für 30 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Verwendung in ein neues Gefäß überführt.

#### **4. Mikrosomenpräparation**

(nach van Endert et al. 1994, modifiziert von Angela Seelig 1998)

Die Zellorganellen wie Zellkerne, Mitochondrien, Lysosomen oder ER-Vesikel (Mikrosomen) unterscheiden sich in ihrer Größe und sedimentieren deshalb bei der Zentrifugation mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Auch ihr spezifisches Gewicht ist nicht gleich, so dass sie in einem Dichtegradienten in unterschiedlicher Höhe schwimmen (Lehninger / Nelson / Cox, 1994). Die Rohfraktion des Cytoplasmainshalts, die man nach Aufschließen der Zellen und Abzentrifugieren der Kerne bekommt, wird einer isopyknischen Zentrifugation unterzogen. Bei dieser Methode füllt man ein Zentrifugenröhrchen mit einer Lösung, in der Regel Saccharose, deren Dichte von unten nach oben abnimmt. Zur

Herstellung solcher Gradienten verwendet man z.B. eine Saccharoselösung mit abnehmender Konzentration. Bringt man den Cytoplasmgehalt in so einen Dichtegradienten und zentrifugiert bei hoher Geschwindigkeit, wandern die einzelnen Organellen zu dem Gradienten, das ihre Dichte entspricht.

Mikrosomen wurden präpariert, um Untersuchungen an dem Membranprotein TAP in seiner natürlichen Umgebung, in der das Protein seine native Konformation beibehält, durchführen zu können (zum Beispiel für Peptidbindeassay).

#### Protokoll zur Mikrosomenpräparation: (alle Schritte auf Eis)

$1-2 \times 10^8$  Zellen wurden zweimal mit 1xPBS gewaschen, in 10 ml kaltem 10 mM Tris, pH 7,4 resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert (siehe dazu Abschnitt III.3.1.). Die nun aufgequollenen Zellen wurden in einem vorgekühlten Dounce-Homogenisator überführt und auf Eis durch 20-30 Stöße vollständig homogenisiert. Zellkerne und unlösliches Material wurden bei 600-800 g, 4°C für 10 min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml 10 mM Tris (mit Protease Inhibitor) resuspendiert, homogenisiert, 5 min. auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Überstände wurden vereinigt und 5 ml 1,3 M Saccharosepuffer zugegeben, gut gemischt und erneut bei 600-800 g, 4°C für 10 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in Sorval Gefäß überführt und bei 68588 g (20000 rpm), 4°C für 2 Stunden in SW 41 Rotor pelletiert. Das Pellet wurde in 800 µl 0,25 M Saccharosepuffer resuspendiert, homogenisiert und in 15 ml Gefäß überführt. 5,6 ml 2,5 M Saccharosepuffer wurden zugegeben und 30 min. bei 4°C auf einen Überkopfröhrer inkubiert. Die gut gemischte 2,5 M Saccharosepuffer-Suspension wurde vorsichtig in der Reihe nach mit 2,9 ml 2 M Saccharosepuffer, 2,9 ml 1,3 M Saccharosepuffer und schließlich mit ca. 800 µl 0,25 M Saccharosepuffer (zum Titrieren konnte dieses Volumen leicht verändert werden) überschichtet. Mikrosomen wurden in diesem Saccharose-Gradienten bei 107170 g (25000 rpm), 4°C für 12-16 Stunden in einem SW41TI-Rotor (Beckman) (es wurde die L8-70 M Ultracentrifuge von Beckman benutzt) getrennt. Die rauhen ER-Vesikel, in der Fraktion zwischen 2 M und 1,3 M Saccharoschichten, wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen (glatte ER-Vesikel befanden sich in der Fraktion zwischen 1,3 und 0,25 M Saccharoschichten) und mit 1xVol 20 mM Hepes-Puffer resuspendiert. Der Ansatz wurde homogenisiert und bei 68588 g (20000 rpm), 4°C für 1 Stunde in SW 41 Rotor pelletiert. Das Mikrosomenpellet wurde in 200 µl 20 mM Hepes-Puffer resuspendiert und anschließend homogenisiert. Für Westernblotanalyse wurden 10 µl davon entnommen und mit 10 µl 1%

Triton X-100/PBS solubilisiert. Der Rest aliquotiert (30-50  $\mu$ l - Aliquots ). Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Proteinmenge wurde durch BCA-Test bestimmt (siehe III.3.5.).

Für weitere Untersuchungen wurden die Mikrosomen langsam auf Eis aufgetaut.

**10 mM Tris-HCl, pH 7,4 mit Protease-Inhibitore-Cocktail** (von Roche) (1 Tablette Complete<sup>TM</sup> Mini Protease Inhibitor /10 ml Lösung).

**20 mM Hepes-Puffer:** 20 mM Hepes (pH 7,5), 25 mM Kaliumacetat (KOAc), 5 mM Mg-Acetat ( $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ ), 1 mM DTT, Protease Inhibitor ( 1 Tablette pro 50 ml)

**Saccharose-Puffer :** die entsprechende Molarität in 20 mM Hepes-Puffer

**1 M DTT-Stocks** bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von Membranproteinen wurde der BCA-Test verwendet. Der Test wurde nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Ca. 1  $\mu\text{g}$  der zu untersuchenden Proteinprobe wurde mit einem geeigneten Puffer (in der Regel 1x PBS ) auf 500  $\mu$ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l der BCA-Lösung (Working Reagent) und einstündiger Inkubation bei  $60^{\circ}\text{C}$  (nach 30 min. sieht man schon Verfärbung ) wurden die Proben auf RT gekühlt. Anschließend erfolgte Messung der Absorption bei 562 nm in einem UV/Vis-Spektrometer. Als Leerwert diente eine Mischung aus 500  $\mu$ l des verwendeten Puffers und 500  $\mu$ l BCA-Lösung.

Für die Ermittlung der Eichgeraden wurden 0,5 / 1 / 2,5 / 5 /10 und 20  $\mu\text{g}$  / ml BSA-Standards verwendet. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

## 6. Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgele

( nach Laemmli 1970 )

Die Gel-Elektrophorese dient der Analyse von Proteinmischungen und ermöglicht schnelle Molekulargewichtsbestimmungen.

Die meisten Proteine binden das anionische Detergenz SDS, es entstehen Micellen mit konstanter negativer Ladung (Eigenladung von Proteinen werden von SDS überdeckt) pro Masseneinheit: 1,4 g SDS pro g Protein in 1 % SDS-Lösung. SDS löst die Tertiär- und

Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle auf. Durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden die Schwefelbrücken zwischen Cysteinen aufgespaltet. Dadurch wird erreicht, dass die Proteine nach ihrer Länge getrennt werden. Die SDS-bedingte starke negative Ladung veranlasst die Wanderung der Proteine in einem elektrischen Feld zur Anode.

Es wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet. Zwei Gele mit unterschiedlichen pH-Werten werden übereinandergeschichtet. Ein weitmaschiges Sammelgel, das zur Konzentrierung der Proteine dient, überschichtet das engmaschige Trenngel, in dem die Proteine schließlich getrennt werden. Je nach der aufzutragenden Menge an Proteinproben, wurden 0,8 mm, 1 mm oder 1,5 mm dicke Gele verwendet ( je höher die Menge, desto dicker das Gel ).

Die Proteinproben wurden mit 2 x Probenpuffer, das 7 %  $\beta$ -Mercaptoethanol enthielt, versetzt und für mindestens 5 min. bei RT geschüttelt. Zur Analyse von dem Transmembranprotein TAP folgte eine Inkubation für 3-10 min. bei 65°C. Andere Proteine (z.B. MHC-Moleküle) konnten auch bei 95°C inkubiert werden. Die Proben wurden auf ein 7,5 oder 10 % Gel aufgetragen und bei RT und einer konstanten Stromstärke von 40 mA aufgetrennt. Bis zum Erreichen des Trenngels wurde jedoch eine Stromstärke von 20 mA eingesetzt. Dadurch wurden die Banden schön und gleichmäßig getrennt. Die Auftrennung konnte auch über Nacht bei 4°C und 4-6 mA erfolgen.

Da TAP-Untereinheiten fast gleich groß sind, konnte eine bessere und scharfe Trennung dadurch erreicht werden, daß die Proben mit Harnstoffhaltigen 2 x Probenpuffer ( UREA-Probenpuffer) versetzt und in 7,5 % Gel aufgetrennt wurden.

**Sammelgel ( 4 % Acrylamid ) 300 ml Stock:**

39 ml 30 % (w / v) Acrylamid, 0,8 % (w / v) N, N'-Methylenbisacrylamid

75 ml **0,5 M** Tris-HCl, **pH 6,8**

auf 300 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

Lagerung bei 4°C

Für ein großes Gel wurden 10 ml entnommen und mit 0,1 % SDS versetzt. Für die Katalyse der Polymerisation wurden 15  $\mu$ l TEMED eingesetzt. Durch Zugabe von 50  $\mu$ l 10 % APS wurde die Polymerisierung gestartet. Für ein kleines Gel wurden 3 ml Sammelgel verwendet.

**Trenngel ( 7,5 % Acrylamid ) 300 ml Stock:**

75 ml 30 % (w / v) Acrylamid, 0,8 % (w / v) N, N'-Methylenbisacrylamid

75 ml **1,5 M** Tris-HCl, **pH 8,8**

auf 300 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

Lagerung bei 4°C

Für ein großes Gel wurden 20 ml entnommen und mit 0,1 % SDS versetzt. Die Polymerisation erfolgte nach Zugabe von 30 µl TEMED und 90 µl 10 % APS. Für ein kleines Gel wurden 5 ml Trenngel verwendet.

**Trenngel ( 10 % Acrylamid ) 300 ml Stock:**

100 ml 30 % (w / v) Acrylamid, 0,8 % (w / v) N, N'-Methylenbisacrylamid

75 ml **1,5 M** Tris-HCl, **pH 8,8**

auf 300 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

**10 x Elektrophorese-Laufpuffer ( E-Puffer ):**

25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS

z.B. 150 g Tris, 750 g Glycin auf 5 L mit H<sub>2</sub>O auffüllen und 0,1 % SDS zugeben.

**2 x Proben puffer:**

10 ml 10 % SDS, 10 ml 100 % Glycerol, 12,5 ml 0,5 M Tris (pH 6,8 ), 17,5 ml H<sub>2</sub>O, einige Kristalle Bromphenolblau.

7 % β-Mercaptoethanol wurden zugegeben, wenn Proteine reduziert werden sollen.

**UREA-Probenpuffer:**

30 % 6 M Harnstoff in 0,5 M Tris, pH 6,8

70 % 2 x Probenpuffer, 7 % β-Mercaptoethanol

## **7. Fixierung und Färbung von Proteinen im Gel**

Die Proteine können im SDS-Gel durch Ethanol / Essigsäure / Wasser-Mischung fixiert werden. Gibt man zu diesem Gemisch ein Färbemittel wie Coomassie zu, so werden die Proteinbanden sichtbar.

Das Gel wurde in eine Fixierer-Coomassie-Lösung für 15-30 min. bei RT geschwenket. Die Entfärbung erfolgte durch Schwenken des Gels in eine Entfärbelösung bei RT für mindestens 45 min. bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden. Die Entfärbelösung wurde hierbei 1 bis 2 mal gewechselt. Anschließend wurde das Gel auf Whatmanpapier bei 80°C für 2 Stunden unter Vakuum getrocknet

**Fixierer.Coomassie-Lösung:** 1 g Coomassie Brilliant Blue, 500 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 400 ml H<sub>2</sub>O.

**Entfärbelösung:** 50 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 40 % H<sub>2</sub>O.

## 8. Autoradiographie von Polyacrylamidgele

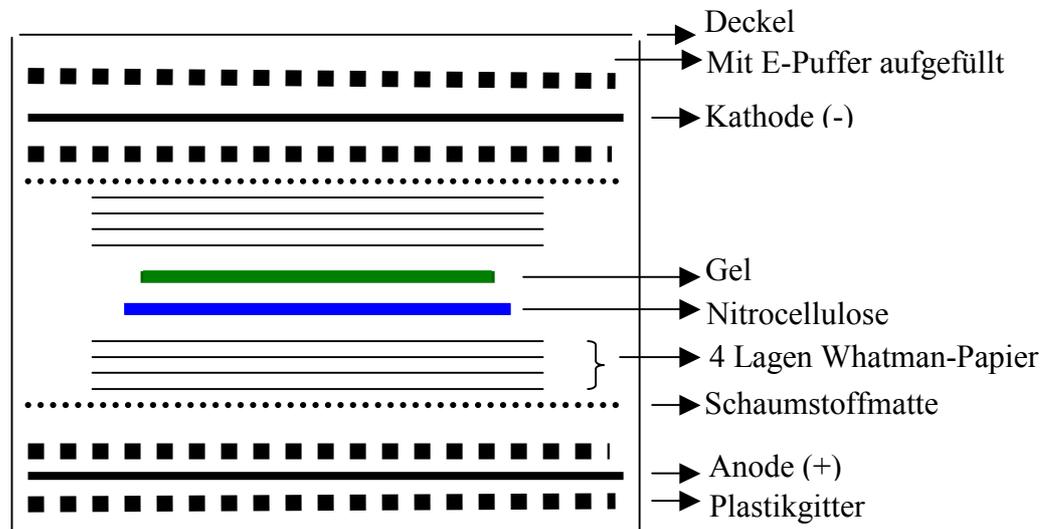
Die aufgetrennten radioaktiv markierten Proteine wurden fixiert und gefärbt. Das Gel wurde anschließend entfärbt und auf Whatmanpapier getrocknet (siehe Abschnitt III.3.7.). Zur Analyse der radioaktiv markierten Proteine, wurde das getrocknete Gel mit einem Phosphoimager belegt und für 2-10 Tage im Dunkeln bei RT exponiert. Der Phosphoimager wurde vor dem Gebrauch für mindestens 10 min. belichtet. Die Auswertung der emittierten Strahlung erfolgte auf einem Phosphoimager Scanner (Raytest Isotopenmessgeräte, Bas 1000, Fuji ) mit Hilfe des Programms TINA 2.08a. Die Gele konnten anschließend auf einem Röntgenfilm (X-OMAT AR von Kodak) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 2 bis 30 Tage im Dunkeln exponiert werden. Um die Exponierung zu verstärken wurde einen Intensivierschirm (reflection<sup>TM</sup> intensifying screen) auf dem Film aufgelegt. Der Intensivierschirm ist ein fluoreszierender Schirm, der die hochenergetische  $\gamma$ - und  $\beta$ -Strahlung in Licht umwandelt. Dieses Licht reflektiert auf den Film und schwärzt ihn (Rehm H. 2000). Die  $-80^{\circ}\text{C}$ -Kälte verstärkt das Signal.

## 9. Westernblotanalyse

Um Proteine, die in einem SDS-Gel aufgetrennt wurden, mit Antikörpern zu detektieren, wurden sie auf eine  $0,45\ \mu\text{m}$  Nitrocellulose Membran (von Schleier und Schüll) übertragen. In einem elektrischen Feld, wandern die durch SDS-Anlagerung negativ geladene Proteine in Richtung Anode. Legt man nun die Nitrocellulose Membran zwischen Gel und Anode, so werden die Proteine auf die Membran transferiert. Der Aufbau der Blot-Apparatur ist in der Abbildung III.3.1 wiedergegeben. Das Blotten fand mit E-Puffer (ohne SDS) bei einer Stromstärke von 0,5 A und Spannung von 9 V für 60 bis 90 min. statt (Blotting-Dauer hängt von der Dicke des Gels ab. Bei kleinen Gelen wurde 1 Stunde geblottet). Die Qualität des Blots wurde mit der Poncaefärbung überprüft ( siehe Abschnitt III.3.10.). Anschließend wurde der Blot geblockt und mit Antikörpern immungefärbt ( siehe nächste Abschnitte). Der Blot konnte alternativ getrocknet und bei RT monatelang aufbewahrt werden. Nach Rehydrierung mit z.B. 1xPBS oder E-Puffer konnte die Membran für Protein- oder Immunfärbung wieder verwendet werden.

**E-Puffer:** 150 g Tris, 750 g Glycin auf 5 L mit H<sub>2</sub>O auffüllen.

### Aufbau der Blot-Apparatur:



**Abbildung III.3.1:** ( siehe auch Text) Schaumstoffmatten und Whatmanpapier werden zuerst gut in E-Puffer getränkt und die Luftblasen entfernt. Dann wird die Membran aufgelegt und mit E-Puffer überdeckt. Das Gel wird auf die Membran gelegt, ohne daß Luftblasen zwischen Membran und Gel entstehen. Überschuß an Puffer erlaubt das Verschieben des leicht schwimmenden Gels. Auf das Gel kommen wieder 4 Lagen Whatmannpapier. Entstehende Luftblasen werden mit Hilfe eines Rollers entfernt. Auf das Papier folgt die vorher gut getränkte Schaumstoffmatte. Anschließend wird mit 1 x E-Puffer aufgefüllt. Schließlich kommen in der Reihe nach, Gitter Kathode und wieder Gitter. Nach Ansetzen des Deckels ist die Blotapparatur für den Elektrotransfer fertig.

## 10. Proteinfärbung auf Blots

Bei Proteinmengen größer als 50 ng / Bande ist die Ponceaurotfärbung gut einsetzbar ( Rehm H. 2000). Sie ist empfindlicher als die Coomassiefärbung des Gels wäre. Die Färbung ist reversibel und beeinträchtigt nicht das anschließende Blocken und die Immunfärbung.

Der Blot wurde für 5 Sekunden bis 2 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O wurde der Blot entfärbt.

**Ponceaurot-Färbelösung:** (Die Lösung ist mehrmals verwendbar)

Ponceau S-Konzentrat bestehend aus 2 % Ponceau S, 30 % Trichloressigsäure und 30 % Sulfosalicylsäure ( Sigma Diagnostics ) wurde 1:10 mit Wasser gemischt.

## 11. Blocken

Vor der Inkubation des Blots mit Antikörpern, wurden die restlichen freien Proteinsbindungsstellen der Blotmembran abgesättigt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Als Blockmittel wurde Milchpulver kombiniert mit Tween 20 eingesetzt. Da Tween 20 Antikörper vom Blot lösen kann, wurde es in einer geringen Konzentration verwendet. Der Blot wurde mit Blockpuffer über Nacht bei 4°C oder für 1-2 Stunden bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert (das Blocken konnte auch für 2 Tage bei 4°C durchgeführt werden).

### **Blockpuffer:**

In 1xPBS: 5 % Milchpulver, 0,1 % Tween 20

## 12. Immunfärbung auf Blots

Proteine die auf die Membran transferiert wurden, lassen sich mit Antikörpern anfärben. Dazu wurden 2 Antikörper eingesetzt. Der erste Antikörper bindet an das gesuchte Protein. Der zweite Antikörper ist mit einer Peroxidase markiert und bindet an den 1. Antikörper. Die Position des gesuchten Proteins kann mit Hilfe der Markierung des 2. Antikörpers sichtbar gemacht werden, denn die Peroxidase katalysiert in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemilumineszenz aus. Legt man nun einen Röntgenfilm auf den Blot, so wird dort belichtet, wo die Antikörper gebunden haben. Nach dem Entwickeln des Films, zeigen diese belichteten Stellen eine Schwärzung.

Nach dem Blocken des Blots mit Blockpuffer, wurde einmal mit 1xPBS für 10 min. gewaschen, dann mit dem 1. Antikörper bei RT für 45-60 min. unter leichtem Scwenken inkubiert (alternativ konnte die Inkubation über Nacht bei 4°C durchgeführt werden).

Nichtspezifisch gebundener Antikörper wurde durch drei- bis viermaliges Waschen mit 0,1 % Tween 20-Waschpuffer für je 15 bis 20 Minuten entfernt. Dieser Waschvorgang ist sehr wichtig, um den Hintergrund zu reduzieren. Es folgte die Inkubation mit dem 2. markierten Antikörper bei RT für 45-60 Minuten unter leichtem Scwenken (der 2. Antikörper soll nicht länger als 90 min. inkubiert werden, da es sonst zu einer starken Hintergrundfärbung führt). Nichtspezifisch gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 0,3 % Tween 20-Waschpuffer für je 15 bis 20 Minuten entfernt. Nach dem Waschen wurde der Blot kurz mit 1xPBS gewaschen, um Tween 20 zu entfernen und

anschließend für 30 bis 60 Sekunden mit der Detektionslösung (ECL: Enhanced Chemie Luminiscence) inkubiert (um Hintergrundfärbung zu vermeiden soll die Membran während der Inkubation nicht mehr bewegt werden). Nach dem Antrocknen auf Whatmanpapier wurde der Blot mit Klarsichtfolie abgedeckt und in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm (Kodak scientific imaging Film, X-OMAT™, LS) für 1-60 Sekunden belegt (die Belegungsdauer hängt von der Stärke der Signale und die Qualität der Antikörper ab). Die Entwicklung des Films erfolgte mit Hilfe der Curix 60, AGFA Entwicklermaschine (Entwickler: G158, Fixierer: G354 von AGFA).

Für die Detektion von TAP1 und TAP2 konnte der Blot mit dem Antikörper gegen TAP2 inkubiert werden und nach zwei- bis dreimaliges Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper gegen TAP1. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem 2. markierten Antikörper, der beide TAP-Antikörper erkennt.

Schließlich konnte der Blot mehrmals mit verschiedenen Antikörpern gefärbt werden: Nach der Filmentwicklung wurden der 1. und der 2. Antikörper entweder mit 100 mM Glycin-HCl pH 1,8 oder mit 3 M Natriumthiocyanat, 0,5 % Mercapthoethanol, 0,05 % Tween 20 pH 9,5 wieder abgewaschen, geblockt und mit anderen Antikörpern gefärbt.

**0,1% Tween 20-Waschpuffer:**

1xPBS, 0,1 % Tween 20

**Antikörper-Lösung:**

1xPBS, 0,1 % Tween 20, 10 % FCS, Antikörper

Antikörper-Verdünnungen:

1. Antikörper:

D90 (Anti-TAP1)	1:3000
116-5 (Anti-TAP2)	1:3000
Anti-Calreticulin	1:2000
Rgp48N (Anti-Tapasin)	1:50-1:100
Anti-ER60	1:2000
3B10.7 (Anti-MHC-I)	1:200
Mac394 (Anti-TAP2)	1:500

**0,3% Tween-Waschpuffer:**

1xPBS, 0,1 % Tween 20

2. Antikörper:

goat anti-rabbit IgG-HRP	1:3000
rabbit anti-rat IgG-HRP	1:3000
goat anti-mouse IgG-HRP	1:3000

Die AK-Lösung, soweit keine Milchreste vorhanden sind, konnte mehrmals verwendet werden. Die Anlagerung erfolgte bei 4°C mit 0,01 bis 0,05 % frisches Azid.

Es wurde hitzeinaktiviertes FCS verwendet.

### **Detektionslösung (ECL):**

Kurz vor dem Gebrauch wurden die Detektionslösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt und auf der Membranoberfläche gleichmäßig verteilt (Schütteln vermeiden)

benötigte Reagenzien:

**Luminollösung:** 250 mM Luminol (3-Aminophthalhydrazide bei Fluka) in DMSO

z.B: 0,44 g Luminol wurden in 10 ml DMSO aufgenommen (ca. 250mM) und in 1 ml Aliquots bei -20°C gefroren (dunkelgehalten).

**p-Cumarsäurelösung:** (p-Coumaric acid Luminol; bei Fluka): 90 mM in DMSO

0,15 g p-Cumarsäure wurden in 10 ml DMSO (90 mM) aufgenommen und 440 µl Aliquots bei -20°C gefroren.

**1M Tris-HCl pH 8,5** wurde steril filtriert.

**30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** (Wasserstoffperoxid, Hydrogenperoxide)

**Detektionslösung 1:** dunkel halten bei 4°C

70 ml H<sub>2</sub>O (autoklaviertes Seralwasser)

10 ml 1M Tris-HCl pH 8,5

1 ml Luminol (1 Aliquot, siehe oben: benötigte Reagenzien)

0,44 ml p-Cumarsäure (1 Aliquot, siehe oben)

auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

**Detektionslösung 2:** bei 4°C halten

70 ml H<sub>2</sub>O (autoklaviertes Seralwasser)

10 ml 1M Tris-HCl pH 8,5

60 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen.

## **13. Immunpräzipitation**

Zur Isolierung bestimmter Proteine oder zur Bestimmung der Interaktionspartner eines bekannten Proteins wurde die Immunpräzipitation verwendet.

Der gegen das Protein gerichtete Antikörper wurde zuerst an Protein-A-Sepharose gekoppelt. Protein A aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* ist ein 42 kDa großes Protein, das an die Fc-Region vieler Immunglobuline bindet. Die Antigenbindungsstelle des Antikörpers bleibt dabei frei.

1,5 g Protein A-Sepharose (Pharmacia) wurden in 50 ml PBS aufgenommen und durch Inkubation bei 4°C auf einem Überkopffroller für einige Stunden (mindestens 4 Stunden) aufgequellt. Die Sepharose wurde anschließend mit PBS 3-5 mal gewaschen und 1:1 in PBS aufgenommen, 0,1 % NaN<sub>3</sub> zugegeben (Protein-A-Sepharose-Suspension) und bei 4°C gelagert.

Pro Ansatz wurden 60 µl der Protein-A-Sepharose-Suspension verwendet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde sie mit 5-6 µl Antikörper (pro Ansatz) in einem kleinen Volumen von 400-1000 µl PBS für mindestens 1 Stunde bei 4°C auf einem Überkopffroller inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose bei ca. 11000g für 1 min. abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Antikörper-Protein-A-Sepharose konnte bei 4°C für 1 Woche gelagert werden.

Monoklonale Antikörper, wie im Falle von monoklonalen Maus-Antikörpern (wie Mac394), binden oft schlecht an Protein A (Rehm H. 2000). In diesem Fall wurde zuerst anti-Maus IgG an die Sepharose gekoppelt. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit monoklonalem Maus-Antikörper. Pro Ansatz wurden 5 µl einer 0,8 mg/ml anti-Maus IgG Lösung verwendet.

Um eine Elution des Antikörpers durch SDS zu verhindern, wurden Antikörper über ihre Fc-Domäne mit Hilfe des Kreuzvernetzlers Dimethylpimelimidat (DMP) kovalent an die Protein-A-Sepharose gekoppelt (siehe dazu Schneider et al 1982). Ca. 100 µl Protein-A-Sepharose-Suspension wurden pro Ansatz verwendet. Nach dem Koppeln des Antikörpers (siehe oben), wurde die Sepharose zweimal mit PBS dann mit 0,2 M Boratpuffer (pH 9,0) gewaschen. Anschließend erfolgte die Kreuzvernetzungsreaktion durch Inkubation der Sepharose mit 10 x Vol 0,2 M Boratpuffer (pH 9,0) / 20 mM DMP (frisch angesetzt) auf einen Überkopffroller bei RT für 30 min. Die Sepharose wurde abzentrifugiert und zweimal mit 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) gewaschen und anschließend mit dem Ethanolamin für zwei Stunden bei RT auf einem Überkopffroller inkubiert. Hierdurch wurde nichtabreagiertes DMP abgewaschen bzw. abgesättigt. Die Sepharose wurde dann einmal mit PBS gewaschen. Nicht kovalent gebundene Antikörper wurden durch zweimal kurzes Waschen mit 100 mM Glycin (pH 3,0) entfernt. Zum Schluß wurde die Sepharose dreimal mit PBS gewaschen. Die Lagerung erfolgte in PBS / 0,01 % NaN<sub>3</sub> bei 4°C.

Zur Untersuchung des MHC-Ladekomplexes wurde Digitoninlysat (1% Digitonin in 1xPBS) von mindestens 1x10<sup>7</sup> Zellen für die Immunpräzipitation verwendet. Zur Untersuchung der TAP-Dimerisierung wurde Triton X-100-Lysat (1% Triton) von mindestens 2x10<sup>6</sup> Zellen eingesetzt.

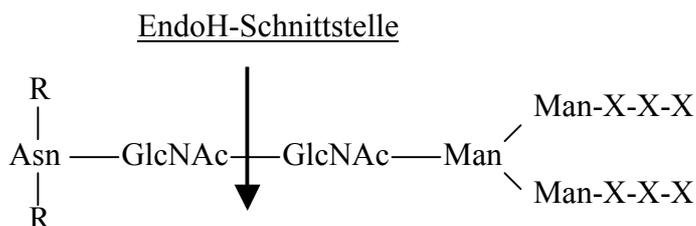
Das Lysat wurde auf die AK-Protein A-Sepharose gegeben, auf 400 µl mit PBS aufgefüllt und bei 4°C für mindestens 1 Stunde auf einem Überkopfröhrer inkubiert. Nicht spezifisch gebundene Proteine wurden durch fünfmaliges Waschen mit 0,1 % Digitonin oder 1% Triton entfernt. Gebundene Proteine wurden durch Zugabe von 60 µl 100 mM Tris-HCl (pH 9) oder 2 x Probenpuffer / 7% Mercaptoethanol zu dem Sepharosepellet und 15 min. Schütteln bei RT eluiert. Zum Tris-HCl-Eluat wurden 30 µl 2 x Probenpuffer / 7% Mercaptoethanol zugegeben. Proteine wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion von Calreticulin wurde das Eluat in 2 x Probenpuffer ohne Mercaptoethanol aufgenommen, um die Keratin-Artefaktbanden zu vermeiden, die unter reduzierenden Bedingungen auf der Höhe von Calreticulin laufen.

### 0,2 M Boratpuffer:

0,2 M H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>, pH 9,0 (NaOH).

## 14. Deglykosylierung von Glykoproteinen

Glykoproteine besitzen eine Zuckerseitenkette an ihrer Polypeptidkette, die ihnen während der Synthese oder direkt danach im ER angehängt wird. N-glykosylierten Proteinen (z.B. MHC-schwere Kette) werden Zuckerseitenketten (N-Glykane) am Asparagin eines **Asn-X-Thr/Ser** Sequenzmotivs (X beliebige Aminosäure) angehängt. Gelangen diese Glykoproteine zum Golgi-Apparat, wie im Falle von MHC-I-Moleküle nach ihrer Peptidbeladung, so werden ihre Zuckerreste von Golgi-Enzymen modifiziert. Mit Hilfe von Endoglykosidase H (Endo-N-acetyl-β-glucosaminidase H, Endo H), ein aus *Streptomyces plicatus* gewonnenes Enzym, das nur die endständige Chitobiose-Einheit in nicht modifizierten N-glykosidisch gebundenen Zuckerketten spaltet, kann zwischen ER- und post-ER-residenten Proteinen unterschieden werden. Die Deglykosylierung des Proteins kann im SDS-Gel über die Abnahme seines Molekulargewichts überprüft werden.



**Darstellung der Schnittstelle von Endo-H** (R: Rest der Polypeptidkette)

Der größte Teil der in T2-Zellen exprimierten MHC-Klasse I-Moleküle kann nur nach erfolgreicher TAP-abhängigen Peptidbeladung das ER verlassen, somit sind Endo-H-resistente MHC-Moleküle ein indirekter Beweis für die Aktivität des Peptidtransporters TAP. Endoglykosidase H schneidet am besten an denaturierten und reduzierten Proteinen und besitzt ein pH-Optimum von 5-6 (Rehm 2000).

10 µl Triton X-100-Zellysats (aus  $1 \times 10^6$  Zellen) wurden mit 20 µl Endo H-Inkubationspuffer für ca. 30 min. bei RT auf einem Schüttler vorinkubiert (dadurch werden die Proteine denaturiert und reduziert). Anschließend wurden 5-7,5 mU Endo H zugegeben und bei 37°C für 12-16 Stunden inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der nur Endo H-Inkubationspuffer enthielt.

Die Proben wurden anschließend mit 15 µl 2 x Probenpuffer versetzt, ca. 15 min. bei RT geschüttelt und ca. 8 min. bei 65°C (oder 95°C) inkubiert.

Die Proteine wurden auf 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Blotten wurde das Laufverhalten der MHC-I-Moleküle durch Immunofärbung mit dem monoklonalen Antikörper (3B10.7) bestimmt. Wegen ihres reduzierten Molekulargewichts laufen Endo H-sensitive Moleküle im SDS-Gel weiter als EndoH-resistente.

#### **Endo H-Inkubationspuffer:**

50 mM Natriumcitrat, pH 5,5 (HCl)

0,1 M β-Mercapthoethanol

0,01 % SDS.

## **15. Nukleotidbindeassay**

Zur Untersuchung der Affinität von TAP zu Nukleotiden, wurden Membranen aus den entsprechenden Zelllinien isoliert und mit an Agarose gekoppelten ADP bzw. ATP inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden die gebundenen Proteinen eluiert und einer Western Blot-Analyse unterzogen.

Pro Ansatz wurde jeweils 7 mg Nukleotidagarose (ATP war über das N6 des Adenins an der Agarose gekoppelt, Sigma) eingesetzt. Die Agarose wurde in 1 ml kaltem TBS/MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4) oder Wasser aufgenommen und für ca. 1 Stunde bei 4°C auf einem Überkopffroller zum Aufquellen gebracht. Anschließend wurde sie dreimal gewaschen.

Pro Nukleotidbindeansatz wurden Membranen aus  $1 \times 10^7$ -Zellen in 220 µl 2 % Chaps oder 1 % Triton X-100 in TBS/MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4) lysiert (siehe III.3.2. und 3.). Für Westernblotanalyse

wurden 20 µl entnommen. Die restlichen 200 µl wurden auf die Agarose zugegeben und 45-60 min. bei 4°C auf einem Überkopffroller inkubiert. Nicht spezifisch gebundene Proteine wurden durch sechsmaliges Waschen mit 1 ml 2 % Chaps in TBS/MgCl<sub>2</sub> oder 1 % Triton X-100 in TBS/MgCl<sub>2</sub> entfernt. Alle Arbeiten fanden im Kühlraum bei 4°C statt oder auf Eis. Gebundene Proteine wurden durch Zugabe von 50 µl 2 x Probenpuffer / 7% Mercaptoethanol und 15 minütiges Schütteln bei RT eluiert.

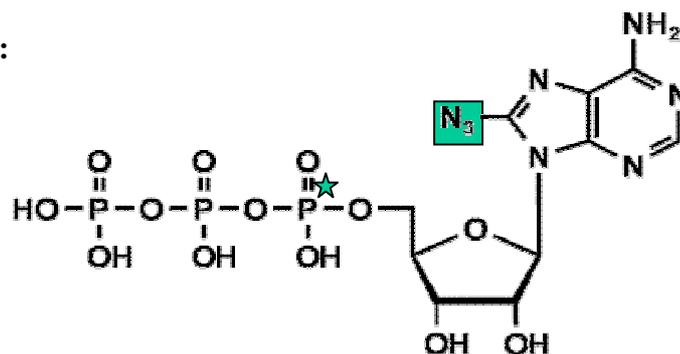
Alternativ wurde durch Zugabe von 50 µl 5 mM ATP eluiert (unter leichtem Schütteln bei 4°C für ca. 15.30 min.). Zum Überstand wurden 25 µl 2 x Probenpuffer / 7% Mercaptoethanol zugegeben. Es erfolgten SDS-PAGE und Western Blot-Analyse.

## 16. 8-Azido-ATP Kreuzvernetzung

Beim 8-Azido-ATP ist eine Azidogruppe (N<sub>3</sub>) kovalent an das C8 des Adenins gebunden. Durch UV-Strahlung wird sie aktiviert und bindet kovalent an Moleküle der näheren Umgebung, in der Regel Moleküle, die das 8-Azido-ATP gebunden haben. Die Detektion solcher Moleküle, die mit dem ATP kreuzvernetzt wurden, erfolgt, in dem eine Phosphatgruppe des ATP radioaktiv markiert ist. Trennt man die behandelten Proteine auf einem SDS-Gel, so lässt sich durch die Autoradiographie feststellen, ob das untersuchte Protein ATP gebunden hat.

In dieser Arbeit wurde ein α-markiertes 8-Azido ATP eingesetzt:

**8-Azido ATP, [α-<sup>32</sup>P]:**



Membranen von je 1x10<sup>7</sup>-Zellen wurden in 100 µl 1% Triton X-100 in ATP-Bindepuffer resuspendiert und durch Inkubation auf Eis für 30 min. solubilisiert. Nichtlösliches Material wurde durch Zentrifugation für 10 bei 12000 g, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die ATP-Kreuzvernetzung eingesetzt. Das Experiment fand unter Rotlicht statt.

Die Membranen wurden auf eine vorgekühlte 96-Loch-Platte auf Eis überführt. 10 µCi 8-Azido-[α-<sup>32</sup>P]-ATP (Lichtempfindlich!), wurden zugegeben und mit einer 12-Kanalpipette

alle Proben gut gemischt und auf Eis für ca. 15 min. inkubiert. Anschließend erfolgte die Kreuzvernetzung durch Bestrahlung mit einer 365 nm UV-Lampe für 10 min. Die Proben wurden mit ATP-Bindpuffer/1% Triton X-100 auf 400 µl aufgefüllt und direkt für die Immunpräzipitation eingesetzt (siehe III.3.13.). Das Waschen nach der Präzipitation erfolgte mit 1% Triton X-100 in TBS/MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4). Anschließend wurden die präzipitierten Proteine mit 50 µl UREA-Probenpuffer eluiert und in einem 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine autoradiographische Analyse (siehe III.3.8.).

#### **ATP-Bindpuffer:**

50 mM Hepes (pH 7,5), 150 mM Kaliumacetat, 5 mM Mg-Acetat, 250 mM Saccharose, 1 mM DTT, 2 mM EGTA, 1 Tablette Protease Inhibitor pro 20-50 ml.

## **17. Aufreinigung von Peptiden**

Die Rohprodukte aus der Peptidsynthese wurden mit Hilfe der Umkehrphasen-Chromatographie (reversed-phase-Chromatographie, RPC) an einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Anlage (High pressure liquid chromatography, HPLC) (SMART-System, Pharmacia) gereinigt. Bei der RPC findet eine hydrophobe Wechselwirkung des Analyten (hier die Peptide) mit der unpolaren stationären Phase (Füllmaterial der chromatographischen Säule: Kieselgel) im polaren, wässrigen Lösungsmittel (mobile Phase) statt. Mit Hilfe der HPLC-Anlage wird die Trennsäule unter erhöhtem Druck von der mobilen Phase durchströmt, dies führt zu schnellerem Trennen der Analytenkomponenten und zum besseren Auflösungsvermögen. Die Elution erfolgt mit Hilfe eines unpolaren organischen Lösungsmittels, das mit dem adsorbierten Molekül (hier das zu reinigende Peptid) um die Bindungsstelle konkurriert (Lottspeich, Zorbach 1998). Als organisches Lösungsmittel wurde Acetonitril verwendet, wegen seiner physikalischen Eigenschaften wie Viskosität und UV-Durchlässigkeit bis ca. 200 nm (die UV-Absorption der Peptidbindung besitzt ihr Maximum bei 195 nm). Für Reinigung kleiner Peptidmengen (< 0,5 mg) wurde die analytische Säule (µRPCC2/C18 SC 2.1/10, Pharmacia) verwendet. Große Peptidmengen (> 0,5 mg) wurden mit Hilfe der präparativen µRPCC2/C18 SC 3.1/10-reversed-phase-Säule, Pharmacia, durchgeführt.

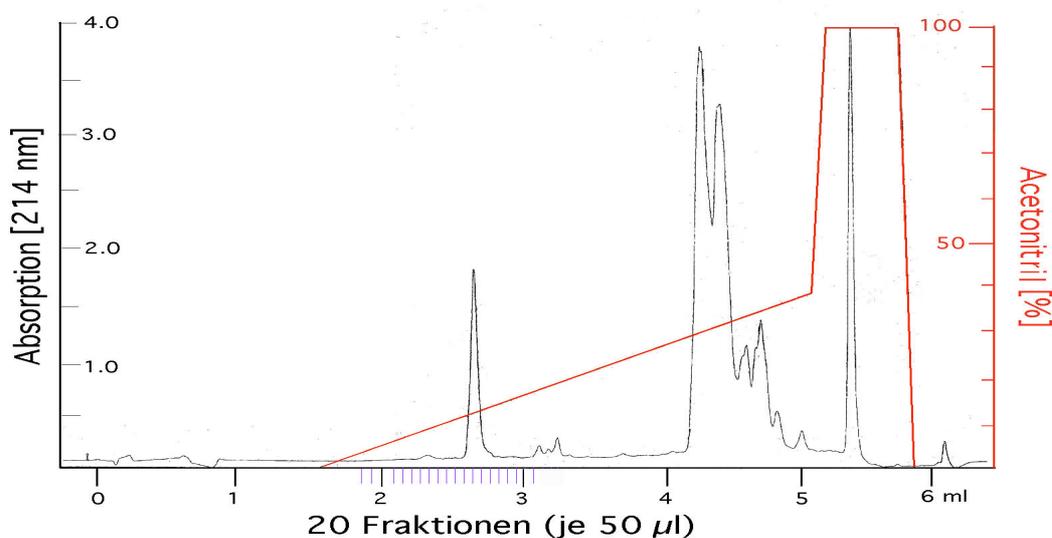
Das lyophilisierte S8-Peptid (TVDNKTRYR) wurde in einer Konzentration von 1mg/ml in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 aufgenommen und daraus eine 1:1 Verdünnung mit 0,2 % TFA (Trifluoressigsäure) in H<sub>2</sub>O hergestellt. Unlösliches Peptid wurde bei ca. 13000 g für 30

min., 4°C abzentrifugiert. Alle in der HPLC eingesetzten Lösungen wurden vor Gebrauch entgast und filtriert. Die Säule und die Injektionsschleife wurden mit dem Laufpuffer A (0,1 % TFA / H<sub>2</sub>O), dann mit dem Elutionspuffer B (0,1 % TFA / Acetonitril ) bei 100 µl /min (für die präparative µRPCC2/C18 SC 3.1/10-Säule ) oder bei 50 µl/min (für analytische Säule µRPCC2/C18 SC 2.1/10) gewaschen und anschließend mit dem Puffer A äquilibriert. 500 µl (präparative Säule) bzw. 100 µl (analytische Säule) der Peptidlösung wurden injiziert und die Trennung mit Laufpuffer A gestartet. Die Elution gebundener Peptide erfolgte in einem Acetonitrilgradienten (0,1 % TCA in H<sub>2</sub>O, 0-40 % Acetonitril). Die peptidhaltenden Fraktionen wurden durch den Elutionsprofil ermittelt. Dazu wurde das von Dr. A. Seelig (unveröffentlicht) bestimmte S8-Elutionsprofil als Standard verwendet. Die S8-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuumtrockner abgezogen und die Peptide in einem kleinen Volumen 100 mM Phosphatpuffer (30-50 µl) aufgenommen. Durch den Vergleich mit einem Referenz-Peptid bekannter Konzentration wurde in einem analytischen Lauf, in dem das Integral der jeweiligen Absorption bei 214 nm verglichen wurden, die Konzentration des gereinigten Peptids bestimmt. Die Peptidkonzentration wurde mit 100 mM Phosphatpuffer auf 1 mM eingestellt. Die Peptidlösung wurde bei –20°C gelagert. Die Säulen wurden mit 20 % Ethanol gespült und in dem Ethanol luftdicht bei 4°C gelagert.

#### 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4:

77,4 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22,6 ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 1 L mit H<sub>2</sub>O auffüllen.

A.



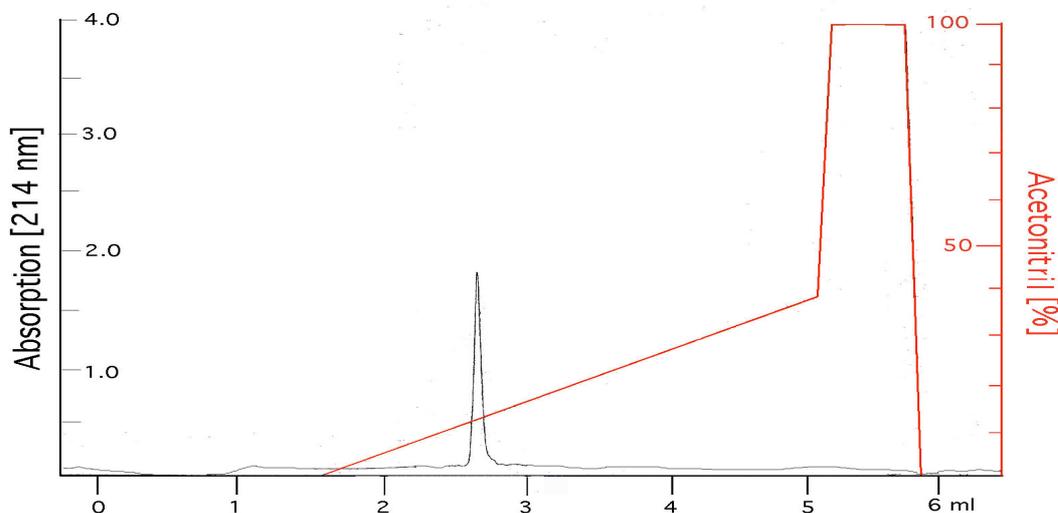
### Abbildung III.3.2.: Elutionsprofil des Peptids S8 in einem Acetonitrilgradienten.

Eine 1 mg/ml Rohpeptidlösung wurde 1:1 mit 0,2 % TFA / H<sub>2</sub>O verdünnt und 500 µl (präparative Säule) davon auf die µRPC2/C18 SC 3.1/10-reversed-phase-Säule geladen und aufgetrennt. Gebundene Peptide wurden in einem Acetonitrilgradienten (0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O, 0-40 % Acetonitril) (rote Linie) eluiert und in 50 µl -Fraktionen gesammelt.

**A.** Das Profil (schwarze Linie) zeigt die Absorption der Elution bei 214 nm. S8-Peptid eluiert unter diesen Bedingungen bei 2,7 ml (Fraktionen als blaue Striche markiert) (A. Seelig, unveröffentlicht). Diese Fraktionen wurden vereinigt, vakuumgetrocknet und in 30-50 µl 100 mM Phosphatpuffer aufgenommen.

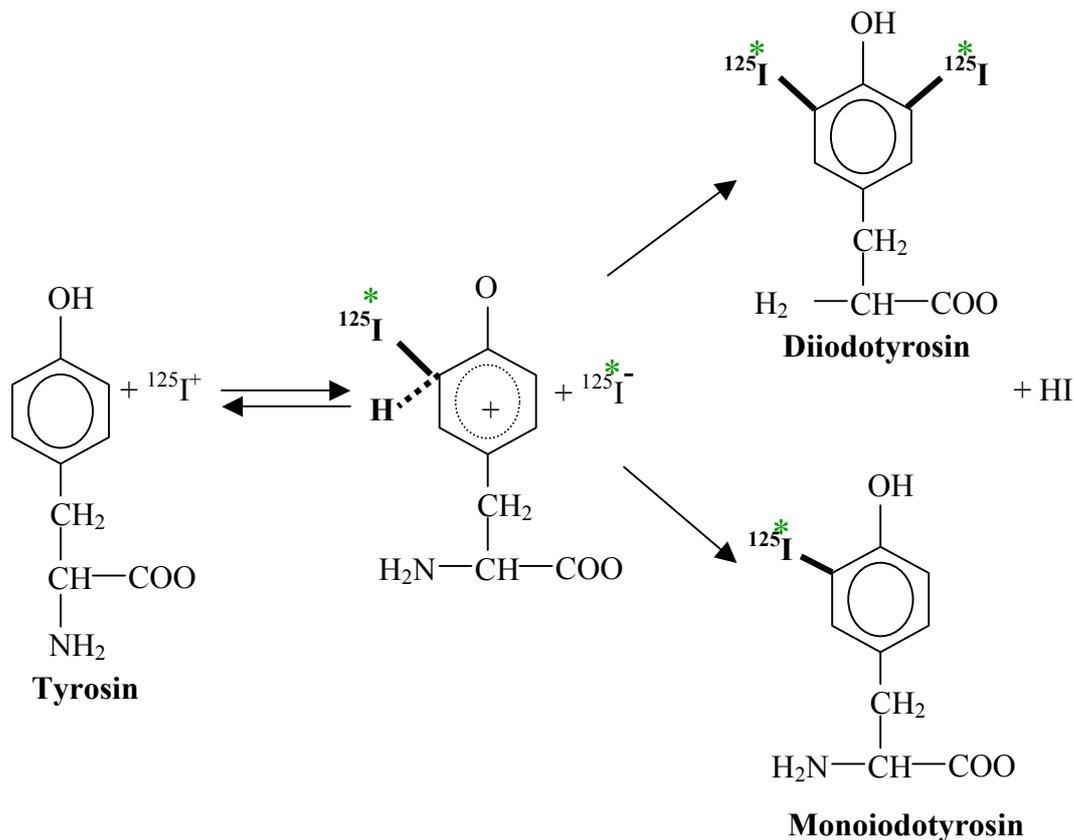
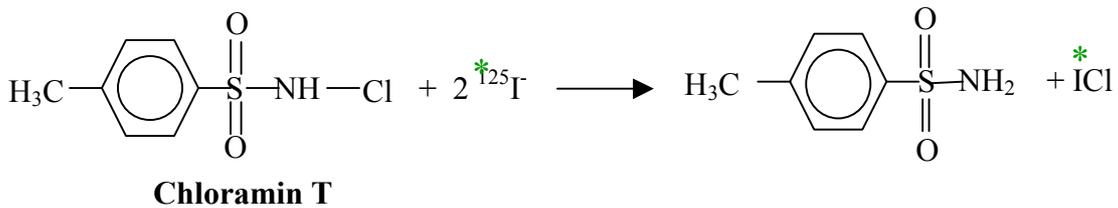
**B.** 500 µl einer 0,1 % gereinigten Peptids aus 15 Ansätzen (siehe A) wurden zur Analyse der Peptidreinheit auf der µRPC2/C18 SC 3.1/10-reversed-phase-Säule aufgetrennt. Das Elutionsprofil (schwarze Linie) zeigt nur ein Schwingungsmaximum bei 2,7 ml, das dem aufgereinigten S8-Peptid entspricht.

**B.**



## 18. Iodierung von Peptiden

Peptide, die für Binde- und Transportstudien an TAP eingesetzt wurden, konnten an ihrem Tyrosin mit <sup>125</sup>Iod radioaktiv markiert werden (in sehr geringem Maß ist es möglich Peptide auch an Histidine und Tryptophan zu markieren). Hierfür wurde die Chloramin-T-Methode nach McConahey ( McConahey & Dixon 1980) eingesetzt. Chloramin T (Natrium-N-chlor-p-toluolsulfonamid Trihydrat oder N-Chlor-4-methylbenzolsulfonamid Natriumsalz) ist ein Oxidationsmittel, das sich in wässriger Lösung langsam zu Hypochlorsäure zersetzt. Hypochlorsäure oxidiert das Jodid (<sup>125</sup>I<sup>-</sup>) zu dem hochreaktiven <sup>125</sup>I<sub>2</sub> oder <sup>125</sup>I<sup>+</sup> (<sup>125</sup>ICl). <sup>125</sup>I<sup>+</sup> reagiert mit der anionischen Form des Tyrosins zu <sup>125</sup>I-Tyrosin (Rehm 2000). An den Phenylring können maximal zwei <sup>125</sup>I-Atome angelagert werden:



10 µl 1 mM S8-Peptid wurde mit 10 µl 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) gemischt. Dann wurden 5 µl  $^{125}\text{I}$  (500 µCi) zugegeben und gut gemischt. Durch Zugabe von 10 µl Chloramin-T (1 mg/ml in Wasser, frisch angesetzt) wurde die Iodierungsreaktion gestartet. Nach 2 Minuten Inkubation bei RT wurde der Ansatz auf eine Ionenaustauschersäule gegeben, die 100 µl in Phosphatpuffer voräquilibriertes Dowex (AG1-X8, BioRad; 5g Dowex /100 ml Wasser) enthielt. Während iodiertes Peptid durch Zugabe von 470 µl 100 mM Phosphatpuffer eluiert wurde, blieb freies Iod an die Dowex gebunden. Um eine optimale Entfernung vom freien Iod zu erreichen, wurde das eluierte Peptid zu einem mit Phosphatpuffer äquilibriertem Dowex-Pellet zugegeben und gut gemischt. Nach dem Absetzen von Dowex wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Diese Reinigungsprozedur wurde noch 2-3 mal wiederholt. Die ca. 200 µM iodierter Peptidlösung wurde bei 4°C für 2 Wochen gelagert.

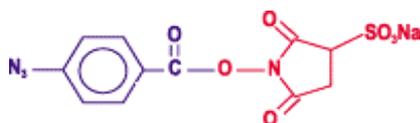
Freies Iod in der Säule und im verwendeten Dowex wurde durch Zugabe von 500 µl Natriumdisulfide ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ; 2mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ ) inaktiviert.

#### **100 mM Phosphatpuffer pH 7,4:**

77,4 ml 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 22,6 ml 1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  auf 1 L mit  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen.

### **19. Peptidkoppelung an HSAB**

Um zu untersuchen, ob ein bestimmtes Protein Peptide bindet, können Peptide verwendet werden, die an einen bifunktionellen photoreaktiven Kreuzvernetzer gekoppelt sind. Sollte das Protein dieses Peptid gebunden haben, so kann durch Bestrahlung die photoreaktive Gruppe des Kreuzvernetzers dazu aktiviert werden, eine kovalente Bindung mit dem interagierenden Protein zu bilden. Als bifunktioneller photoreaktiver Kreuzvernetzer wurde Sulfo-N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoate (Sulfo-HSAB, MW 362.2; Pierce) verwendet. Es reagiert in pH 7-9 mit primären Aminen des Peptids unter Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid. Die photoreaktive Arylazidgruppe bildet bei UV-Bestrahlung reaktivere Nitrene, die bevorzugt in nucleophile NH- und OH-Bindungen des benachbarten Proteins (falls dieses das Peptid gebunden hat) insertieren (Lottspeich 1998).



Sulfo-N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoate

Die Durchführung des Experiments fand im Dunkeln bzw. unter Rotlicht statt.

2,5 mg Sulfo-HSAB wurden in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gemischt und daraus 40 µl (ca. 6,9 mM, Sulfo-HSAB ist schwer löslich in höherer Molarität) Aliquots hergestellt und bei  $-20^\circ\text{C}$  im Dunkeln gelagert.

40 µl (ca. 0,266 mmol) HSAB-Aliquot wurde mit 360 µl 0,3 mM Boratpuffer, pH 8,6 versetzt (frisch angesetzt) und 70 µl davon wurden mit 200 µl 20 µM jodierter Peptidlösung versetzt und für 3 Stunden bei RT auf einem Überkopfröller inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Sulfo-HSAB durch Zugabe von 13 µl 1M Glycin/0,3M Boratpuffer und Inkubation für zwölf Stunden auf einem Überkopfröller bei  $4^\circ\text{C}$  abgesättigt. Sulfo-HSAB konjugierte Peptide konnten bei  $4^\circ\text{C}$  für zwei Wochen gelagert werden.

**0,3 M Boratpuffer:** 0,3 M H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8,4 (NaOH)

## 20. Peptidbindeassay

Für die Untersuchung der Peptidbindung wurden Mikrosomen und/oder Rohmembranen verwendet. Als Substrat wurde das S8-Peptid (TVDNKTRYR), ein optimales Bindepeptid für TAP<sup>a</sup>, verwendet (Deverson et al. 1998).

Mikrosomen aus 1,5x10<sup>8</sup> Zellen wurden hergestellt, in 250 µl 20 mM HEPES-Puffer resuspendiert und in 50 µl Aliquots bei -80°C gelagert (siehe Abschnitt III.3.4.).

Von jeder Zelllinie wurde ein 50 µl Mikrosomen-Aliquot auf Eis aufgetaut und mit 40 µl Peptidbindepuffer versetzt..

Alternativ wurden Rohmembranen aus 2x10<sup>7</sup> Zellen präpariert (siehe Abschnitt III.3.2.), in 90 µl Peptidbindepuffer resuspendiert und für den Assay eingesetzt.

Jeder Probe wurden 10 µl entnommen, in 10 µl Triton X-100/PBS für 30 min. auf Eis lysiert und für Westernblot-Analyse eingesetzt

Die Membran- bzw. Mikrosomenproben wurden mit 15 µl einer 8 µM HSAB-konjugierte <sup>125</sup>I-markierte Peptidlösung (siehe Abschnitt III.3.19.) unter Rotlicht versetzt. Die Peptidbindung erfolgte auf Eis für 5 min. Danach erfolgte die Kreuzvernetzung durch fünf minütige Bestrahlung bei 254 nm. Zur Kontrolle, ob gleiche Mengen Peptid in allen Proben eingesetzt wurden, wurde Die γ-Strahlung gemessen. Die Mikrosomen wurden anschließend bei 23000 g, 4°C für 20 min. abzentrifugiert und in 450 µl 1% Triton X-100 / PBS resuspendiert. Zur vollständigen Solubilisierung wurde der Ansatz für 30 min. auf Eis inkubiert. Unlösliches Material wurde bei 23000 g, 4°C für 10 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde für eine Immunpräzipitation mit den Antikörpern 116/5 oder D90 eingesetzt (siehe Abschnitt III.3.13.). Nichtspezifisch gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit 1 ml 1% Triton X-100 / PBS entfernt. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit 50 µl UREA-Probenpuffer Anschließend wurden die eluierten Proteine auf 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Autoradiographie analysiert (siehe III.3.8.).

### **UREA-Probenpuffer:**

30 % 6 M Harnstoff in 0,5 M Tris, pH 6,8

70 % 2 x Probenpuffer, 7 % β-Mercaptoethanol

**Peptidbindepuffer:** frisch angesetzt und vor Gebrauch sterilfiltriert

50 mM Tris pH 7,5 (HCl), 5 mM Mg-Acetat, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0,1% denaturiertes (10 min. gekocht) und dialysiertes BSA, 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Böhringer) pro 10 ml.

## 21. Peptidtransportassay

(Nach Neefjes et al. 1993; modifiziert von Dr. A. Seelig)

Die Transportaktivität der hergestellten TAP-Chimären, konnte mit Hilfe des ER-Glykosylierungssystems untersucht werden. Die Zellen wurden mit Streptolysin O (SLO), einem bakteriellen Gift, das Poren in der Plasmamembran bildet, permeabilisiert. Anschließend mit radioaktiv markierten Peptiden, die eine Glykosylierungssequenz (NXS/T) besitzen, inkubiert (in dieser Arbeit wurde das S8-Peptid Peptid verwendet: **TVD****NKTRY****\*R** mit der Glykosylierungssequenz, **NKT** und dem radioaktiv markiertem Tyrosin **Y\***). Nach TAP-abhängigem Transport werden diese Peptide von ER-Glykosylasen erkannt und Glykosyliert. Nach der Lyse der Zellen konnten glykosylierte Substrate durch eine Lektinchromatographie isoliert werden (in dieser Arbeit wurde die Concannavalin A (ConA)-Agarose verwendet). In das ER Transportierte Peptide konnten schließlich über Radioaktivitätsmessung quantifiziert werden.

$2-3 \times 10^6$  Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 100  $\mu$ l Streptolysin O (2 U/ ml in H<sub>2</sub>O, MUREX ) resuspendiert und für ca. 15 min. bei 37°C inkubiert. Die Effizienz der Permeabilisierung wurde durch Trypan-Blau-Färbung (0,16 % Trypan-Blau in 1xPBS, 0,05 % NaN<sub>3</sub>) überprüft. Dazu wurden 1  $\mu$ l der Zellprobe mit 1  $\mu$ l Trypan-Blau gemischt und unter dem Mikroskop die Anzahl der permeabilisierungsbedingt blau gefärbten Zellen bestimmt. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei ca. 600g). Die permeabilisierten Zellen wurden in 80  $\mu$ l Peptidbindepuffer aufgenommen und auf Eis gestellt. 5  $\mu$ l einer jodierten 20 mM-Peptidlösung (100 pMol) wurden zugegeben. Die Transportaktivität wurde durch Inkubation bei 37°C für 10 min ermöglicht. Durch Zugabe von 1 ml ConA-Bindepuffer wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen für 5 minütige Inkubation bei RT lysiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation bei ca. 13000g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf 100  $\mu$ l ConA-Agarose gegeben und für 1 Stunde auf einem Überkopfröhrer bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Agarose mit ConA-Bindepuffer wurde schließlich die  $\gamma$ -Strahlung der glykosylierten und folglich transportierten Peptide gemessen.

**Peptidbindepuffer:**

250 mM Saccharose, 50 mM Hepes (pH 7,5), 150 mM Kaliumacetat (KOAc), 5 mM Mg-Acetat (Mg (OAc)<sub>2</sub>), 10 mM ATP, 1 mM DTT, Protease Inhibitor (1 Tablette pro 10 ml Puffer).

**ConA-Bindepuffer:** (Lagerung bei 4 °C)

500 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5 (HCl), 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 % Triton X-100, 0,1 % Igepal 630, Protease Inhibitor (1 Tablette pro 10 ml Puffer).

## 22. Untersuchung der Expression von Proteinen an der Zelloberfläche

Die Zelloberflächenexpression von MHC-I-Molekülen kann mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Dazu werden die Zellen mit einem gegen MHC-I-Moleküle gerichteten Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper, der gegen den ersten gerichtet ist. Durch die Messung der Fluoreszenzstärke der Zellen in einem FACScan ( Fluorescence Activated Cell Sorter) läßt sich die Oberflächen Expression von MHC-I-Molekülen nachweisen.

Der Oberflächenexpressionsgrad von MHC-I-Allelen, die TAP-abhängig mit Peptide beladen werden, wie HLA-B5, ist ein indirekter Sensor für die TAP-Transportaktivität. Somit diente die FACS-Analyse zur indirekten Untersuchung der TAP-Aktivität.

5x10<sup>6</sup>-Zellen wurden zweimal mit kaltem DFN gewaschen und in 1 ml kaltem DFN resuspendiert. 25 µl davon wurden in ein 1,5 ml Gefäß überführt und 50 µl Erstantikörper (4E gegen HLA-B5, 100 µg / ml in DFN ) oder 50 µl DFN, als negative Kontrolle zugegeben.

Die Zellen wurden bei 4 °C auf einem Überkopffroller oder unter sehr leichtem Schütteln für 30 min. inkubiert. Nicht spezifisch gebundene Antikörper wurden durch viermaliges Waschen mit jeweils 200 µl DFN entfernt (Zentrifugation zwischen den Waschschritten bei 600-800 rpm: 40-70 g). Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 µl des fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpers ( goat anti mouse IgG-FITC, 25 µg / ml in DFN ) im Dunkeln bei 4°C auf einem Überkopffroller für 30 min. Nicht spezifisch gebundene Antikörper wurden durch viermaliges Waschen mit jeweils 200 µl DFN entfernt (wegen Lichtempfindlichkeit von IgG-FITC, waren die Proben stets bedeckt). Die Zellen wurden in 600 µl DFN resuspendiert und auf Eis gestellt. Unmittelbar vor der Messung im FACScan wurden 3 µl Propidiumiodid (100 µl / ml in H<sub>2</sub>O, sehr giftig!) zugegeben. Propidiumiodid färbt die toten Zellen, in dem es in die DNA interkaliert. Durch den Emissionsspektrumunterschied zwischen Propidiumiodid (550-720 nm) und FITC (490-590 nm) können die toten Zellen identifiziert und ausgeschlossen

werden. Die Bearbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Cellquest (Becton Dickinson).

**500 x DAB:**

6,6 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (0,5 M), 6,6 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  (0,25), auf 100 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen

**DFN:**

1 ml 500 x DAB, 50 ml FCS, 5 ml 10 % Azid, 50 ml 10 x PBS, auf 500 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen.

**10 x PBS:**

80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : auf 1 Liter mit  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen.

## IV. Ergebnisse

### A. TAP-Chimären mit ausgetauschten V-Regionen und Kern-NBDs

#### 1. Generation von chimären TAP-cDNAs

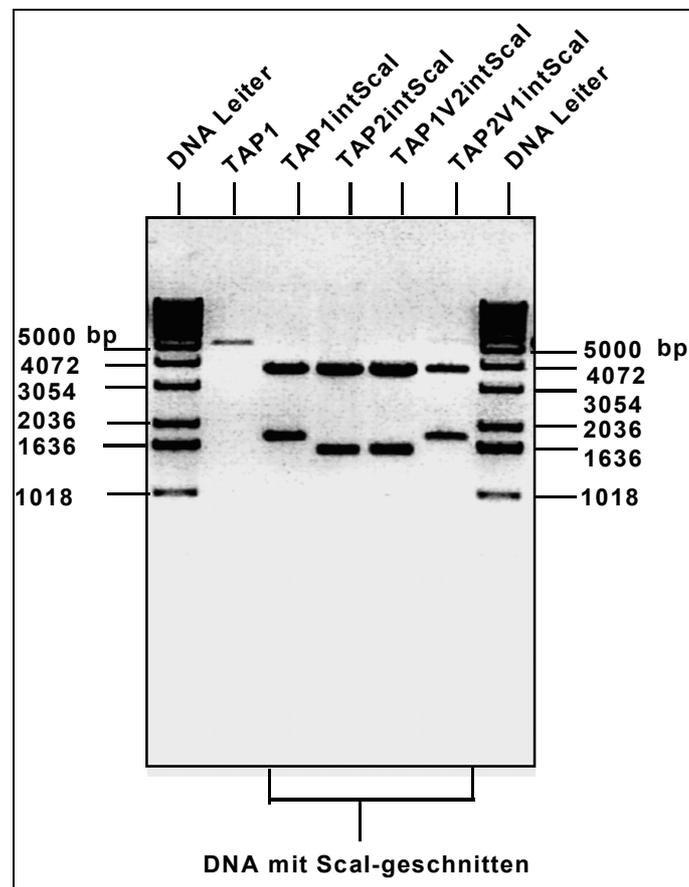
##### a. Herstellung von TAP-Ketten mit ausgetauschten C-terminalen Regionen

Zwei EcoRI-Fragmente, die jeweils die cDNA für Ratten-TAP1<sup>a</sup> und Ratten TAP2<sup>a</sup> enthalten (Deverson et al. 1990, Powis et al. 1991) und in die EcoRI-Klonierungsstelle von pBluescript KS(+) (pBIKSP) kloniert sind (Daumke O. 2000 und Daumke et al. 2001) lagen bereits vor. Die cDNAs waren in der gleichen Orientierung kloniert und als pBIKS-TAP1 und pBIKS-TAP2 bezeichnet.

Um die cDNA-Fragmente, die für die variablen C-terminalen Regionen (V-Region) kodieren, auszutauschen, wurde die in der **Abbildung IV.3.** schematisch dargestellte und im folgenden beschriebene Klonierungsstrategie durchgeführt:

Mittels ortsgerichteter Mutagenese (siehe **Abschnitt III.1.12.**) wurde eine einmalige ScaI-Schnittstelle in einem für beide TAP-Ketten konservierten Bereich (neun Basen bzw. drei konservierte Aminosäuren vor Beginn der V-Region) eingeführt. Für die PCR-Mutagenese wurden die komplementären Primer TAP1-FM1 und TAP1-BM1 für TAP1-cDNA bzw. TAP2-FM1 und TAP2-BM1 für TAP2-cDNA (siehe **Abschnitt II.6.**) eingesetzt. Hierdurch wurden in der TAP1-cDNA die Nukleotide **G** 2000 in **A** (Nukleotidpositionen ausgehend von der EcoRI-Klonierungsstelle) und **C** 2002 in **T** ausgetauscht. In der TAP2-cDNA wurden identische Nukleotide, in einem identischen Sequenzkontext, in den Positionen 2004 und 2006 auch in jeweils **A** und **T** verändert. Auf diese Weise wurde aus der Sequenz **AGTGCC** eine ScaI-Restriktionsschnittstelle **AGTACT** in beiden TAP-cDNAs generiert (die blauen Nukleotide wurden ausgetauscht). Die hergestellten TAP-cDNAs mit der internen ScaI-Schnittstelle wurden mit pBIKS-TAP1+intScaI und pBIKS-TAP2+intScaI bezeichnet. Im Amp-Resistenzgen des pBIKSP existiert eine zweite ScaI-Schnittstelle. Durch endonukleolytische Spaltung (siehe **Abschnitt III.1.8.**) mit dem ScaI-Restriktionsenzym wurden jeweils zwei Fragmente (1,8 kb- und 3,8 kb-Fragmente aus pBIKS-TAP1 sowie 1,6 kb- und 3,8 kb-Fragmente aus pBIKS-TAP2) generiert (siehe **Abbildung IV.1 und 3.**). Die kleinen Fragmente enthalten die jeweilige cDNA für die C-terminale V-Region und ein Teil des Amp-Resistenzgens, die größeren Fragmente enthalten den Rest der TAP-cDNA und dem

anderen Teil des Amp-Resistenzgens. Die Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und isoliert (siehe **Abschnitt III.1.8 und 9**). Schließlich erfolgte der Austausch durch Ligation (siehe **Abschnitt III.1.2a**) des V-Region-Fragments an das jeweils andere Restfragment der TAP-cDNA (siehe **Abbildung IV.1 und 3**). Die ligierten Fragmente wurden in DH5 $\alpha$ -Bakterien transformiert. Zur Selektion der positiven Klone wurde die isolierte Plasmid-DNA einer ScaI-Restriktionsverdauanalyse unterzogen (siehe **Abbildung IV.1**). Da die Amp-Resistenz nur dann wiederhergestellt wird, wenn die beiden Fragmente in der richtigen Orientierung ligiert wurden, konnten praktisch nur Kolonien wachsen, die das gewünschte chimäre TAP-Konstrukt enthielten. Die erzeugten chimären TAP-cDNAs wurden mit pBIKS-TAP1V2+intScaI und pBIKS-TAP2V1+intScaI bezeichnet.

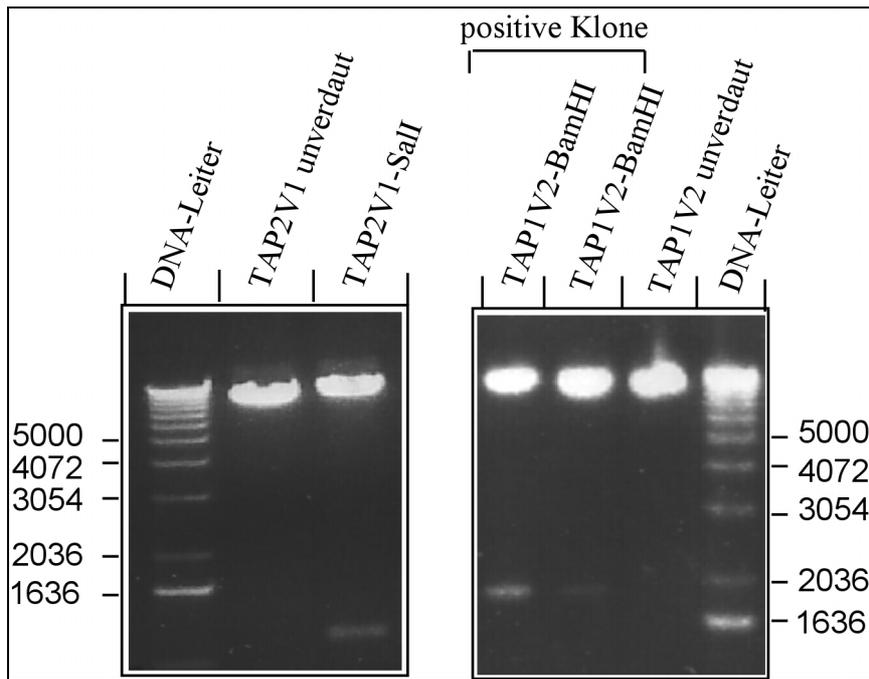


**Abbildung IV.1. Restriktionsanalyse der TAP-Konstrukte nach der Einführung der ScaI-Schnittstellen und dem Austausch der V-Regionen.** Die angegebenen Konstrukte sind in den Vektor pBIKSP kloniert. Die Plasmid-DNA wurde, wie angegeben, mit dem ScaI-Restriktionsenzym geschnitten und auf 1% Agarosegel aufgetrennt. Die erwarteten Fragmente 1,8 kb- und 3,8 kb-Fragmente aus pBIKS-TAP1 sowie 1,6 kb- und 3,8 kb-Fragmente aus pBIKS-TAP2 wurden generiert. Die 1,8 kb V1-Fragment und 1,6 kb V2-Fragment wurden zwischen TAP1 und TAP2 ausgetauscht.

Mit den Primer TAP1-c2F und TAP1-c2B für TAP1V2+intScaI sowie TAP2-c1F+intScaI und TAP2-c1B für TAP2V1 (siehe **Abschnitt II.6.**) wurden schließlich mittels erneuter ortsgerichteter Mutagenese die ScaI-Schnittstellen wieder entfernt und der ursprüngliche Sequenzkontext wiederhergestellt.

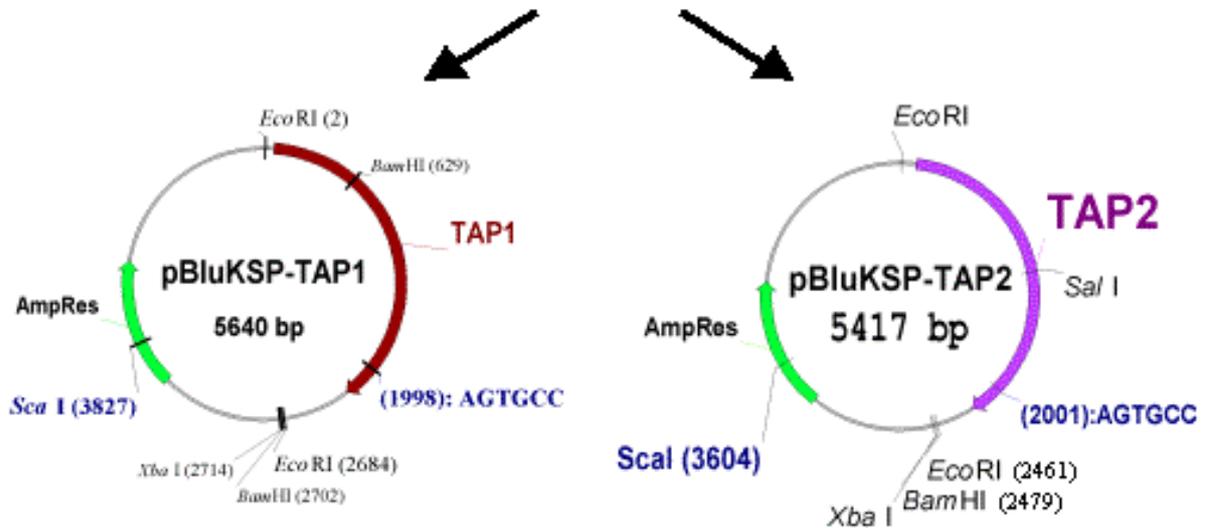
Die 2,46 kb- und 2,68 kb-EcoRI-Fragmente, die jeweils die cDNA für TAP1V2 und TAP2V1 enthalten, wurden aus dem pBIKSP isoliert und in die EcoRI-Klonierungsstelle des Expressionsvektor pH $\beta$ Apr1neo (Gunning et al. 1987) übergeführt. Sie wurden mit pH $\beta$ Apr1neo-TAP1V2 und pH $\beta$ Apr1neo-TAP2V1 bezeichnet. Mittels Restriktionsverdauanalysen mit BamHI für TAP1V2 und Sall für TAP2V1 wurde die Klonierungsorientierung der Konstrukte im Expressionsvektor überprüft. Bei richtiger Orientierung sollten 1,8 kb- und 11,1 kb-Fragmente aus pH $\beta$ Apr1neo-TAP1V2 bzw. 1,2 kb- und 12,2 kb-Fragmente aus pH $\beta$ Apr1neo-TAP2V1 generiert werden (siehe **Abbildung IV.2.**). Anschließend wurden die Konstrukte in beide Richtungen sequenziert (siehe **Abschnitt IX.**). Die Konstrukte pH $\beta$ Apr1neo-TAP1V2 und pH $\beta$ Apr1neo-TAP2V1 wurden durch einen ScaI-Schnitt linearisiert und in TAP-negativen T2-Zellen transfiziert (siehe **Abschnitt III.2.4.**).

Die hergestellten Konstrukte wurden auch in Kombination mit anderen TAP-cDNAs transfiziert. Hierfür wurden die bereits vorhandenen Konstrukte pH $\beta$ Apr1neo-TAP1 und pH $\beta$ Apr1neo-TAP2 (Deverson et al. 1990) sowie pH $\beta$ Apr1neo-TAP1/2 und pH $\beta$ Apr1neo-TAP2/1 (Daumke et al. 2001) in DH5 $\alpha$ -Bakterien transformiert. Anschließend wurde die präparierte Plasmid-DNA (siehe **Abschnitt III.1.4.**) für den Transfektionsansatz mit ScaI linearisiert.

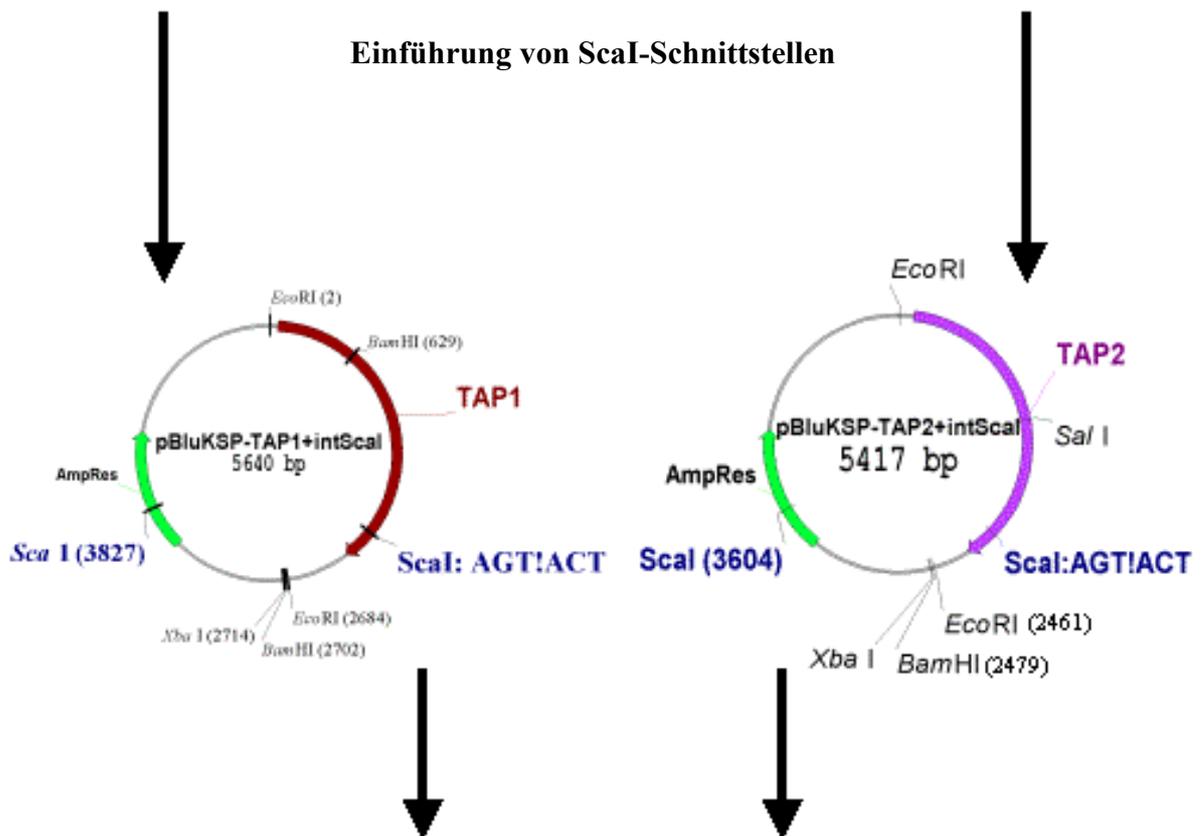


**Abbildung IV.2. Restriktionsanalyse der TAP-Konstrukte im Expressionsvektor pH $\beta$ Apr1neo.** Die angegebenen Konstrukte sind in den Vektor pH $\beta$ Apr1neo kloniert. Zur Überprüfung der Klonierungsorientierung wurden die Plasmid-DNA mit dem Sall-Restriktionsenzym (für 2V1) oder BamHI für 1V2 geschnitten und auf einen 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Bei richtiger Orientierung sollten 1,8 kb- und 11,1 kb-Fragmente aus pH $\beta$ Apr1neo-TAP1V2 bzw. 1,2 kb- und 12,2 kb-Fragmente aus pH $\beta$ Apr1neo-TAP2V1 generiert werden.

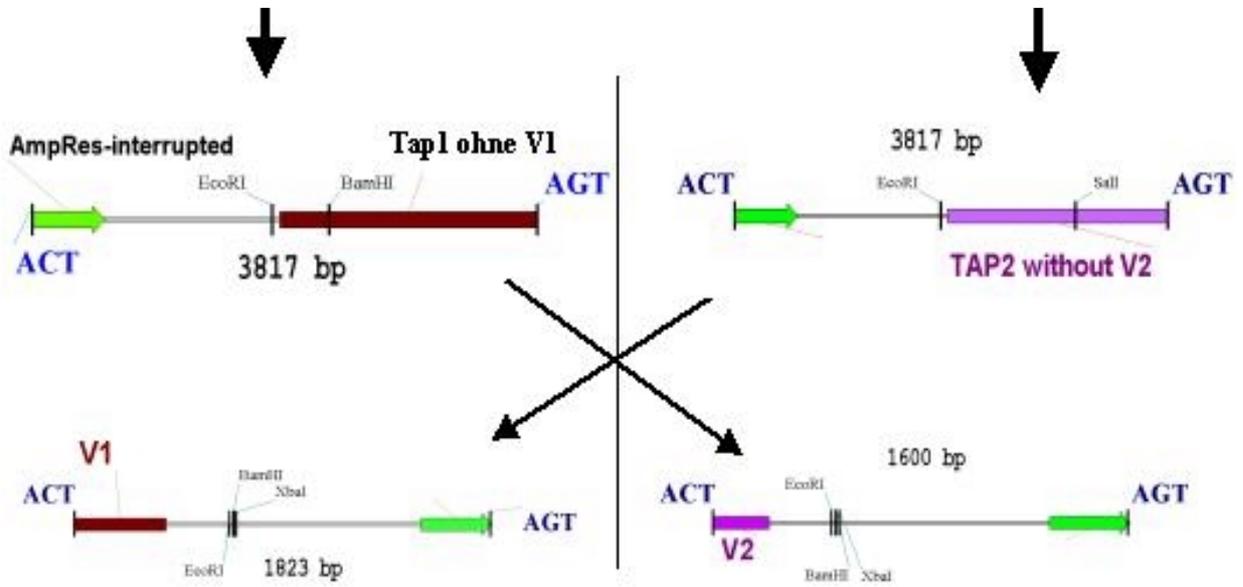
EcoRI-Fragmente, die Tap1- oder Tap2-cDNAs enthalten,  
sind in pBluescript KS (+) kloniert



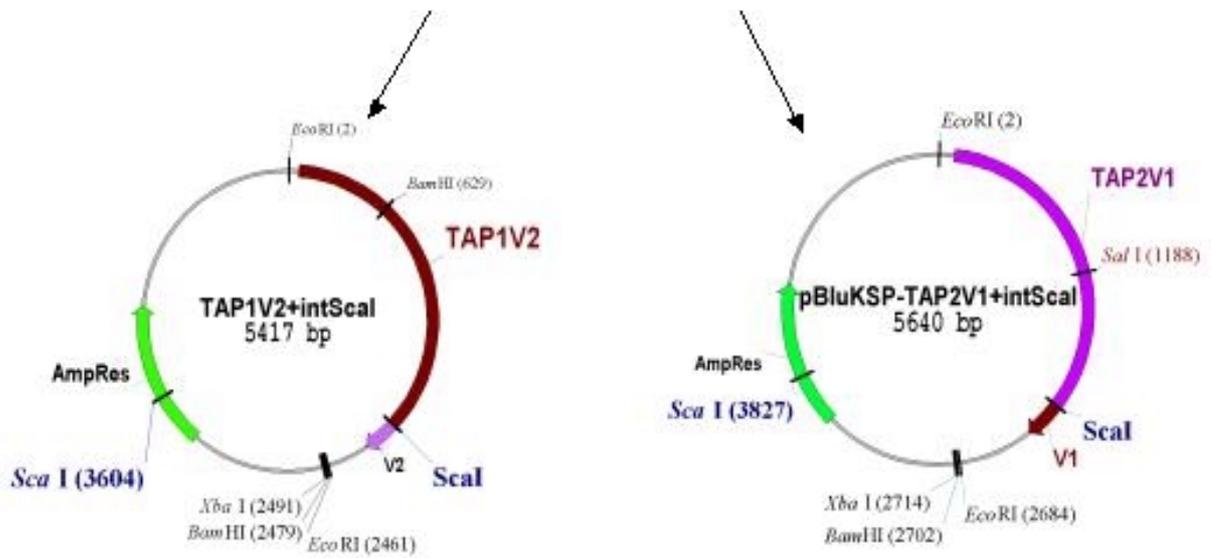
Einführung von ScaI-Schnittstellen



## Generierung der ScaI-Fragmente, die V1- und V2-Segmente enthalten



## Austausch der V-Domänen



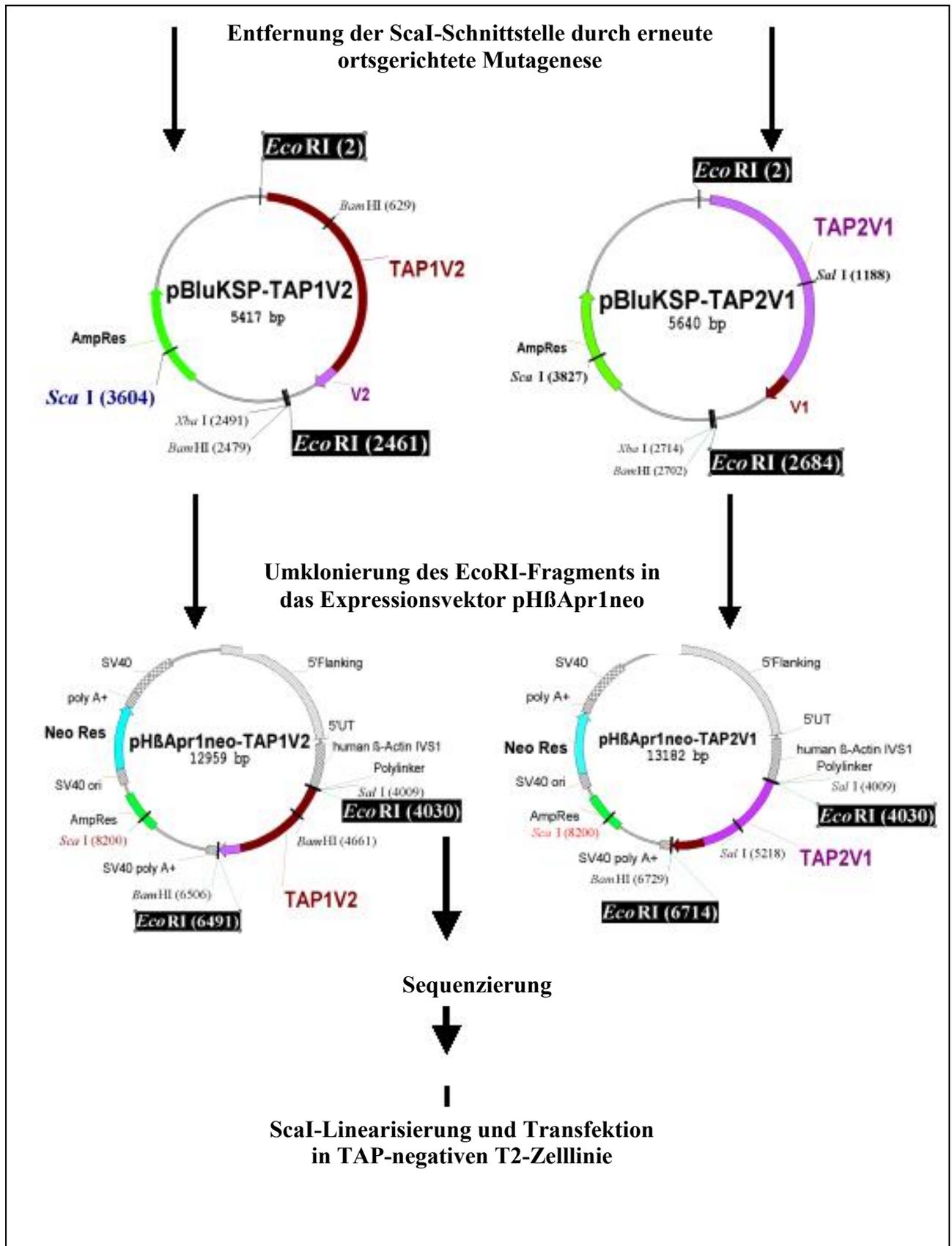
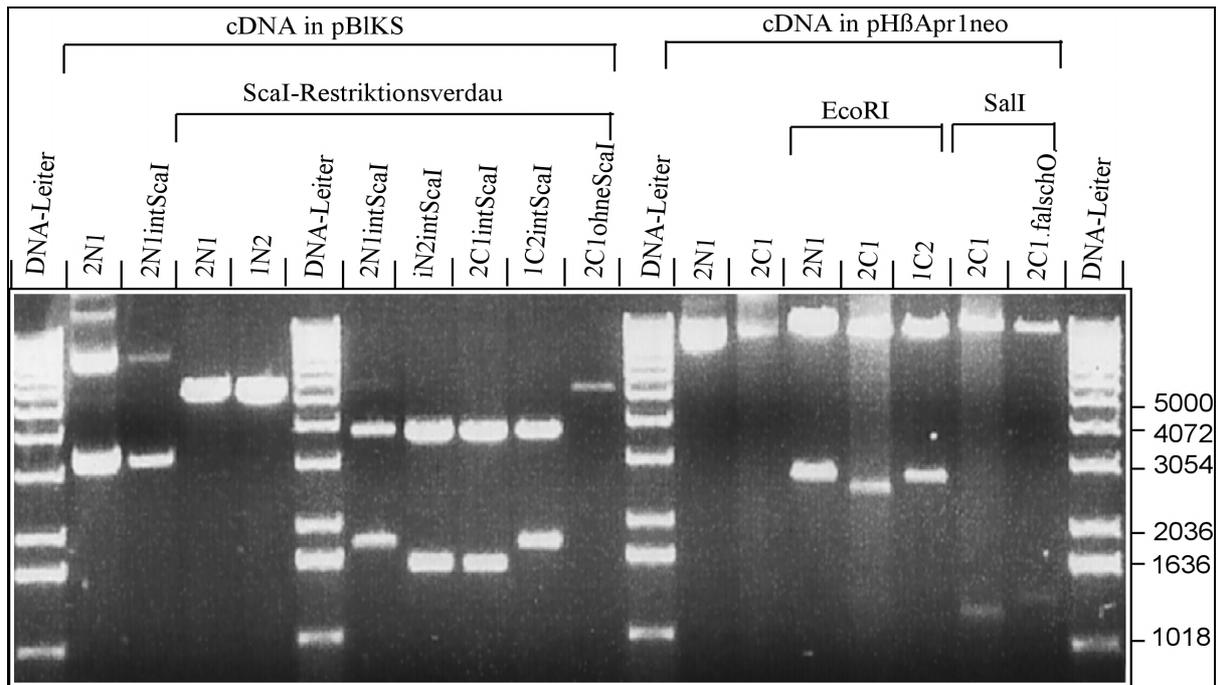


Abbildung IV.3. Klonierungsstrategie zur Herstellung der TAP-Chimären mit ausgetauschtem C-Terminus.

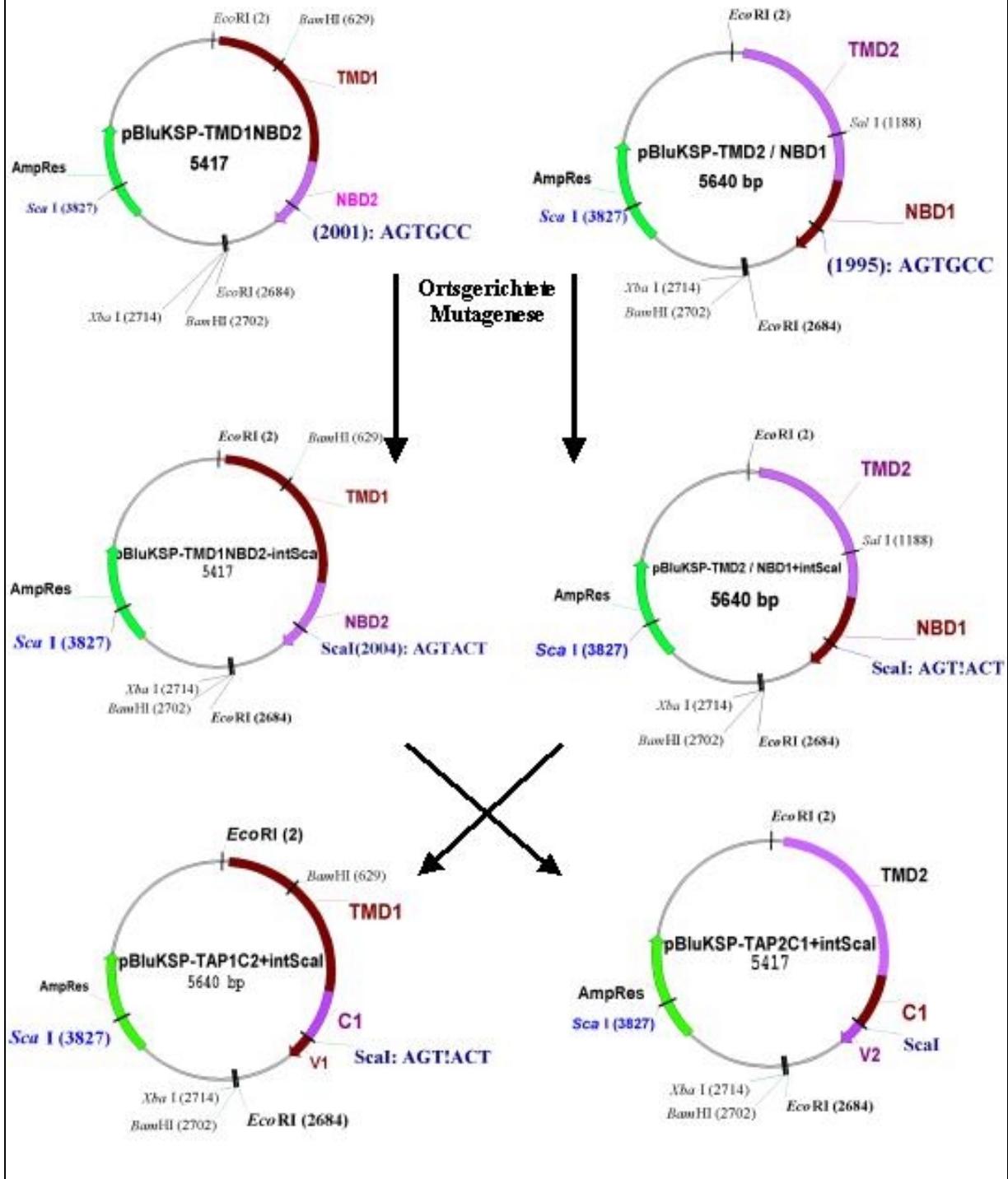
## **b. Herstellung von TAP-Ketten mit ausgetauschten Kern-NBDs**

Zur Herstellung von TAP-cDNAs mit ausgetauschten Kern-NBDs wurden die in pBluescript KS(+) klonierten TAP2/1-cDNA (in dieser Arbeit umbenannt auf TMD2 NBD1-cDNA) und TAP1/2-cDNA (umbenannt auf TMD1NBD2-cDNA) verwendet. (Daumke O., 2000). (siehe **Abbildung IV.5.**). Bei diesen Konstrukten handelt es sich um TAP1 und TAP2 mit ausgetauschten Nukleotidbindedomänen (NBDs). Die TAP2/1-cDNA codiert für ein rekombinantes Protein, dessen Transmembrandomäne (TMD) von TAP2 und die NBD von TAP1 stammen. Die TAP1/2-cDNA enthält die TMD-cDNA aus TAP1 und die NBD-cDNA aus TAP2. Durch den Austausch der C-terminalen V-Regionen zwischen TAP1N2 und TAP2N1 wurden die TAP1C2-cDNA und TAP2C1-cDNA hergestellt (siehe **Abbildung IV.5.**). Hierfür wurde die gleiche in **Abschnitt IV.A.1.a.** beschriebene Klonierungsstrategie eingesetzt. Für die ortsgerichtete Mutagenese zur Einführung der ScaI-Schnittstelle wurden die Primer TAP1-FM1 und TAP1-BM1 für TAP2N1-cDNA bzw. TAP2-FM1 und TAP2-BM1 für TAP1N2-cDNA (siehe **Abschnitt II.6.**) verwendet. Mit den Primern TAP1-c2F und TAP1-c2B für TAP2C1+intScaI sowie TAP2-c1F und TAP2-c1B für TAP1C2+intScaI (siehe **Abschnitt II.6.**) wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese die ScaI-Schnittstellen wieder entfernt und der ursprüngliche Sequenzkontext wiederhergestellt. Die Restriktionsverdauanalysen zu den Klonierungsschritten sind der **Abbildung IV.4** zu entnehmen. Die Konstrukte wurden anschließend in beiden Richtungen sequenziert (siehe **Abschnitt IX.**), ScaI-linearisiert und in TAP-negativen T2-Zellen transfiziert.



**Abbildung IV.4. Restriktionsanalysen der TAP-Konstrukte nach dem Domänen austausch und nach der Umklonierung in den Expressionsvektor pHβApr1neo.** Plasmid-DNA wurde mit Hilfe der angegebenen Restriktionsenzyme verdaut und auf 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. 2C1 falschO zeigt, daß ein EcoRI-Fragment von 2C1 in der falschen Orientierung kloniert wurde.

EcoRI-Fragmente, die 1N2- oder 2N1-cDNAs enthalten, sind in pBluescript KS (+) kloniert



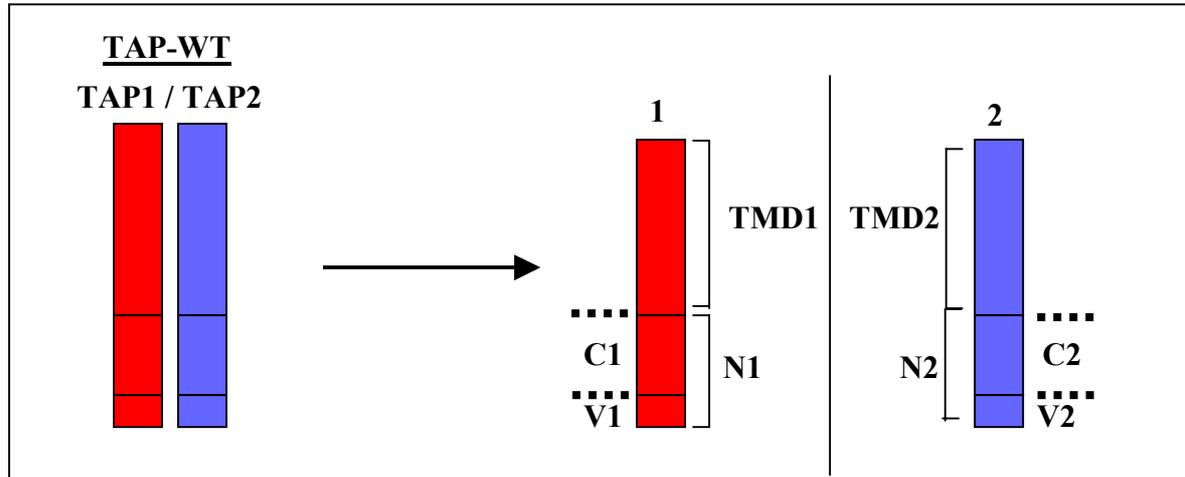
**Abbildung IV.5.** Die Klonierungsstrategie zur Herstellung von TAP-Chimären mit ausgetauschten Kern-NBDs. Die Konstrukte wurden schließlich in das Expressionsplasmid pHBApr1neo umklontiert ( wie in Abbildung IV.3.).

## 2. Etablierung von TAP-Chimären exprimierenden T2-Zelllinien

Vierzehn T2-Zelllinien, die TAP als Einzelkette oder in unterschiedlichen Zweierkombinationen exprimieren, wurden hergestellt. Dabei wurde berücksichtigt, dass keine Kombinationen von zwei TAP-Ketten mit identischen Transmembrandomänen oder identischen Nukleotidbindedomänen hergestellt werden. Arora et al. (2001) und Daumke et al. (2001) zeigten, dass solche TAP-Chimäre nicht funktional sind.

### a. Nomenklatur der TAP-Chimären und der hergestellten T2-Zelllinien

Die hergestellten TAP-Konstrukte wurden einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen in TAP-negativen T2-Zellen transfiziert (siehe **Abschnitt III.2.4.**). Die Selektion der Klone erfolgte mit G418 (siehe **Abschnitt III.2.5.**). Zur Untersuchung der TAP-Expression wurden die Klone anschließend einer Westernblotanalyse unterzogen (siehe **Abschnitt IV.A.2.b.**). In der **Abbildung IV.6.** sind die gewählten Bezeichnungen für die unterschiedlichen TAP-Domänen bzw. -Regionen dargestellt.



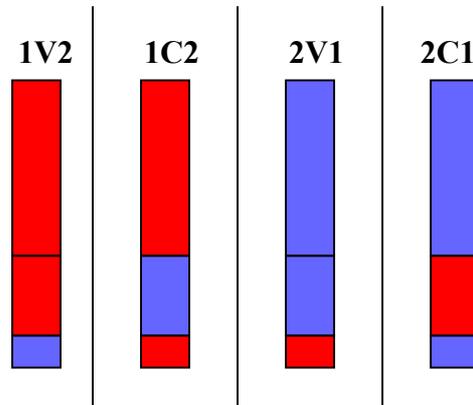
**Abbildung IV.6.: Nomenklatur der unterschiedlichen TAP-Domänen/-Regionen:** Die Domänen der TAP1-Kette sind in rot, die der TAP2-Kette in blau dargestellt. Die Bedeutung der Zahlen und Buchstaben werden im folgenden beschrieben:

- 1: steht für TAP1
- 2: steht für TAP2
- N1: steht für die Nukleotidbindedomäne von TAP1 (NBD1)
- N2: steht für die Nukleotidbindedomäne von TAP2 (NBD 2)
- C1: steht für die konservierte Kern-Region von NBD1
- C2: steht für die konservierte Kern-Region von NBD2
- V1: steht für die variable Region von NBD1
- V2: steht für die variable Region von NBD2

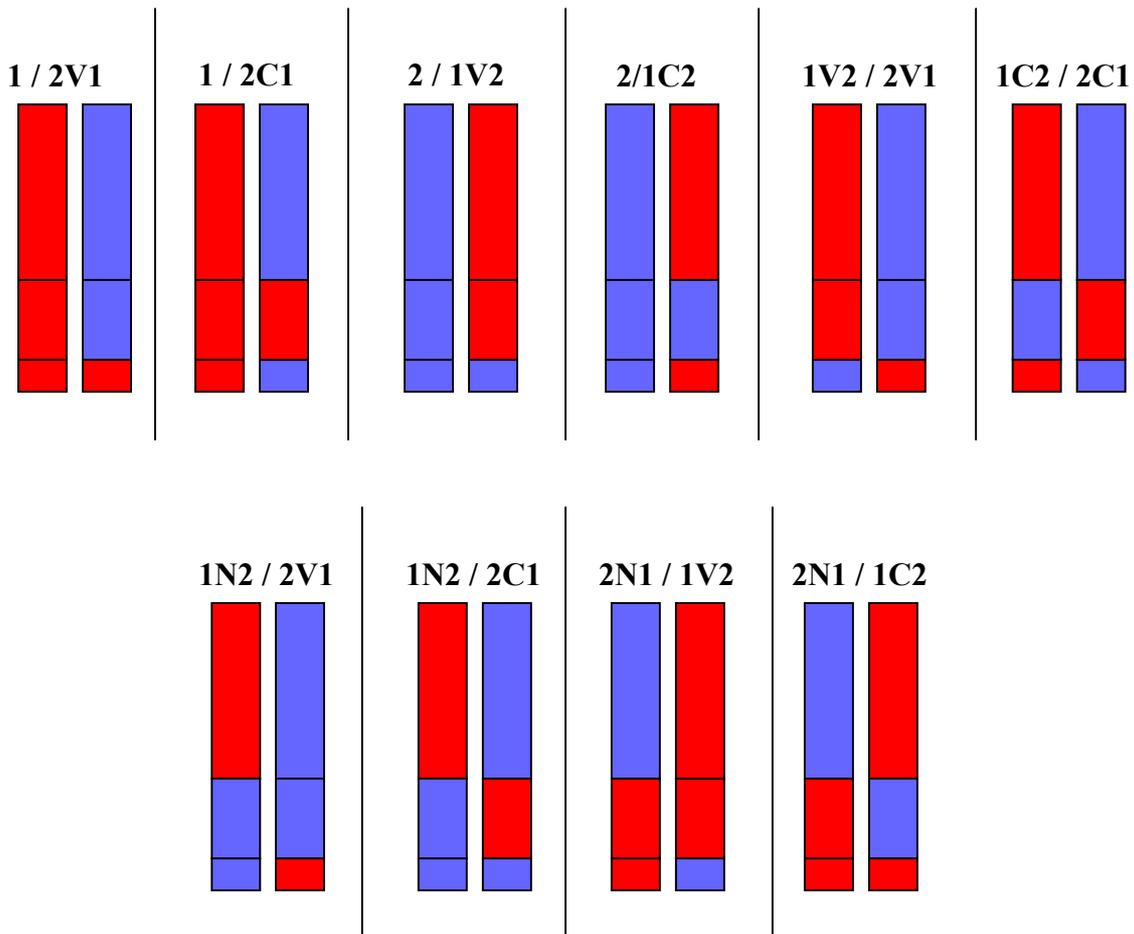
Bei jeder TAP-Kette steht die erste Zahl: **1** bzw. **2** für TAP1 bzw. TAP2. Die ausgetauschten Regionen in diesen Ketten werden mit **V**, **C** oder **N** bezeichnet. Die letzte Zahl zeigt, aus welcher TAP-WT-Kette (TAP1 oder TAP2) die ausgetauschten Domänen (V, C bzw. N) stammen. Zum Beispiel besteht **1N2** (Daumke et al 2001, als 1/2 bezeichnet) aus der TMD von TAP1 und der NBD von TAP2. **2N1**-Kette (Daumke et al 2001, als 2/1 bezeichnet) aus der TMD von TAP2 und der NBD von TAP1. Die **2V1**-Kette steht für TAP2 mit ausgetauschter V1-Region, die aus TAP1 stammt und **1C2** steht für TAP1 mit ausgetauschter C2-Region.

Zwei TAP-Ketten, die in der selben T2-Zelllinie exprimiert werden, werden durch einen Längsstrich getrennt („/“) (siehe **Abbildung IV.7.**). Zur Vereinfachung der Nomenklatur wurde der Name der TAP-Chimären für die Bezeichnung der transfizierten T2-Zellen verwendet.. In der **Abbildung IV.7.** sind die etablierten Zelllinien dargestellt.

**Die Einzelketten exprimierenden T2-Zelllinien**



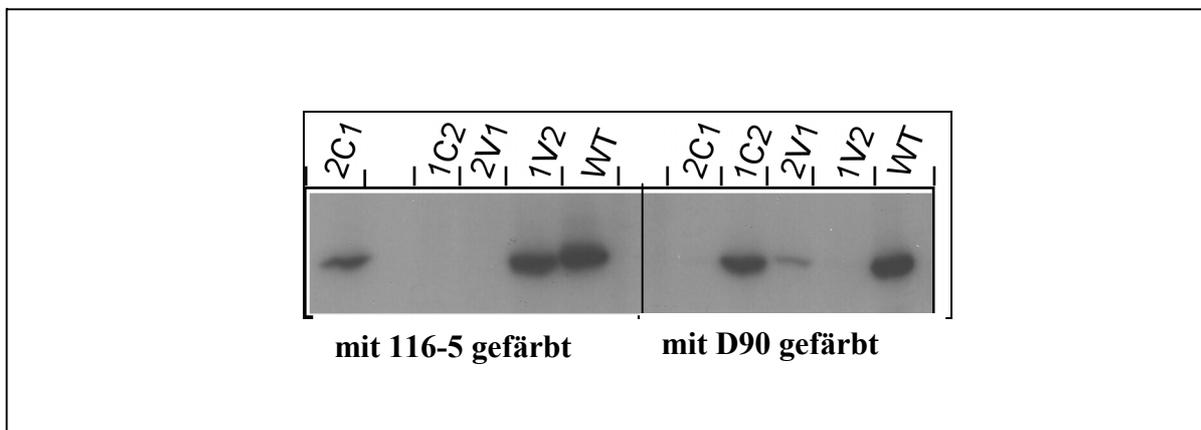
**Die Doppelketten exprimierenden T2-Zelllinien:**



**Abbildung IV.7.:** Darstellung aller etablierten Zelllinien. vier Einzelketten und zehn Doppelketten exprimierende Zelllinien wurden hergestellt. Die Domänen von TAP1 sind in rot, die von TAP2 in blau dargestellt.

## b. Westernblotanalyse zur Expression von den TAP-Chimären

Die Expression der unterschiedlichen TAP-Ketten wurde in Westernblotanalysen (siehe **Abschnitt III.3.6.**) überprüft. Lysate von  $1 \times 10^5$  Zellen (siehe **Abschnitt III.3.1**) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Blotten auf einer Nitrozellulosemembran (siehe **Abschnitt III.3.9.**) erfolgte die Immunfärbung (siehe **Abschnitt III.3.10.**) entweder mit dem Antiserum D90, dem Antiserum 116-5 oder mit dem monoklonalen Antikörper Mac394 (gegen NBD2) (siehe **Abschnitt II.3.9.**). D90 erkennt ein vierzehn Aminosäure langes C-terminales Peptid von TAP1. Das Antiserum D90 war damit in der Lage alle TAP-Ketten zu erkennen, die dieses C-terminale Peptid enthalten, also auch die TAP-Ketten 2N1 und die neuetablierten 1C2 bzw. 2V1. Das Antiserum 116-5 erkennt ein fünfzehn Aminosäuren langes C-terminales Peptid von TAP2 und konnte somit auch alle anderen Ketten: 1N2, 1V2 und 2C1 erkennen, die dieses Peptid in ihrem C-Terminus besitzen (siehe **Abbildung IV.8.**). 1V2 und 1C2 zeigen im SDS-Gel ein Laufverhalten, das dem von TAP1 bei ca. 66 kDa entspricht. 2V1 und 2C1 verhalten sich wie TAP2 und laufen bei ca. 70 kDa.

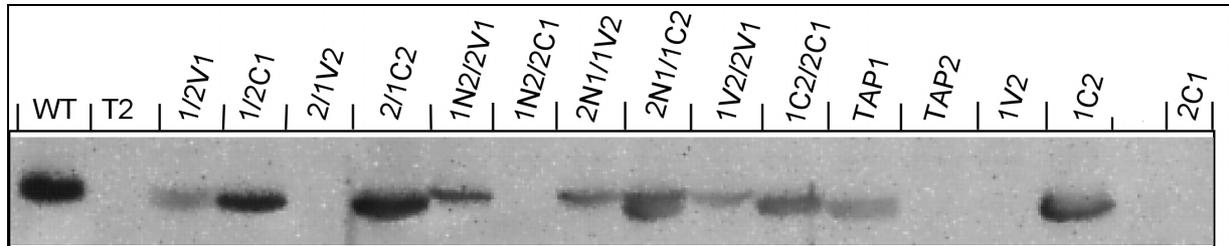


**Abbildung IV.8. Westernblotanalyse der neuetablierten Einzelketten exprimierende Zelllinien.** Von jeder der angegebenen Zelllinien wurden TX-100 Lysate von  $1 \times 10^5$  Zellen auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend erfolgte eine Immunfärbung mit dem Antiserum D90 (A) oder 116-5 (B). Beide Antiseren erkennen jeweils vierzehn und fünfzehn Aminosäure lange C-terminale Sequenzen von TAP1 und TAP2. 1V2 und 2C1 werden von 116-5 erkannt. D90 erkennt 2V1 und 1C2. 2V1 zeigt im Vergleich zu den anderen Ketten sehr schwache Expression.

Die genaue Aminosäuresequenz in der NBD2, die von Mac394 erkannt wird, ist nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte der Bereich, in dem diese Mac394-Erkennungssequenz liegt, auf dem Sequenzbereich von Aminosäuren 494 bis 639 eingegrenzt werden. Mac394 konnte, unabhängig von der vorhandenen C-terminalen V-Region und von der Transmembrandomäne (TMD), alle C2-Region (die konservierte Region der NBD2-Domäne, siehe Nomenklatur)-enthaltenden TAP-Ketten erkennen. (TAP2, 1C2, 1N2 und 2V1). Durch den Austausch der C-Region in TAP2 konnte die resultierende 2C1-Kette: (siehe **Abschnitt IV.A.2.a.**) nicht mehr von Mac394 erkannt werden.

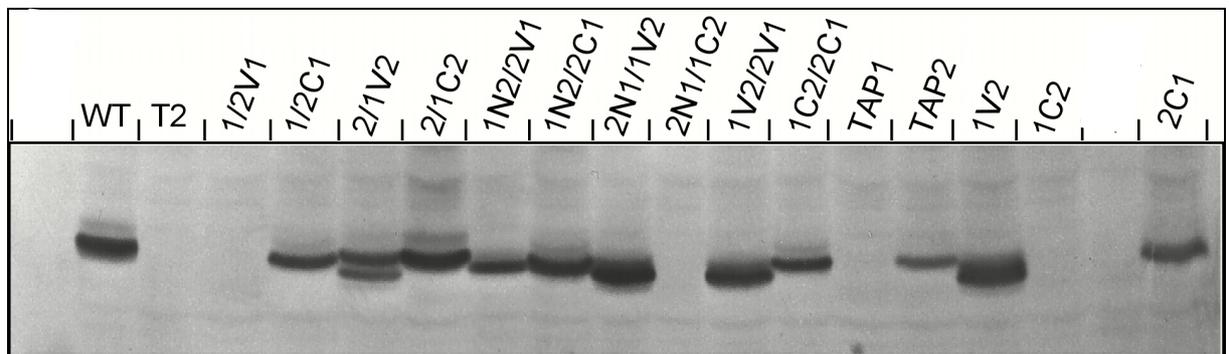
Durch die kombinierte Immunfärbung mit allen drei Antikörpern konnte überprüft werden, welche TAP-Ketten in jeder der etablierten Zelllinien exprimiert werden (siehe **Abbildung IV.9.**). Z.B. zeigt 2/1C2 bei der Immunfärbung mit dem Antiserum D90 eine Bande, die in der Höhe von TAP1-WT bei ca. 66 kDa läuft. Mit dem Antiserum 116-5 wird nur die TAP2-Kette immungefärbt, während mit dem monoklonalen Antikörper Mac394 beide Ketten erkannt werden. Nur 1N2/2V1 zeigt das gleiche Immunfärbeverhalten, allerdings laufen 2V1 und 1C2, die beide von D90 erkannt werden, unterschiedlich. 2V1 zeigt das selbe Laufverhalten wie TAP2 bei ca. 70 kDa.

**A.**



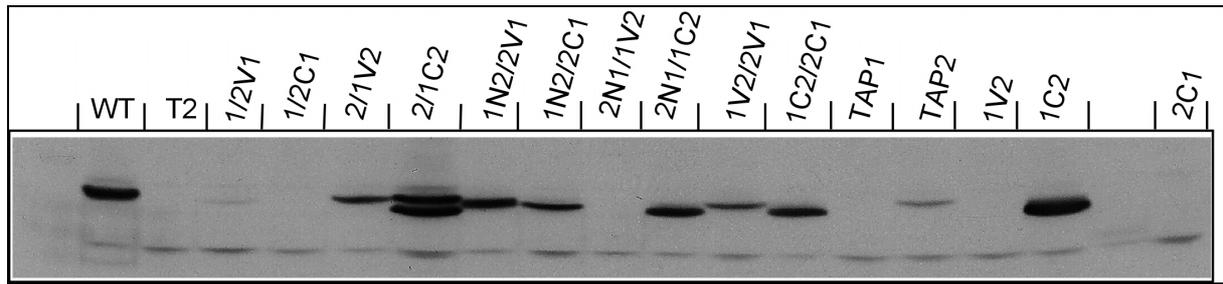
mit D90 gefärbt

**B.**



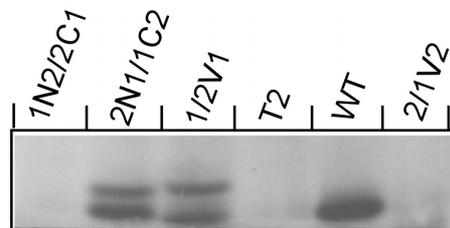
mit 116-5 gefärbt

C.



mit Mac394 gefärbt

D.



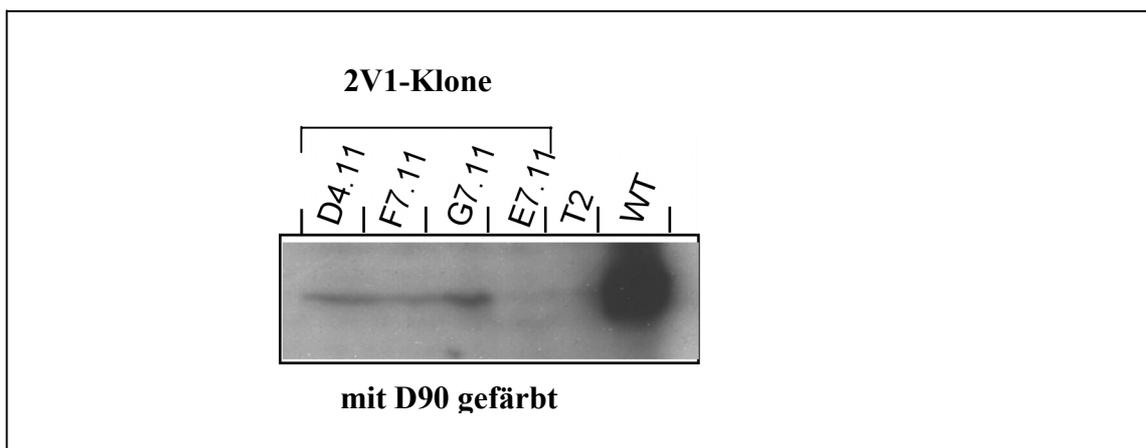
mit D90 gefärbt

**Abbildung IV.9. Westernblotanalyse der neuetablierten Zelllinien.** Von jeder der angegebenen Zelllinien wurden TX-100 Lysate von  $1 \times 10^5$  Zellen auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend erfolgte eine Immunfärbung mit dem Antiserum D90 (A), 116-5 (B) oder Mac394 (C). Die 1/2V1 scheint mit der Zeit ihre starke Expression verloren zu haben. In (D) ist ein Westernblot, der unmittelbar nach Etablierung der Zelllinie durchgeführt wurde, gezeigt. Erwartungsgemäß zeigt 1/2V1 durch Immunfärbung mit D90 zwei Banden.

Die Expression der TAP-Ketten in allen Zelllinien war annähernd gleich (dieses Phänomen wurde z.B. auch bei Saveanu et al. (2001), Alberts (1999) und Daumke (2000) beobachtet). Da unterschiedliche Transfektionsbedingungen (z.B. unterschiedliche DNA-Mengen und Zellzahl) eingesetzt wurden, kann dieses Phänomen nicht auf eine gleiche Transfektionseffizienz zurückgeführt werden. Es deutet eher auf eine posttranskriptionale und/oder posttranslationale Regulation der TAP-Expression hin. Studien z.B. zum Abbaumechanismus von TAP könnten dazu beitragen, dieses ausgeglichene TAP-Expressionsverhalten zu erklären.

Sehr schwache Expression zeigte die TAP-Kette 2V1 (siehe **Abbildung IV.8.**), wenn sie einzeln exprimiert wurde. Diese schwache Expression wurde in allen untersuchten Klonen der Zelllinie 2V1 festgestellt (auch aus Klonen einer erneuten Transfektion) (siehe **Abbildung**

**IV.10.**) Dies deutet auf einen schnellen intrazellulären Abbau der Faltungsunstabilen 2V1 und schließt eine geringe Transkriptionseffizienz aus. Die Koexpression von 2V1 mit einer anderen Kette (mit TAP1, 1V2 oder 1N2) führt zur Stabilisierung von 2V1. Die V-Region von TAP2 scheint damit eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Proteins beizutragen. Die schwache Expression von 2V1 wurde mit der Zeit noch schwächer, sodaß nur einige Untersuchungen an dieser Zelllinie durchgeführt werden konnten.



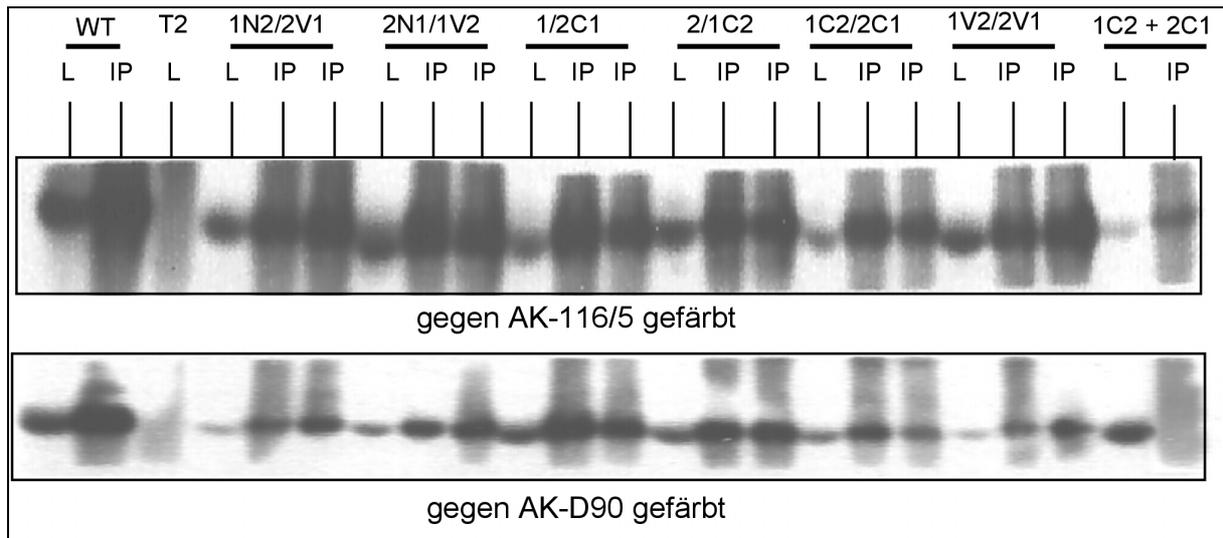
**Abbildung IV.10.** Westernblotanalyse verschiedener Klone der Zelllinie 2V1. Von jeder der angegebenen Klone und Zelllinien wurden TX-100 Lysate von  $1 \times 10^5$  Zellen auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend erfolgte eine Immunfärbung mit dem Antiserum D90 und 116-5. TAP-WT zeigt zwei starke Banden, die TAP1 und TAP2 entsprechen. Die Klone D4.11, F7.11 und G7.11 zeigen sehr schwache Expression von 2V1. Der Klon E7.11 zeigt gar keine.

### 3. Untersuchung des Assoziationsverhalten der TAP-Chimären

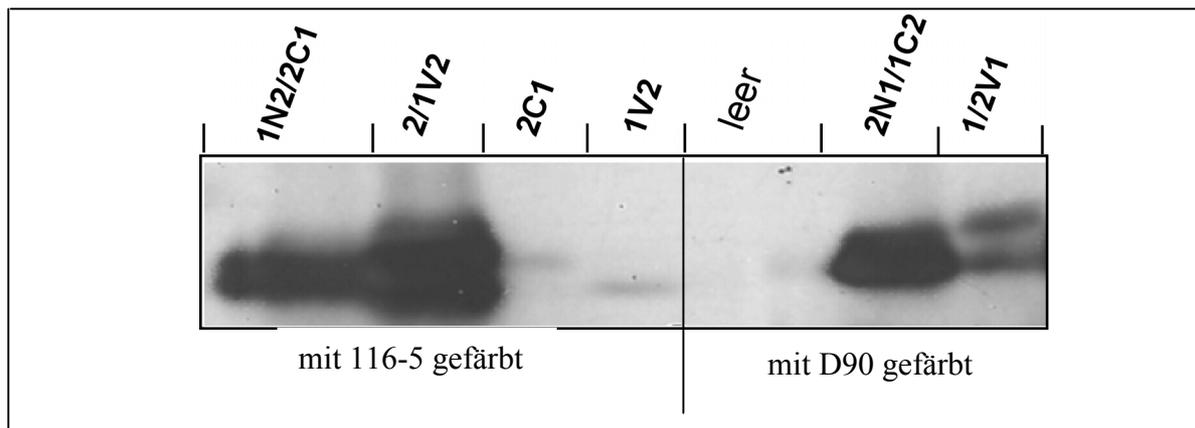
Kopräzipitationsstudien (siehe **Abschnitt. III.3.13.**) konnten zeigen, dass in allen hergestellten Doppelketten exprimierenden Zelllinien die beiden TAP-Untereinheiten einen Heterodimer bilden. Dies ist die Voraussetzung für einen funktionalen TAP-Transporter (Spies et al. 1992). Überdies zeigt die Kopräzipitation, dass beide TAP-Ketten in der selben T2-Zelle exprimiert werden.

Für 2/1V2, 12V1, 1N2/2C1 und 2N1/1C2 die Kopräzitationsstudien wurden mit dem monoklonalen Antikörper Mac 394 (gerichtet gegen C2) durchgeführt. Für alle anderen Ketten wurde das Antiserum 116-5 (gegen C-Terminus von TAP2 gerichtet, siehe **Abschnitt. II.9.**) eingesetzt.

A.



B.

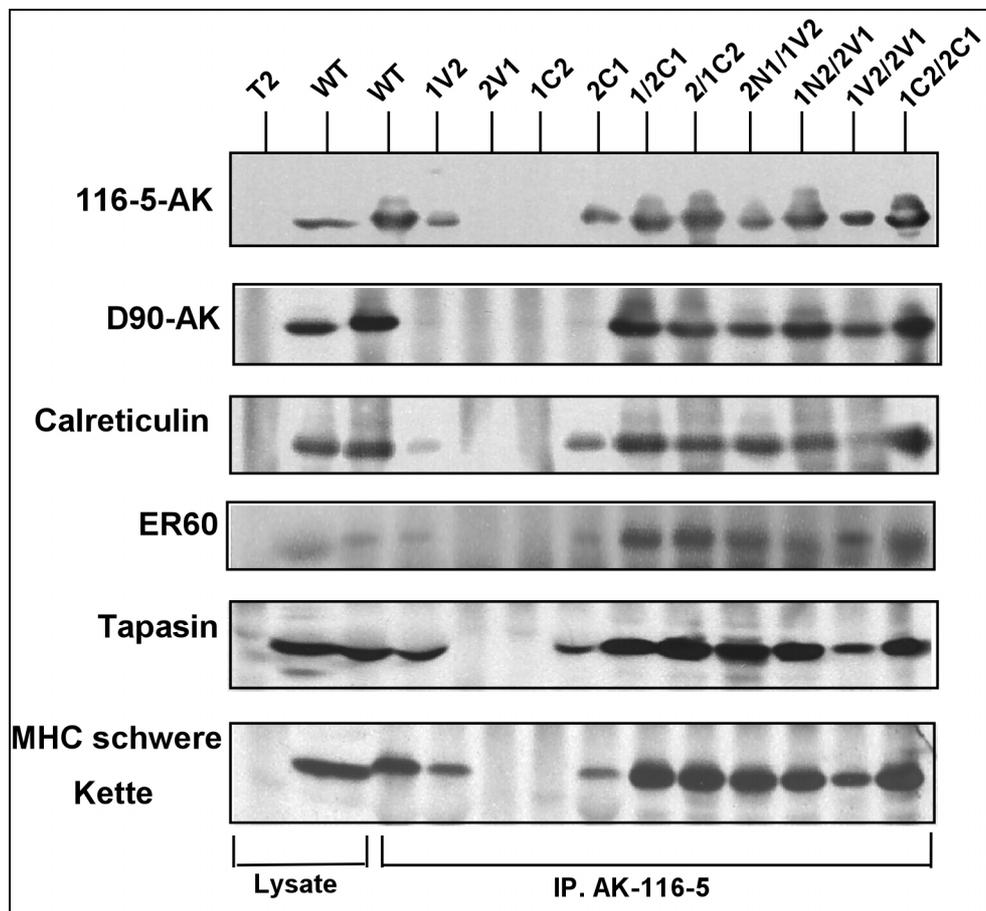


**Abbildung IV.11. Kopräzipitation beider in einer Zelllinie exprimierenden TAP-Ketten.** Triton X-100 Lysate von  $1 \times 10^7$  Zellen wurden über Nacht mit an Protein A-Sepharose gekoppeltem Antikörper des Antiserum 116-5- (A) oder Mac394 (B) inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Sepharose wurden die gebundenen Proteine mit 2 x SDS-Probenpuffer eluiert und einer Westernblotanalyse mit den angegebenen Seren bzw. Antikörper unterzogen. Als Kontrolle wurde in A Lysate von den Zelllinien 1C2 und 2C1 gemischt und für die Immunpräzipitation eingesetzt. In B wurden als Kontrolle die Zelllinien 1V2 und 2C1. Ip steht für Immunpräzipitat. L steht für Zelllysat.

#### 4. Untersuchung der MHC-Ladekomplexbildung

Die TAP-abhängige Peptidbeladung von MHC-Klasse I-Molekülen ist von der Bildung des MHC-Ladekomplexes, bestehend aus schwere MHC-Kette,  $\beta_2$ -Mikroglobulin, Tapasin, ER60, TAP und Calreticulin, abhängig (siehe **Abschnitt I.1.**). Hier wurde untersucht, ob auch

die neuen TAP-Chimären MHC-Ladekomplexe bilden können. Da die Transmembrandomäne, die mit den Komponenten des MHC-Ladekomplexes interagieren, intakt geblieben sind, ist keine Beeinträchtigung in der MHC-Ladekomplexbildung zu erwarten. Ferner konnten Daumke et al. (2001) zeigen, dass Austausche der Nukleotidbindedomänen keinen Einfluß auf die Bildung des Ladekomplexes haben. Aus diesem Grund wurde die Untersuchung der MHC-Komplexbildung exemplarisch an acht TAP-Chimären gezeigt. Alle untersuchten Zelllinien zeigten normale MHC-Ladekomplexbildung. Diese zeigt, dass die vorgenommenen Domänenaustausche die Integration der TAP-Chimären in die ER-Membran und die Interaktion mit den akzessorischen Proteinen nicht beeinträchtigt haben.

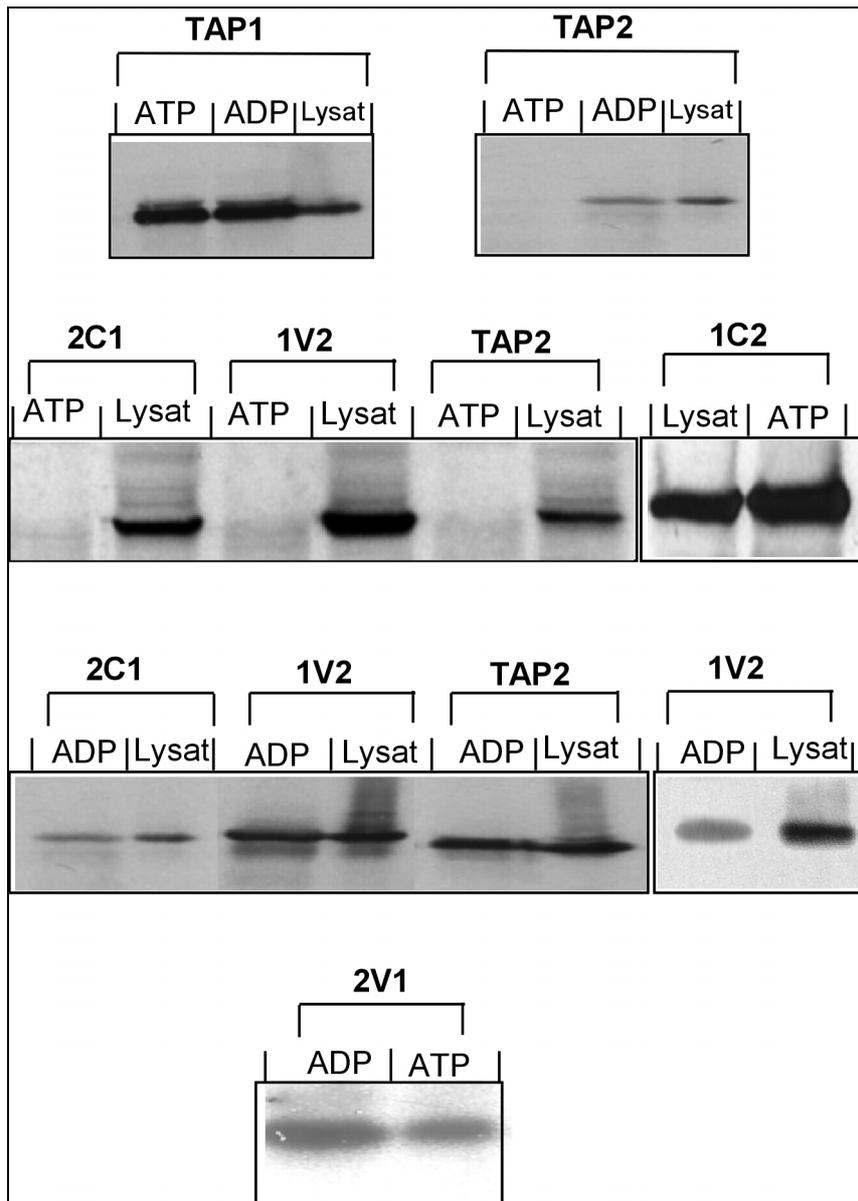


**Abbildung IV.12. Charakterisierung der Ladekomplexbildung in den neuetablierten Zelllinien.**  $1 \times 10^7$  Zellen der angegebenen T2-Transfektanten wurden in Digitonin lysiert und einer Immunpräzipitation mit dem Antiserum 116-5 unterzogen. Präzipitiertes Material wurde mit  $60 \mu\text{l}$   $100 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH 9) eluiert und mit nichtreduzierendem  $2 \times$  Probenpuffer für die Detektion von Calreticulin bzw. reduzierendem für die Detektion aller anderen Komponenten des Komplexes versetzt. Die Proben wurden auf einem  $10\%$  SDS Acrylamidgel aufgetrennt

und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Durch Immunfärbung mit dem Antiserum D90 (gegen TAP1, 1C2, 2N1 und 2V1), dem Antiserum 116-5 (gegen TAP2, 1V2, 2C1 und 1N2), dem Antikörper 3B10.7 gegen MHC-schwere Kette, dem Antiserum R.gp48N gegen Tapasin und den Antiseren gegen Calreticulin und ER60, konnte die Kopräzipitation aller Komponenten des MHC-Ladekomplexes nachgewiesen werden. Als negative Kontrolle dienten die Zelllinien T2, 2V1 und 1C2.

## 5. Nukleotidbindeverhalten der TAP-Chimären

Nun sollte geprüft werden, welchen Einfluß der Austausch der variablen C-terminalen V-Regionen bzw. der Kern-NBDs auf das Nukleotidbindeverhalten von TAP hat. Alberts et al. (2001) zeigten, daß sowohl TAP1 als auch TAP2 gute Affinität zu ADP haben, während ATP präferentiell von TAP1 gebunden wird. Zunächst wurden die TAP-Einzellketten auf ihre Affinität zu Nukleotidagarosen (siehe **Abschnitt III.3.15.**) geprüft. **Abbildung IV.13.** zeigt die Westernblotanalysen der Nukleotidbindeassays. Die TAP-Ketten 1V2, 2C1, 1C2. und 2V1 konnten an ADP-Agarose binden. Das ATP-Bindeverhalten von NBD1 und NBD2 wurde dagegen stark vom C-terminus beeinflusst. 1C2 zeigte starke Affinität zu ATP. Daumke et al. (2001) konnten keine ATP-Bindung an 1N2 (Daumke et al. als 1/2 bezeichnet) beobachten. Die 1C2-Kette wurde durch den Austausch des C-Terminus von 1N2 (siehe **Abschnitt IV.A.1.b.**) gegen V1 (C-Terminus von NBD1) generiert. Die 2V1-Kette, die durch den Austausch des C-terminus von TAP2 entstanden ist, zeigt auch Affinität zu ATP. Dies zeigt, daß die NBD2 durch den Austausch des C-Terminus neue strukturelle Eigenschaft gewinnt, die ihr erlaubt ATP zu binden. Umgekehrtes gilt für 1V2 und 2C1, die eine NBD1 mit ausgetauschtem C-Terminus besitzen (siehe **Abbildung IV.7.**). Sie konnten nicht an ATP binden. Durch den Austausch ihres C-Terminus verliert die NBD1 ihre Fähigkeit ATP zu binden. Da alle Konstrukte ADP und / oder ATP binden können, ist davon auszugehen, dass die Domänenaustausche nicht zu gravierenden Faltungsproblemen in den NBDs geführt haben.



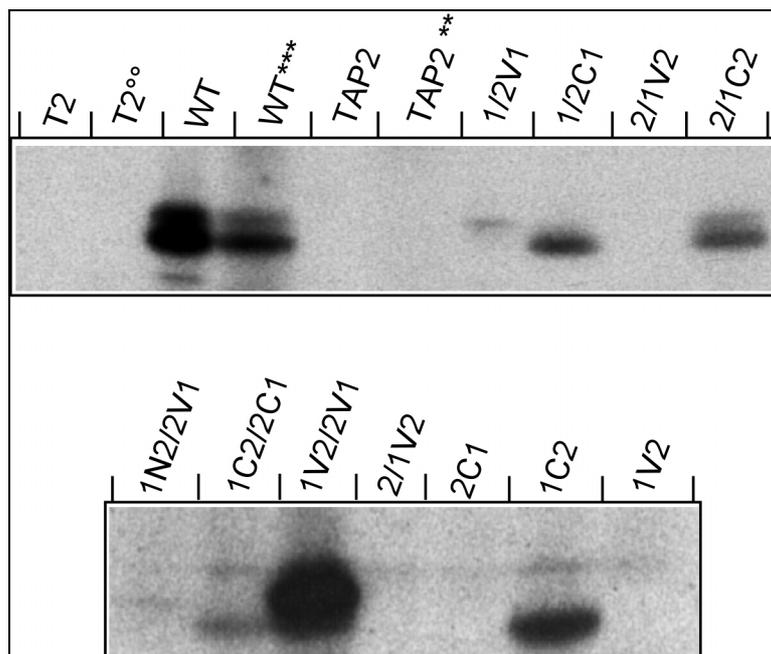
**Abbildung IV.13. Untersuchung zur Bindung der TAP-Einzellketten an Nukleotidagarose.** Pro Nukleotidbindeansatz wurden Membranen aus  $1 \times 10^7$ -Zellen in  $220 \mu\text{l}$  2 % Chaps oder 1 % Triton X-100 in TBS/MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4) lysiert. Für 2V1 wurden ca.  $1 \times 10^8$  Zellen verwendet. Unlysiertes Material wurde abzentrifugiert,  $20 \mu\text{l}$  wurden für Westernblotanalyse entnommen und der Rest des Übersands auf die Agarose gegeben und 45-60 min. bei 4°C auf einem Überkopffroller inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch sechsmaliges Waschen mit 1 ml 2 % Chaps in TBS/MgCl<sub>2</sub> oder 1 % Triton X-100 in TBS/MgCl<sub>2</sub> entfernt. Gebundene Proteine wurden durch Zugabe von  $50 \mu\text{l}$  2 x Probenpuffer / 7% Mercaptoethanol und 15 minütiges Schütteln bei RT eluiert und auf 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Blotten erfolgte die Immunfärbung mit den Antiseren D90 (für TAP1, 1C2 und 2V1) oder 116-5 (für TAP2, 2C1 und 1V2).

Diese Nukleotidbindeigenschaften konnten für 1V2, 1C2 und 2C1 durch 8-Azido-ATP-Kreuzvernetzung (siehe **Abschnitt III.3.16.**) bestätigt werden (**Abbildung IV.14.B.**). Da 2V1

sehr schwach exprimiert wird und im Laufe der Zeit immer mehr an Expression verlor, konnte sie für „später durchgeführte Untersuchungen“ wie ATP-Kreuzvernetzung nicht eingesetzt werden.

Die 8-Azido-ATP-Kreuzvernetzungsstudien wurden auch an TAP-Chimären durchgeführt (siehe **Abbildung 14.A.**). Das Nukleotidbindeverhalten der einzeln exprimierten TAP-Ketten, wurde nicht durch ihre Koexpression mit einer anderen TAP-Kette beeinflusst. Eine Ausnahme zeigte die 1/2V1. ATP-Bindung konnte nur an der 2V1-Kette festgestellt werden. Die TAP1-Kette, die normalerweise gutes ATP-Bindeverhalten zeigt, wurde durch die Paarung mit 2V1 „negativ“ beeinflusst.

Die Nukleotidbindeuntersuchungen zeigen, daß einerseits der C-Terminus von TAP entscheidenden strukturellen Einfluß auf die Nukleotidbindedomänen nimmt, und andererseits, daß ATP-Bindung der NBD2 strukturellen Einfluß auf die mit ihr gepaarte NBD1 haben kann.



**Abbildung IV.14. 8-Azido-ATP-Kreuzvernetzung.** Membranen von je  $1 \times 10^7$ -Zellen wurden in 100  $\mu$ l 1% Triton X-100 / ATP-Bindepuffer solubilisiert und unlösliches Material durch Zentrifugation abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10  $\mu$ Ci 8-Azido-[ $\alpha$ - $^{32}$ P]-ATP für ca. 15 min. im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Kreuzvernetzung durch Bestrahlung mit einer 365 nm UV-Lampe für 10 min. Die Proben wurden mit 1% Triton X-100 / ATP-Bindepuffer auf 400  $\mu$ l aufgefüllt und einer Immunpräzipitation mit dem Antiserum D90 oder 116-5 unterzogen. Unspezifisch gebundenes Material wurde durch viermaliges Waschen mit 1% Triton X-100 in TBS/MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4) entfernt. Die präzipitierten Proteine wurden mit UREA-Probenpuffer eluiert, auf einem 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt

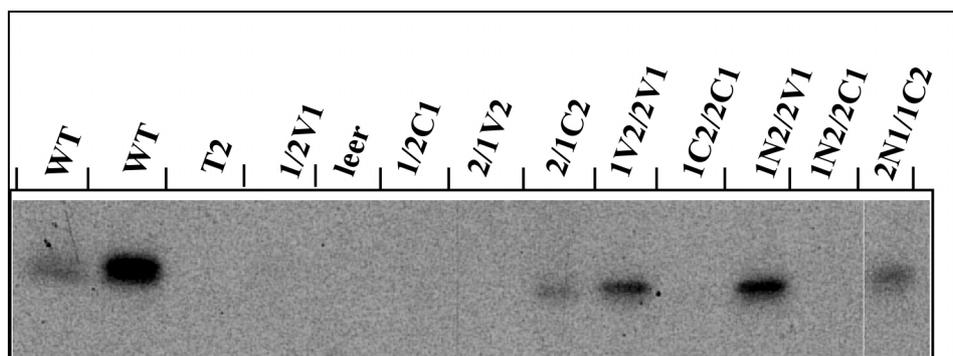
und autoradiographisch analysiert (siehe III.3.8.). (B) zeigt das Ergebnis der 8-Azido-ATP-Kreuzvernetzung der Einzelketten. Membranen vorinkubiert mit D90 (\*\*\*) oder 116-5 (\*\*).

## 6. Peptidbindeverhalten der TAP-Chimären

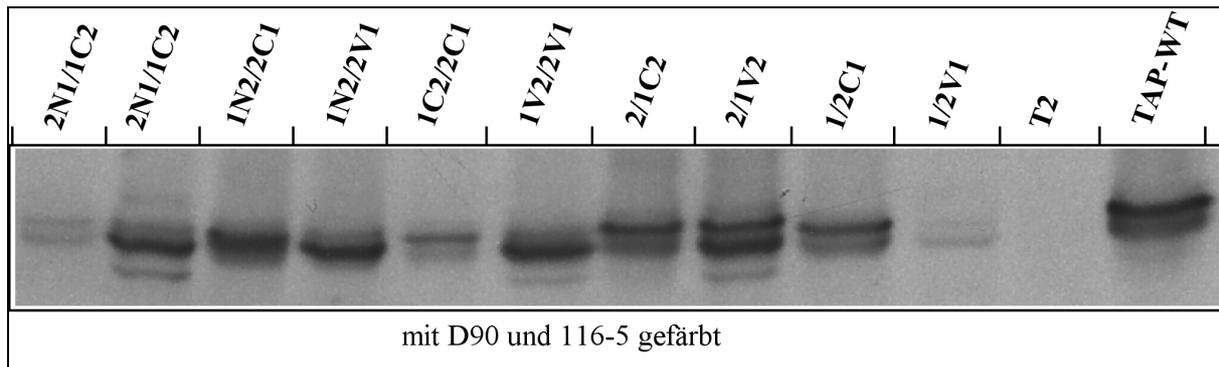
Da eine starke Korrelation zwischen der Nukleotidbindung und Peptidbindung besteht (van Endert 1999, Knittler et al. 1999, Saveanu et al. 2001), sollte untersucht in wieweit der beobachtete Einfluß des C-Terminus auf die Nukleotidbindung auch auf die Peptidbindeeingenschaft der TAP-Chimären übertragen wird. Hierzu wurden Peptidkreuzvernetzungsstudien (siehe **Abschnitt III.3.20.**) an Mikrosomen oder Membranen der TAP-Chimären, TAP-WT als positive und T2 als negative Kontrollen durchgeführt. Als Substrat wurde das S8-Peptid (TVDNKTRYR), ein optimales Bindepeptid für TAP<sup>a</sup>, eingesetzt (Deverson et al. 1998). In der **Abbildung IV.15.** sind die Ergebnisse der autographischen Analyse dargestellt.

Keine Peptidbindung wurde für die Chimären 1/2C1, 2/1V2, 1C2/2C1 und 1N2/2C1 beobachtet. Dagegen konnten 1/2V1, 2/1C2, 1V2/2V1, 1N2/2V1 und 2N1/1C2 Peptid binden, wobei 1/2V1 sehr niedrigere Peptidaffinität zeigte (durch das Scannen ist die Bandenintensität von 1/2V1 noch schwächer zu sehen). Das Peptidbindeverhalten hängt von den unterschiedlichen Kombinationen von C- und V-Regionen der NBDs ab. Im Allgemeinen ist zu beobachten, dass alle Transporter, die eine NBD-Untereinheit (C1V2) bestehend aus der Kern-NBD von TAP1 (C1) und der V-Region von TAP2 (V2) enthalten, kein Peptid binden können. Dagegen ist Peptidbindung festzustellen, wenn eine NBD des Transporters aus der Kern-NBD von TAP2 (C2) und der V-Region von TAP1 (V1) besteht.

A.



**B.**



**Abbildung IV.15. A. Peptidkruzvernetzungsstudien an den TAP-Chimären.** Membranen von  $2 \times 10^7$  TAP-WT-Zellen und Mikrosomen von ca.  $3 \times 10^7$  Zellen aller anderen Zelllinien wurden mit  $15 \mu\text{l}$  einer  $8 \mu\text{M}$  HSAB-konjugierte  $^{125}\text{I}$  markierte Peptidlösung unter Rotlicht versetzt. Nach Inkubation auf Eis für 5 min, erfolgte die Kreuzvernetzung durch fünf minütige Bestrahlung bei 254 nm. Die Membranen wurden anschließend abzentrifugiert und mit TX-100 / PBS solubilisiert. Unlösliches Material wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde für eine Immunpräzipitation mit den Antikörpern 116/5 oder D90 eingesetzt. Nichtspezifisch gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit 1 ml Triton X-100 entfernt. Die Elution präzipitierter Proteine erfolgte mit  $50 \mu\text{l}$  UREA-Probenpuffer. Anschließend wurden die eluierten Proteine auf einem 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Autoradiographie analysiert. WT-Membranen wurden nach der Kreuzvernetzung mit 116-5 (WT-Probe links) oder mit D90 (WT-Probe rechts) immunpräzipitiert. **B.** Westernblotanalyse der eingesetzten Mikrosomen.

## 7. Untersuchungen zur Funktionalität der TAP-Chimären

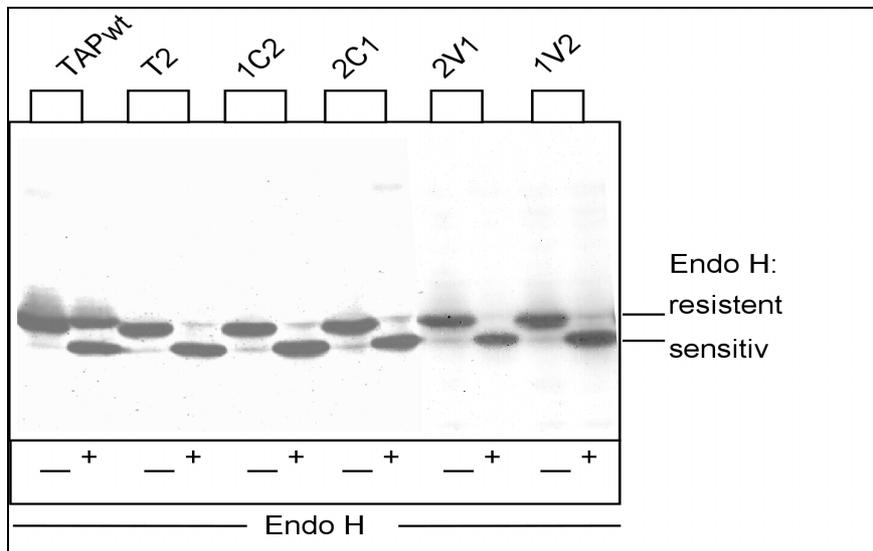
Um zu untersuchen, welche der TAP-Chimären einen funktionalen Transporter besitzen, wurden drei unabhängige Studien zur TAP-Aktivität durchgeführt. Alle drei Experimente wurden ausführlich in den **Abschnitten III.3.14.** (Untersuchung der intrazellulären MHC-Klasse I-Reifung), **III.3.21.** (Peptidtransportassay) und **III.3.22.** (Untersuchung der MHC-Klasse I-Zelloberflächenexpression) erklärt.

### 7.1. Untersuchung der intrazellulären MHC-Klasse I-Reifung

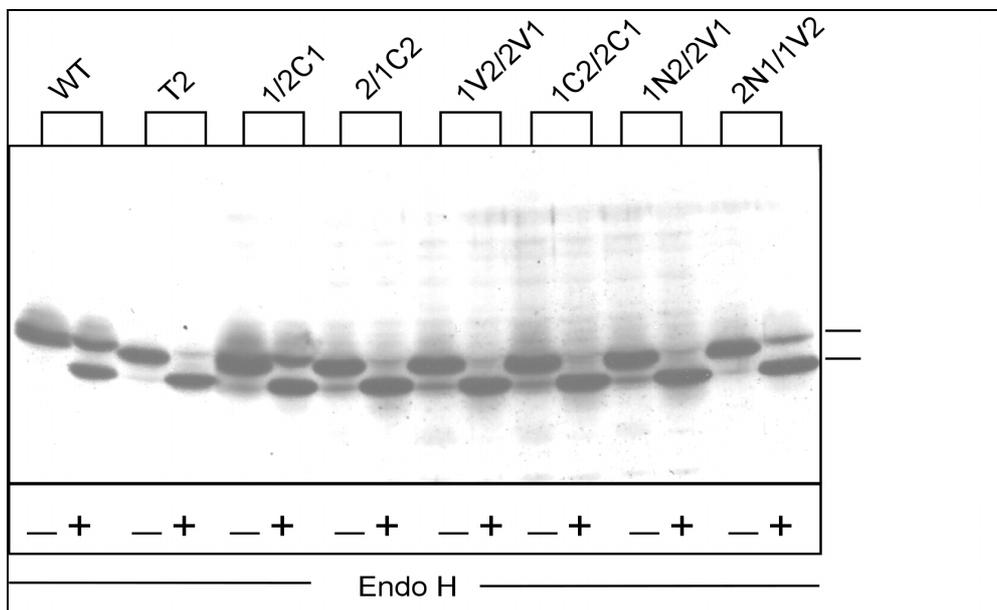
MHC-Klasse I-Moleküle, die mit Peptid nicht beladen werden, werden im ER zurückgehalten. Ihre unmodifizierten Zuckerreste sind gegen Endoglykosidase H sensitiv. Die MHC-Klasse I-Moleküle, die Peptide gebunden und das ER verlassen haben, sind aufgrund der Modifizierung ihrer Zuckerreste EndoH-resistent. In T2-Zellen ist die Beladung der

meisten MHC-Klasse I-Molekülen TAP-abhängig. Damit ist die EndoH-Sensitivität ein indirekter Beweis für TAP-Aktivität (siehe **Abschnitt III.3.14.**). In **Abbildung IV.16.** sind die Westernblotanalysen der mit EndoH behandelten Zelllysate und deren Quantifizierungen dargestellt. Die MHC-Klasse I-Moleküle der Zelllinie 2/1C2 zeigen höhere EndoH-Resistenz als die TAP-negative T2-Zelllinie. Im Vergleich zu TAP-WT zeigt 2/1C2 ca. 50 % EndoH-Resistenz. 1N2/2V1, eine identische Nukleotidbindekassette zu 2/1C2 besitzt, zeigt ca. 20% EndoH-Resistenz. Alle anderen Zelllinien zeigen eine der TAP-negativen T2-zelllinie vergleichbare hohe Sensitivität gegenüber EndoH. Demnach beeinflussen die Domänenaustausche in TAP funktionelle Mechanismen des Transporters.

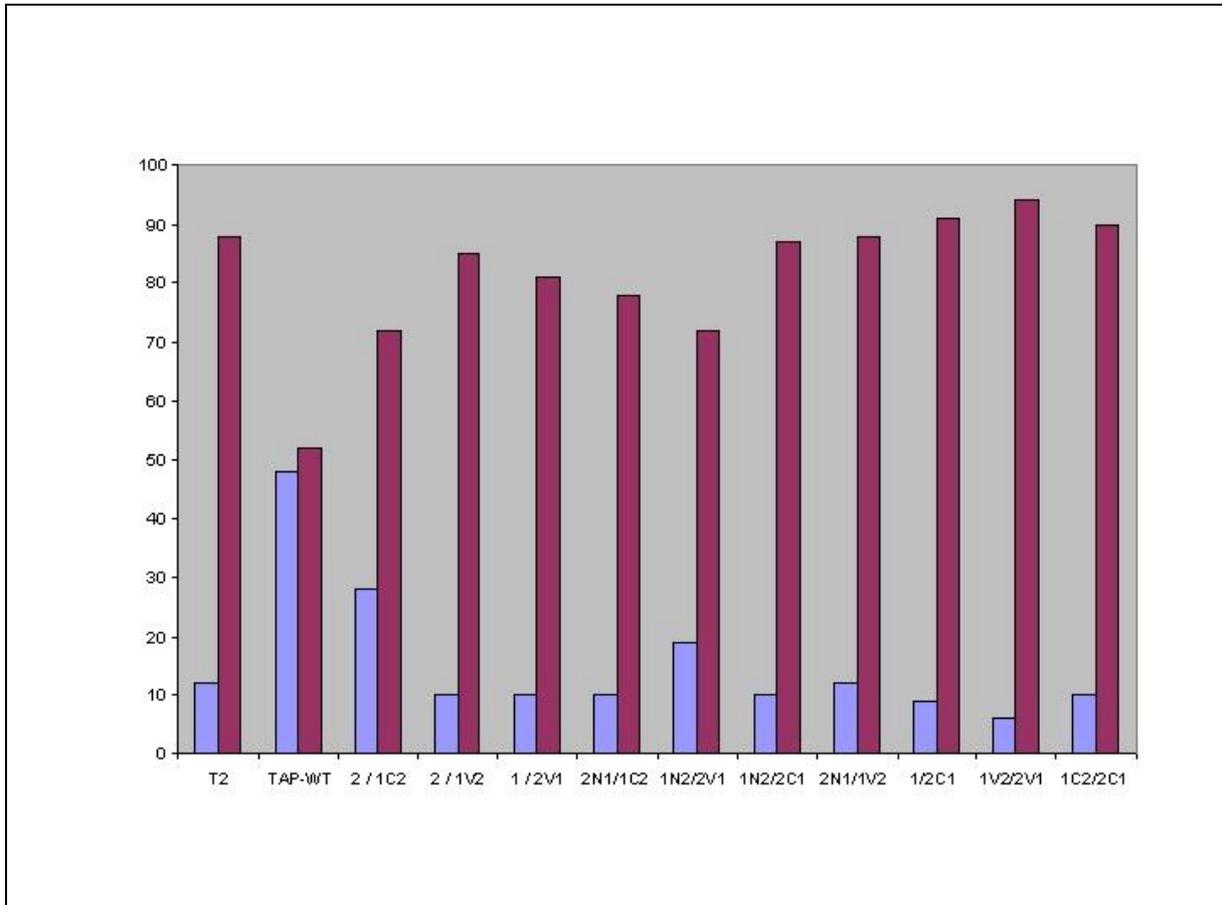
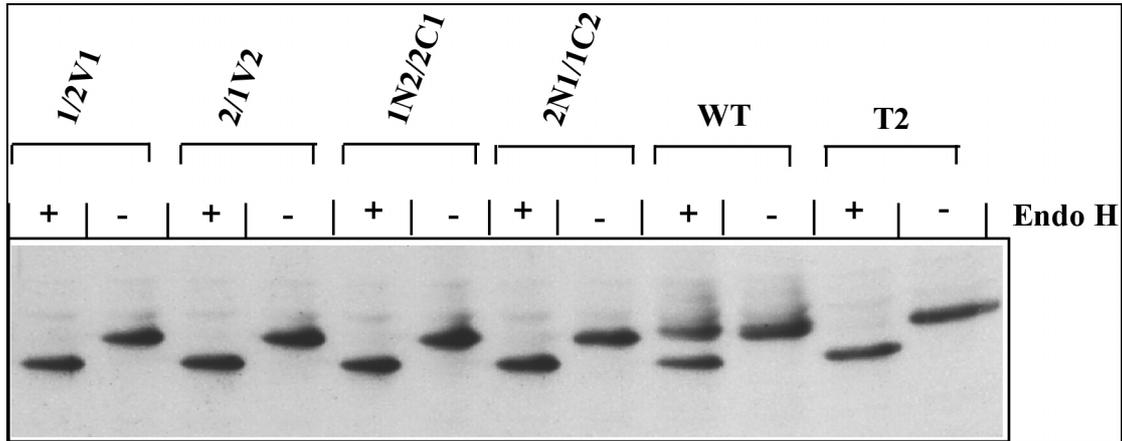
**A.**



**B.**



C.



**Abbildung IV.16. Untersuchung der intrazellulären MHC-Klasse I-Reifung TX-100** – Lysate von  $1 \times 10^5$  Zellen der Einzelketten (A) bzw. Doppelketten exprimierenden T2-Zelllinien (B und C) wurden mit 20  $\mu$ l Endo H-Inkubationspuffer für ca. 30 min. bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 7,5 mU Endo H zugegeben und bei 37°C für 12-16 Stunden inkubiert. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Endo H. Die Proben wurden anschließend mit 15  $\mu$ l 2 x Probenpuffer versetzt, ca. 15 min. bei RT geschüttelt und

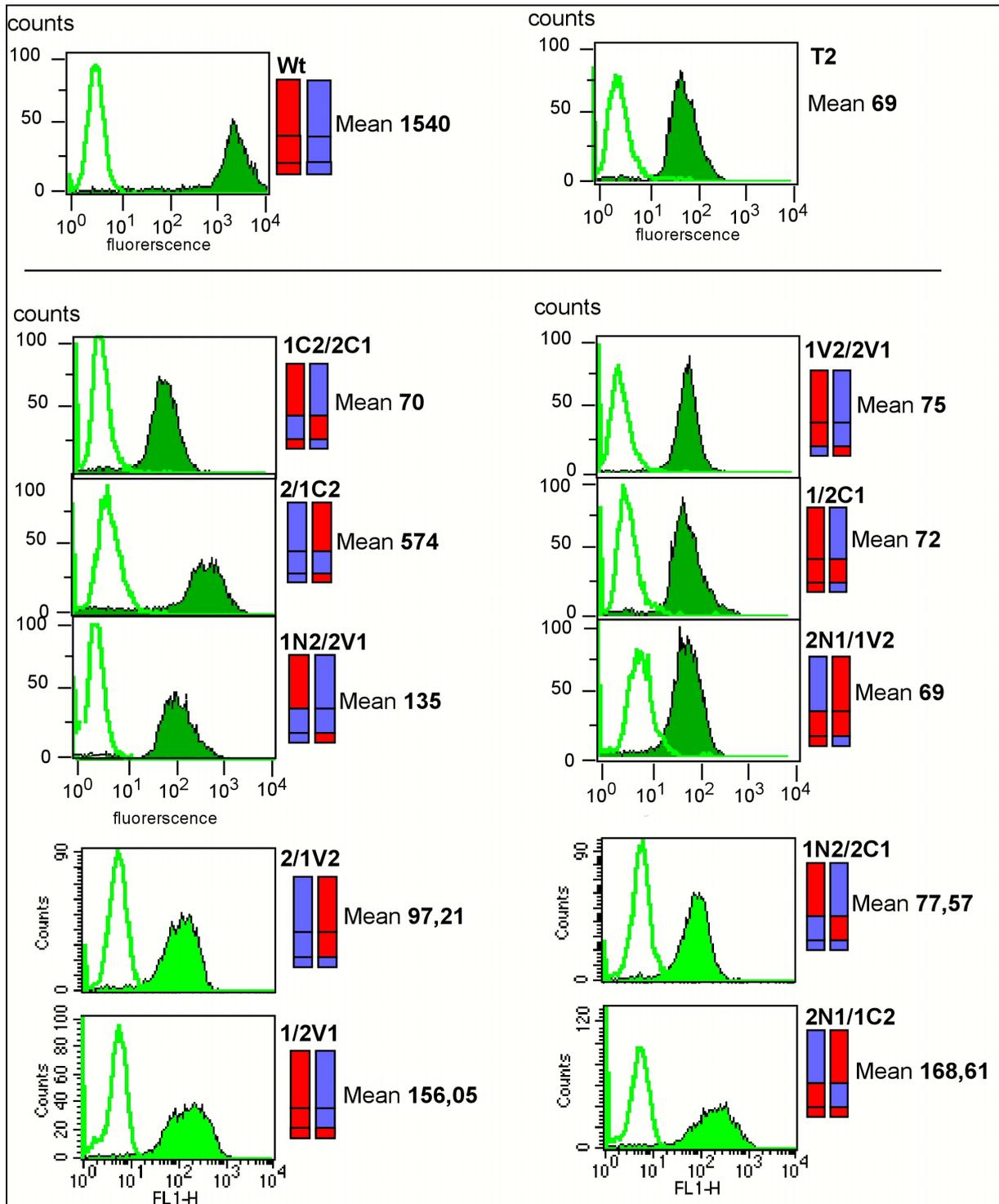
ca. 8 min. bei 65°C inkubiert. Die Proteine wurden auf 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Blotting wurde das Laufverhalten der MHC-I-schwere Kette durch Immunofärbung mit dem monoklonalen Antikörper (3B10.7) bestimmt. Wegen ihres reduzierten Molekulargewichts laufen Endo H-sensitive Moleküle im SDS-Gel weiter als EndoH-resistente. Die Intensität der Banden von Endo H-resistenten und sensitiven MHC-schwere Ketten wurden quantifiziert, die Werte normalisiert und graphisch dargestellt.

## 7.2. Untersuchung der MHC-Klasse I-Zelloberflächenexpression

Die T2-Zelllinie zeigt wegen der TAP-Defizienz eine stark reduzierte Oberflächenexpression von MHC-Klasse I-Molekülen im Vergleich zur Ursprungszelllinie T1 (Salter et al. 1985). Durch die Transfektion von T2-Zellen mit den cDNAs von Ratten-TAP1 und TAP2 wurde die MHC-Klasse I-Oberflächenexpression wiederhergestellt (Momburg et al. 1992). T2-Zellen exprimieren die MHC-Klasse I-Allele HLA-B5 und HLA-A2. Während HLA-A2 auch TAP-unabhängig Signalpeptide laden kann (Wei et al. 1992), wird HLA-B5 TAP-abhängig mit Peptid beladen. Die Oberflächenexpression von HLA-B5 ist damit ein indirekter Indikator für die Aktivität von TAP.

Zur Untersuchung der Aktivität der hergestellten TAP-Chimären wurde mittels FACS-Analyse (siehe **Abschnitt III.3.22.**) die Oberflächenexpression von HLA-B5 mit Hilfe des konformationsspezifischen Antikörpers 4E bestimmt.

Die Ergebnisse (siehe **Abbildung IV.17.**) bestätigen die Aktivität von 2/1C2. Sie zeigen eine durchschnittliche antikörpervermittelte HLA-B5-Oberflächenfluoreszenz von 574 und erreicht damit ca. 38 % der bei TAP-WT gemessenen Oberflächenfluoreszenz. Dem EndoH-Verdau entsprechend zeigt die 1N2/2V1-Zelllinie mit 135 durchschnittliche Oberflächenfluoreszenz eine Expression über den TAP-negativen T2-Hintergrund (69 durchschnittliche Oberflächenfluoreszenz). Ähnliche Werte zeigen die Zelllinien 1/2V1 und 2N1/1C2 mit jeweils 156 und 168 durchschnittliche Oberflächenfluoreszenz. Diese Werte wurden durch drei unabhängige FACS-Analysen bestätigt. Alle anderen Zelllinien zeigen ähnliche Werte wie die von den TAP-negativen T2-Zellen, was die Ergebnisse des EndoH-Verdaus bestätigt



**Abbildung IV.17. Analyse der Oberflächenexpression von HLA-B5 in allen etablierten TAP-Doppelketten exprimierenden Zelllinien.**  $5 \times 10^6$ -Zellen wurden zweimal mit kaltem DFN gewaschen und in 1 ml kaltem DFN resuspendiert. 25  $\mu$ l davon wurden mit dem monoklonalen Anti-HLA-B5-Antikörper (4E) oder mit 50  $\mu$ l DFN, als negative Kontrolle (nicht ausgefüllte Histogramme), bei 4°C für 30 min. inkubiert. Nicht spezifisch gebundene Antikörper wurden durch viermaliges Waschen mit jeweils 200  $\mu$ l DFN entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper (goat anti mouse IgG-FITC) im Dunkeln bei 4°C für 30 min. Nicht spezifisch gebundene Antikörper wurden durch viermaliges Waschen mit jeweils 200  $\mu$ l DFN entfernt. Die Zellen wurden in 600  $\mu$ l DFN resuspendiert. Unmittelbar vor der Messung im FACScan wurden 3  $\mu$ l

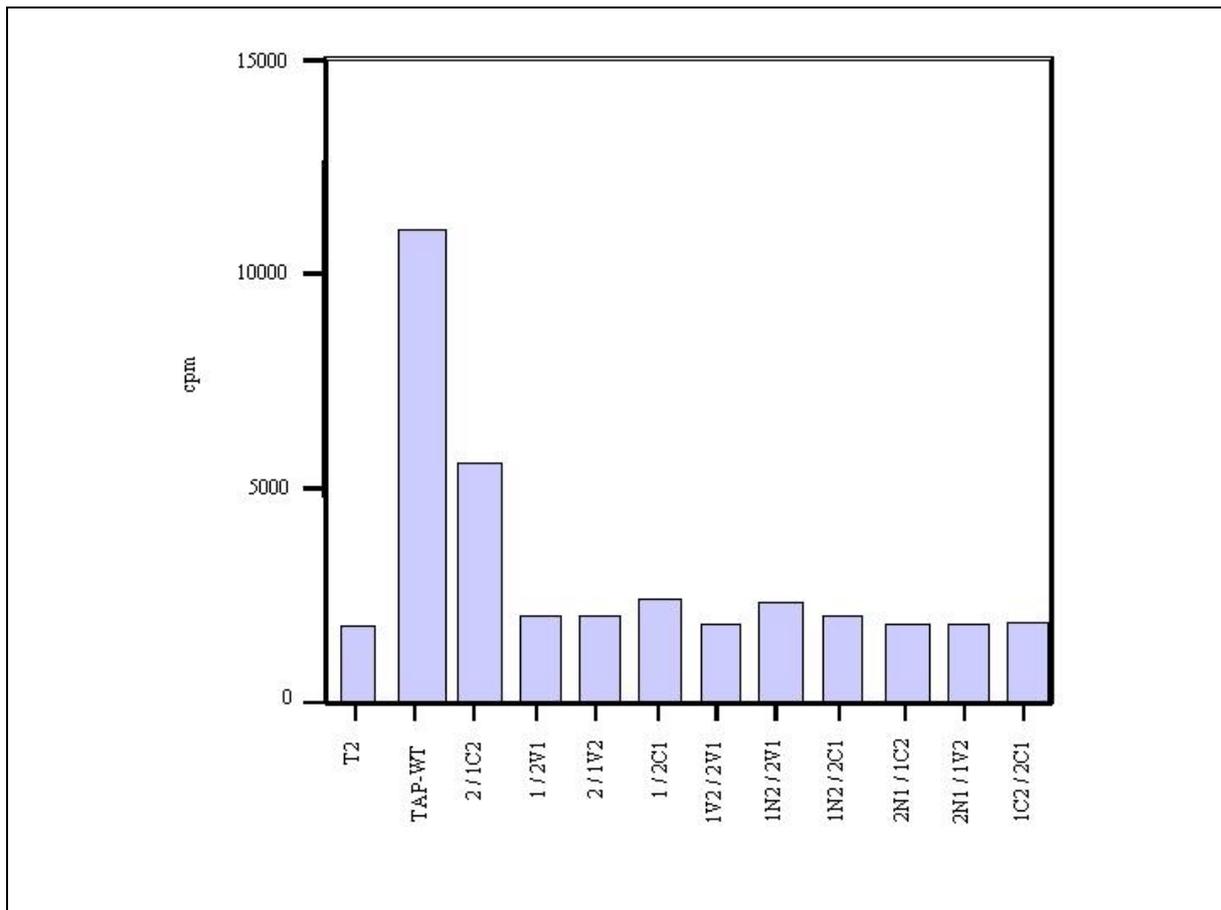
Propidiumiodid zugegeben. Propidiumiodid färbt die toten Zellen. Durch den Emissionsspektrumunterschied zwischen Propidiumiodid (550-720 nm) und FITC (490-590 nm) können die toten Zellen identifiziert und ausgeschlossen werden. Je 10000 Zellen wurden im FACScan analysiert (ausgefüllte Histogramme). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität ist jeweils durch die Mean-Zahl angegeben.

### 7.3. Peptidtransportassay

Der Peptidtransport wurde nach Neefjes et al. (1993) durchgeführt (siehe **Abschnitt III.3.21.**).

Der Assay zeigt Transportaktivität nur bei 2/1C2 (siehe **Abbildung IV.18.**) und bestätigt damit die Ergebnisse der FACS-Analyse und des EndoH-Verdau. Die beim EndoH-Verdau und durch die FACS-Analyse ermittelte geringe Aktivität von 1N2/2V1, 1/2V1 und 2N1/1C2 wurde allerdings hier nicht bestätigt. Mögliche Erklärung dafür wäre, dass dieser Transportassay für quantitative Studien nicht geeignet ist. Möglicherweise wird eine geringe Transportaktivität von TAP nicht detektiert. Schmitt & Tampe (2000) berichten über mögliche Probleme bei diesem Transportassay. Die ins ER transportierten Peptide können nicht nur glykosiliert werden, sondern sie könnten auch wieder ins Zytosol transportiert, getrimmt oder abgebaut werden. Möglicherweise können diese Peptidverluste bei einem „starken“ Transporter kompensiert werden, nicht aber bei TAP-Chimären mit sehr niedriger Transportaktivität. Hilton et al. 2001 vermuten, dass Peptide nach ihrem TAP-abhängigen Transport zuerst frei ins ER-Lumen diffundieren. Damit stellt sich die Frage, ob nur die Peptide, die möglicherweise frei ins ER-Lumen diffundieren, glykosiliert werden, während diejenigen, die direkt an MHC-Klasse I-Moleküle beladen werden, unmodifiziert bleiben.

Wäre das der Fall, so würde ein „starker“ TAP-Transporter einen Überschuss an Peptiden (zumal werden Peptid und ATP beim Transportassay in Überschuss eingesetzt) transportieren, die nicht alle direkt an MHC-Klasse I-Moleküle beladen werden können. Ein beträchtlicher Teil davon könnte damit ins ER-Lumen diffundieren.



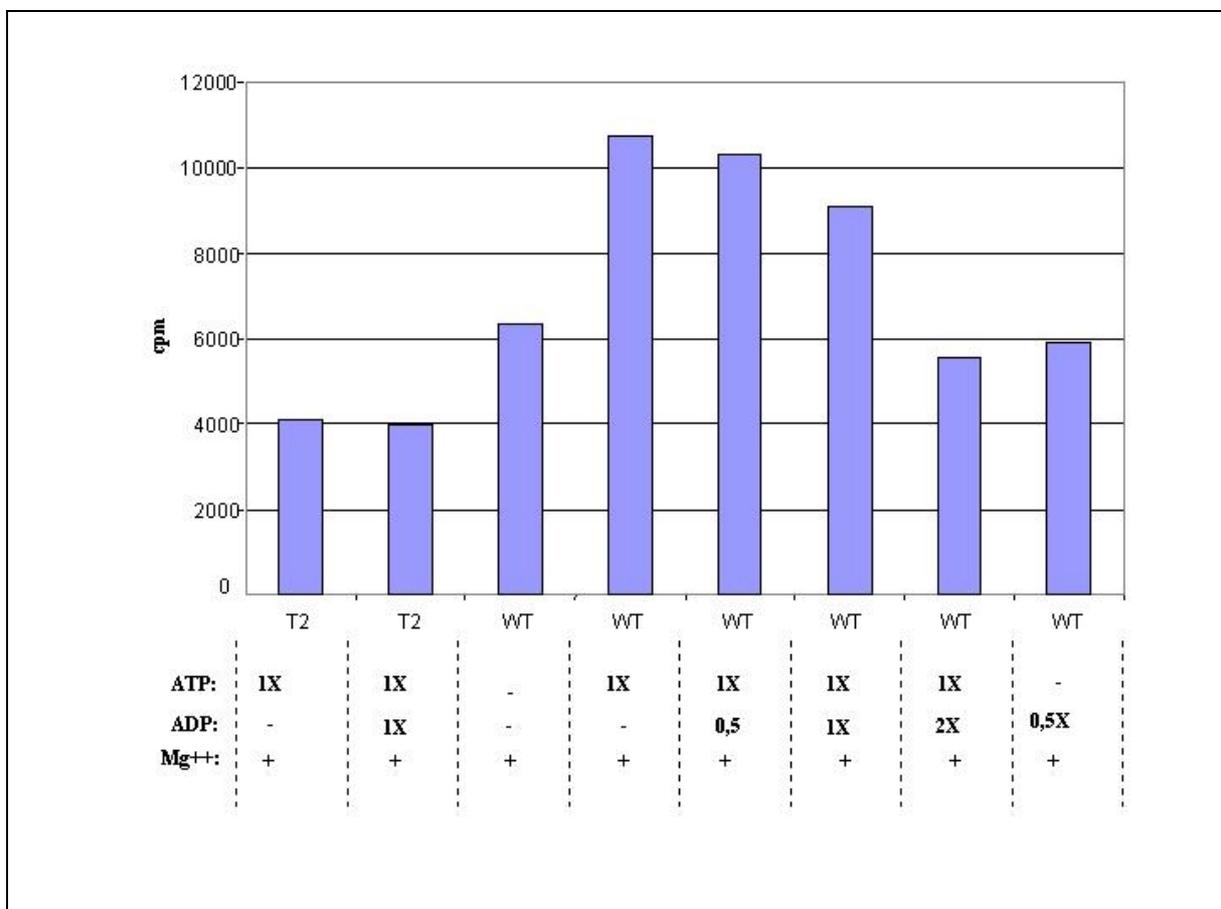
**Abbildung IV.18. Peptidtransportassay.**  $2-3 \times 10^6$  Zellen der angegebenen Zelllinien wurden mit Streptolysin O permeabilisiert und in 80  $\mu$ l Peptidbindepuffer aufgenommen. 5  $\mu$ l einer jodierten 20 mM-Peptidlösung (100 pMol) wurden zugegeben. Die Transportaktivität wurde durch Inkubation bei 37°C für 10 min ermöglicht. Durch Zugabe von 1 ml ConA-Bindepuffer wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen für 5 minütige Inkubation bei RT lysiert. Unlösliches Material wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf 100  $\mu$ l ConA-Agarose gegeben und für 1 Stunde auf einem Überkopffroller bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Agarose mit ConA-Bindepuffer wurde schließlich die  $\gamma$ -Strahlung der glykosylierten und folglich transportierten Peptide gemessen. Die TAP-negativen T2-Zellen dienten als negative Kontrolle. Von jeder zelllinie wurden 2 Proben gemessen und dessen Mittelwert wurde hier eingetragen.

## 8. Einfluß von ADP auf Peptidtransport durch TAP

Die hier durchgeführten Nukleotidbindeassays (siehe **Abschnitt IV.A.5.**) sowie die Ergebnisse anderer Arbeiten (z.B. Androlewicz et al. 1993, Knittler et al. 1999) zeigen, dass TAP gleiche Affinität zu ADP und ATP besitzt. Es stellt sich die Frage, ob TAP selektiv ATP binden kann, oder eine Konkurrenz zwischen ADP und ATP um die Bindung an TAP stattfindet. Im letzteren Fall bestimmt allein die Konzentration von ADP und ATP, welches

Nukleotid bindet. Um dies zu untersuchen, wurde ein Peptidtransportassay in Abhängigkeit vom ATP/ADP-Konzentrationsverhältnis durchgeführt (siehe **Abbildung IV.19.**).

Das Ergebnis zeigt, dass TAP bei einem ATP/ADP-Konzentrationsverhältnis von 1:1 ca. 20 % seiner Aktivität verliert. Bei einem ATP/ADP-Konzentrationsverhältnis von 1:2 erreicht TAP-WT fast die Hintergrundaktivität von TAP-negativen T2-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass ADP um die Bindung an TAP konkurriert und den Peptidtransport inhibiert. Die recht hohe Transportaktivität von TAP bei 1:1 ATP/ADP-Konzentrationsverhältnis deutet jedoch darauf hin, dass möglicherweise TAP während des Transportprozesses höhere Affinität zu ATP besitzt. Das zelluläre ATP/ADP-Konzentrationsverhältnis von ca. 10:1 (Lehninger / Nelson / Cox, 1994) stellt ein weiteres Faktor, das die Bindung von ATP an TAP begünstigt.



**Abbildung IV.19. Peptidtransportassay von TAP-WT in Abhängigkeit vom ATP/ADP-Konzentrationsverhältnis.** Jeweils  $2-3 \times 10^6$  T2- und TAP-WT-Zellen wurden mit Streptolysin O permeabilisiert und in 80  $\mu$ l Peptidbindepuffer, ohne (-) oder mit 0,8  $\mu$ mol ATP sowie ohne (-) oder mit 0,4 (0,5x), 0,8 (1x) oder 16  $\mu$ mol ADP, aufgenommen. 5  $\mu$ l einer jodierten 20 mM-Peptidlösung (100 pMol) wurden zugegeben. Die Transportaktivität wurde durch Inkubation bei 37°C für 10 min ermöglicht. Durch Zugabe von 1 ml ConA-Bindepuffer wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen für 5 minütige Inkubation bei RT lysiert. Unlösliches Material wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf 100  $\mu$ l ConA-Agarose gegeben und für 1 Stunde auf einem Überkopffroller bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Agarose mit ConA-Bindepuffer wurde schließlich die  $\gamma$ -Strahlung der glykosylierten und folglich transportierten Peptide gemessen.

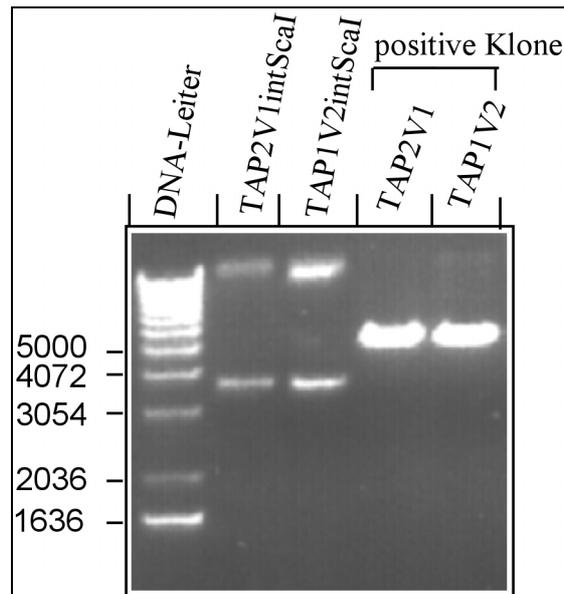
## B. TAP-Deletionsmutanten

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass der C-Terminus einen Einfluss auf die Nukleotidbindeeigenschaft von TAP hat. Basierend hierauf stellte sich die Frage, ob die Kern-NBD alleine die Nukleotidbindekassette bildet und der C-Terminus nur eine regulatorische Funktion hat, in dem er den Zugang von ATP zu der Nukleotidbindekassette verhindert oder begünstigt. Um dies zu untersuchen wurden TAP-cDNAs hergestellt, die jeweils für C-terminal gekürzte TAP1- und TAP2-Proteine ohne die jeweilige V-Region, exprimieren (siehe **Abbildung IV.21.**).

### 1. Herstellung von TAP-Ketten mit deletierten C-terminalen Regionen

Für die Herstellung von TAP-cDNAs, die für ein C-terminal gekürztes TAP-Protein (ohne die V-Region) kodieren wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese Stop-Codons in die cDNAs für TAP1 und TAP2 unmittelbar vor der V-Region eingeführt. Um eine schnelle Überprüfung der Klone durch Restriktionsanalyse zu ermöglichen, wurden die pBIKS-TAP1+intScaI und pBIKS-TAP2+intScaI (siehe **Abschnitt IV.A.1.a.**) verwendet. Durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Primer TAP-V1F und TAP-V1B (siehe **Abschnitt II.6.**) wurden in TAP1+intScaI die Nukleotide **A** 2000 in **G** (Nukleotidpositionen ausgehend von der EcoRI-Klonierungsstelle), **G** 2012 in **T** und **C** 2014 in **A** ausgetauscht. Durch der Rückführung von **A** in **T** (siehe **Abschnitt IV.A.1.a.**) wurde ein degeneriertes Codon (**GCT**) für das Alanin hergestellt (in TAP-WT codiert das Triplet **GCC** für das Alanin) und gleichzeitig die Restriktionsschnittstelle für ScaI entfernt (die ScaI-Erkennungssequenz **AGTACT** wurde in **AGTGCT** überführt). Die anderen Nukleotidaustausche führten zur Generierung eines Opal-Codon (**GGC** für Glycin verändert in Stopcodon **TGA**) (siehe **Abbildung IV.6.**). In TAP2+intScaI wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Primer TAP-V2F und TAP-V2B (siehe **Abschnitt II.6.**) ein Amber-Codon (**TAG**-Stopcodon) eingeführt (durch den Austausch von **G** 2016 in **T**). Gleichzeitig wurde durch den Austausch von **A** 2004 in **G** die ScaI-Schnittstelle deletiert, und **GCT**-degeneriertes Codon für Alanin hergestellt (wie bei TAP1intScaI, siehe Beschreibung oben). Durch Restriktionsverdau mit ScaI konnten die positiven Klone, die nur noch eine Schnittstelle für ScaI enthalten, identifiziert werden (siehe **Abbildung IV.20.**). Anschließend wurden die mutierten Bereiche sequenziert. Die hergestellten Konstrukte wurden mit TAP1ΔV1 und TAP2ΔV2 bezeichnet. TAP2ΔV2 unterscheidet sich von TAP2-Wildtyp in den Positionen 2006 (T in TAP1ΔV1 statt C im

Widtyp) und 2016 (T in TAP1 $\Delta$ V1 statt G im WT) (Nukleotidpositionen ausgehend von der EcoRI-Klonierungsstelle). TAP1 $\Delta$ V1 enthält folgende Substitutionen im Vergleich zum TAP1-Wildtyp: in der Position 2002 ein T statt C, in 2012 T statt G und in der Position 2014 A statt C. Die EcoRI-Fragmente, die jeweils die cDNA für TAP1 $\Delta$ V1 und TAP2 $\Delta$ V2 enthalten, wurden in in den Expressionvektor p $\beta$ Apr1neo umkloniert und nach der ScaI-Linearisierung für die Transfektion von T2-Zellen eingesetzt.



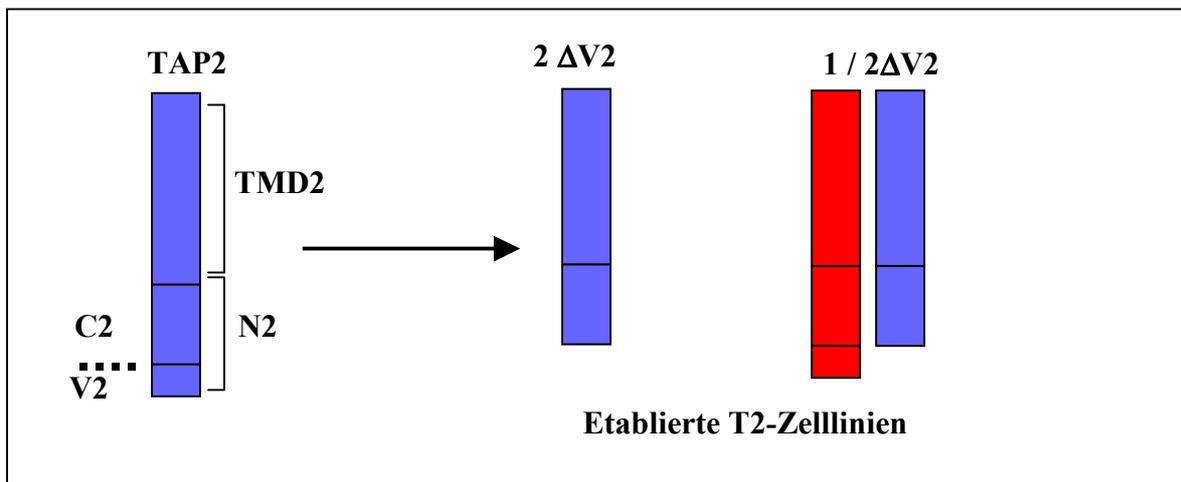
**Abbildung IV.20.** Restriktionsverdauanalysen der TAP-Konstrukte nach dem Entfernen der Sca I-Schnittstelle.

## 2. Expression und Nomenklatur der TAP-Deletionsmutanten

Bei den T2-Zellen, die mit TAP1 $\Delta$ V1-cDNA alleine oder kombiniert mit TAP1-cDNA, transfiziert wurden, konnte mittels Westernblotanalyse keine TAP1 $\Delta$ V1-Kette mit Hilfe des Serums 1p4 (siehe **Abschnitt II.3.9.**) detektiert werden. 1p4 ist ein polyklonales Kaninchenantiserum, gerichtet gegen ein intramolekulares Peptid (SEKIFEYLDRTPR) aus der vorhergesagten vierten zytosolischen Schleife vom humanen TAP1. 1p4 konnte, wenn auch nicht immer, Ratten-TAP1 erkennen. Ob die untersuchten Klone das TAP1 $\Delta$ V1-Protein nicht exprimieren oder diese Kette von 1p4 nicht erkannt werden konnte, konnte in Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Dagegen konnte erwartungsgemäß TAP2 $\Delta$ V2-Protein mit Mac394 identifiziert werden.

Zwei weitere T2-Zelllinien, die TAP2 $\Delta$ V2 als Einzelkette oder zusammen mit TAP1 exprimieren, wurden etabliert.

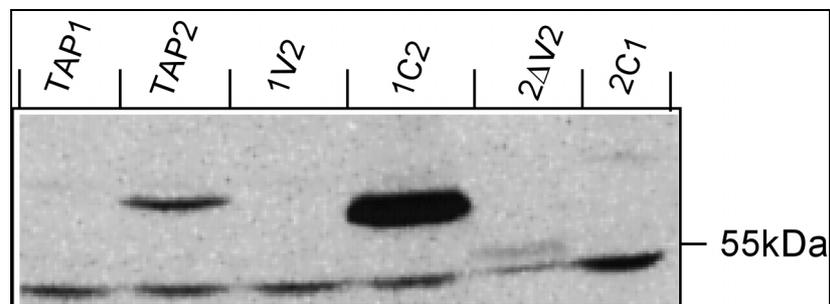
Bei der TAP-Deletionsmutante, wurde die deletierte Region dadurch bezeichnet, dass das Symbol „ $\Delta$ “ davor gesetzt wurde. So handelt es sich bei „2  $\Delta$  V2“ um eine gekürzte Form von TAP2, die ohne die V-Region exprimiert wird (siehe **Abbildung IV.21.**).



**Abbildung IV.21. Nomenklatur der etablierten Deletionsmutanten.**

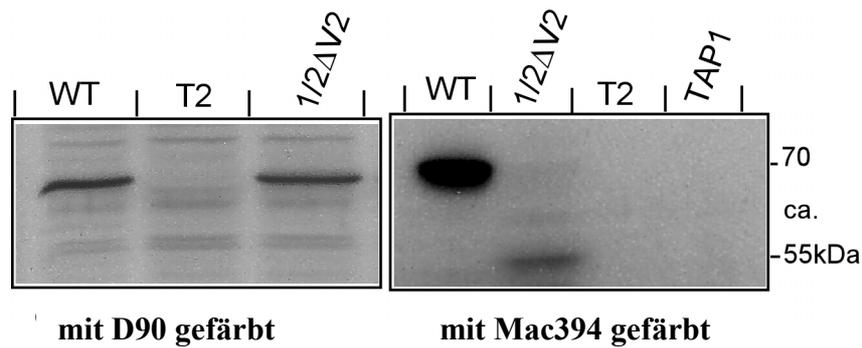
Die Abbildung IV.22. zeigt Westernblotanalyse von 2 $\Delta$ V2 und 1/2 $\Delta$ V2. Mit Hilfe von Mac394 konnte erwartungsgemäß 2 $\Delta$ V2 bei einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa identifiziert werden. 2 $\Delta$ V2 zeigt sehr schwache Expression. Die Koexpression mit TAP1 trug nicht zur Stabilisierung von 2 $\Delta$ V2 bei, wie es der Fall von 2V1 ist.

A.



mit Mac394 gefärbt

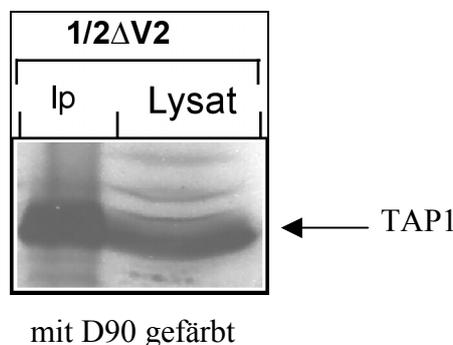
**B.**



**Abbildung IV.22. Westernblotanalyse von 2ΔV2- (A) und 1/2ΔV2-Zelllinien. (B).** TX-100 Lysate von je  $1 \times 10^5$  Zellen wurden auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend erfolgte eine Immunfärbung mit dem Antiserum D90 oder Mac394

### 3. Untersuchung des Assoziationsverhaltens

Die Kopräzipitationsuntersuchung zeigt, dass die TAP-Ketten 2ΔV2 und TAP1 in der Zelllinie 1/2ΔV2 assoziieren können. In der **Abbildung IV.23.** sind die Ergebnisse der Kopräzipitation dargestellt.

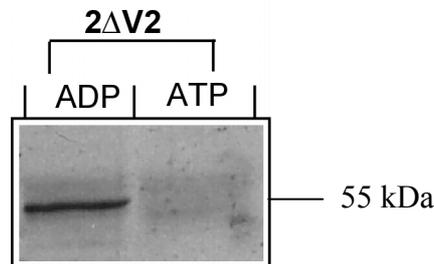


**Abbildung IV.23. Kopräzipitation beider in einer Zelllinie exprimierenden TAP-Ketten.** Triton X-100 Lysate von  $8 \times 10^7$  Zellen wurden über Nacht mit an Protein A-Sepharose gekoppeltem Antikörper des Antiserum Mac394 inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Sepharose wurden die gebundenen Proteine mit 2 x SDS-Probenpuffer eluiert und einer Westernblotanalyse unterzogen. TAP1 konnte kopräzipitiert werden.

### 4. Nukleotidbindeassay

Wegen der schwachen Expression von 2ΔV2 wurden für das Nukleotidbindeassay  $1 \times 10^8$  Zellen eingesetzt. Die Untersuchung zeigt ein überraschendes Ergebnis (siehe **Abbildung**

IV.24.). 2ΔV2 zeigt starke Bindung zu ADP-Agarose. Die Deletion des 66 Aminosäure langen C-Terminus von TAP2 scheint also, die Kompetenz der NBD2 ADP zu binden, nicht beeinträchtigt zu haben.

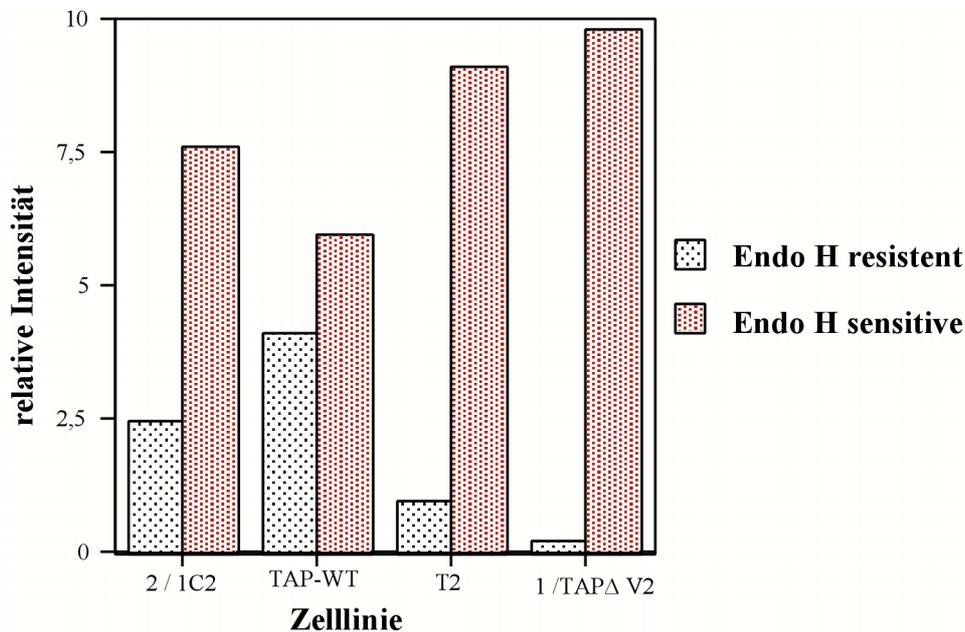
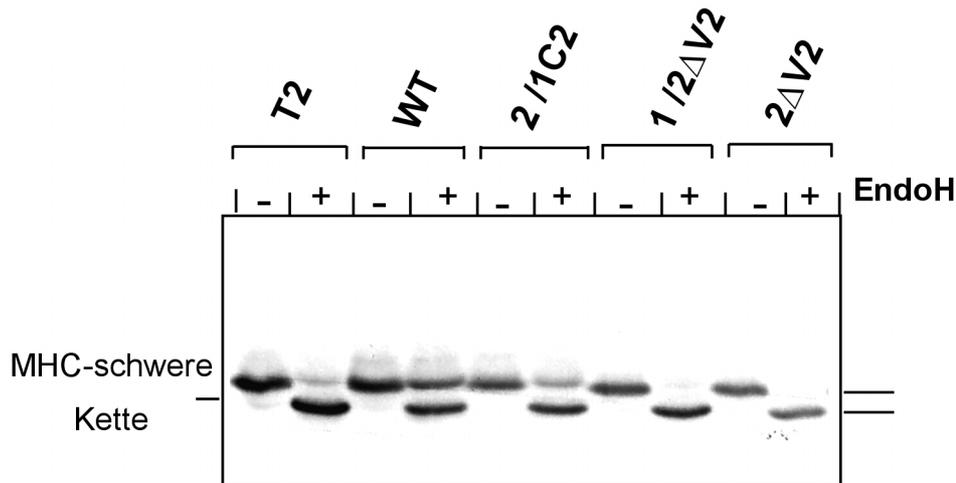


**Abbildung IV.24. Untersuchung zur Bindung von 2ΔV2 an Nukleotidagarose.** Pro Nukleotidbindeansatz wurden Membranen aus ca.  $8 \times 10^7$  Zellen in 600  $\mu$ l 1 % Triton X-100 in TBS/MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4) lysiert. Unlysiertes Material wurde abzentrifugiert und der Überstand auf die ADP- bzw. ATP-Agarose zugegeben und 45-60 min. bei 4°C auf einem Überkopffroller inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch sechsmaliges Waschen mit 1 ml 1 % Triton X-100 / TBS/MgCl<sub>2</sub> entfernt. Gebundene Proteine wurden durch Zugabe von 50  $\mu$ l 2 x Probenpuffer / 7% Mercaptoethanol und 15 minütiges Schütteln bei RT eluiert und auf 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Blotten erfolgte die Immunfärbung mit dem Antikörper Mac394.

## 5. Untersuchung der intrazellulären MHC-Klasse I-Reifung

Yan et al. (1999) berichten von einer TAP2-Isoform, die eine um 50 Aminosäure C-terminal gekürzte TAP2-Variante, die unmittelbar vor der Switch-Region endet darstellt, und mit TAP1 einen aktiven Transporter bildet. Es sollte untersucht werden, ob auch 2ΔV2, koexprimiert mit TAP1, einen aktiven Transporter bilden kann. Zumal 1/2ΔV2 das selbe Nukleotidbindeverhalten wie TAP-WT zeigen. Hierzu wurde ein Endo H-Verdau durchgeführt (siehe **Abbildung IV.25.**). 1/2ΔV2 zeigt eine der TAP-negativen T2-Zelllinie vergleichbare hohe Sensitivität gegenüber Endo H und ist damit nicht aktiv.

**Abbildung IV.25. Untersuchung der intrazellulären MHC-Klasse I-Reifung TX-100 –** Lysate von  $1 \times 10^5$  Zellen wurden mit 20  $\mu$ l Endo H-Inkubationspuffer für ca. 30 min. bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 7,5 mU Endo H zugegeben und bei 37°C für 12-16 Stunden inkubiert. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Endo H. Die Proben wurden anschließend mit 15  $\mu$ l 2 x Probenpuffer versetzt, ca. 15 min. bei RT geschüttelt und ca. 8 min. bei 65°C inkubiert. Die Proteine wurden auf 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Blotten wurde das Laufverhalten der MHC-I-schwere Kette durch Immunfärbung mit dem monoklonalen Antikörper (3B10.7) bestimmt. Wegen ihres reduzierten Molekulargewichts laufen Endo H-sensitive Moleküle im SDS-Gel weiter als EndoH-resistente. Die Intensität der Banden von Endo H-resistenten und sensitiven MHC-schwere Ketten wurden quantifiziert, die Werte normalisiert und graphisch dargestellt.



### C. Herstellung von TAP-Ketten mit ausgetauschten „Switch-Regionen“

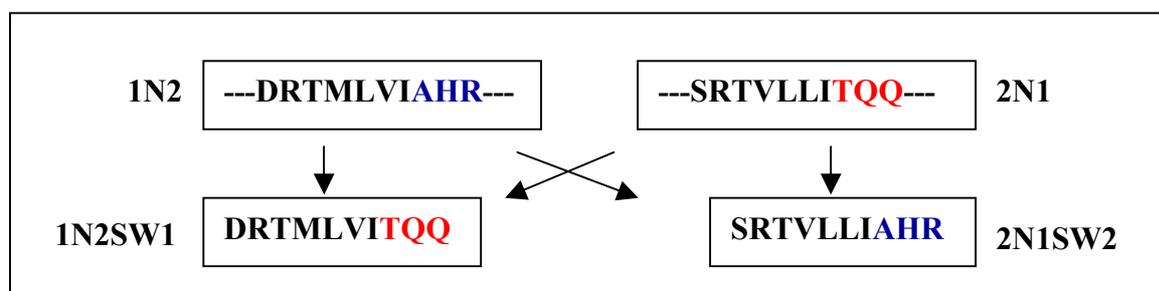
In einem Versuch, die entscheidenden Aminosäuren in der C-terminalen V-Region, die für den beobachteten unterschiedlichen Einfluß der V1- und V2-Region auf das Nukleotidbindeverhalten von NBD1 und NBD2 verantwortlich sind (siehe **Abschnitt IV.A.5.**), zu identifizieren, wurden drei in der Switch-Region vorkommende nichthomologe Aminosäuren zwischen NBD1 und NBD2 ausgetauscht (siehe **Abbildung IV.26.**). Ein bei fast allen ABC-Transportern in der Switch-Region vorkommendes Histidin ist in NBD1 von

TAP1 nicht vorhanden. Dieses Histidin scheint bei HisP-Protein über ein Wassermolekül Kontakt zum  $\gamma$ -Phosphat aufzunehmen. Ferner wird postuliert, dass die Switch-Region als Signalüberträger zwischen die Transmembrandomäne und die Nukleotidbindedomäne fungiert (Speiser et al. 1991).

Zur Herstellung von TAP-cDNAs mit ausgetauschten Switch-Regionen wurden die in pBluescript KS(+) klonierten TMD2NBD1-cDNA und TMD1NBD2-cDNA (Daumke O., 2000) (siehe **Abbildung IV.5.**) verwendet. Für die PCR-Mutagenese wurden die komplementären Primer NBD1-SW2F und NBD1-SW2B für TMD2NBD1-cDNA bzw. NBD2-SW1F und NBD2-SW1B für TMD1NBD2-cDNA (siehe **Abschnitt II.6.**) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in kompetente DH5 $\alpha$ -Bakterien transformiert. Die Plasmid-DNA wurde aus den gewachsenen Bakterienkolonien präpariert und die positiven Klone durch Sequenzieren der Mutationsbereiche identifiziert.

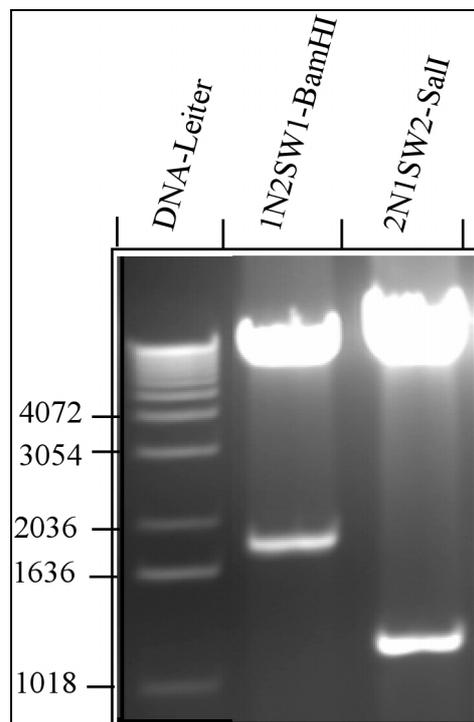
Hierdurch wurden in der TMD2NBD1-cDNA die Nukleotide **A** 1994 in **G**, **G** 1999 in **C** und **A** 2001 in **G** ausgetauscht (Nukleotidpositionen ausgehend von der EcoRI-Klonierungsstelle). In der TMD1NBD2-cDNA wurden die Nukleotide **G** 2063 in **A**, **C** 2068 in **G** und **G** 2070 in **A** (Nukleotidpositionen ausgehend von der EcoRI-Klonierungsstelle). Auf dieser Weise wurde in der TMD2NBD1-cDNA aus der Sequenz CTT CTG ATC ACC CAG CAG CTC AGC, die für LLIT**QQLS** kodiert, die Sequenz CTT CTG ATC GCC CACCGG CTC AGC kodierend für LLI**AHRLS** generiert. In der TMD1NBD2-cDNA wurde aus der Sequenz CTG GTC ATT GCT CAC CGG CTG CAC, die für LVI**AHRLH**, die Sequenz CTG GTC ATT ACT CAG CAG CTG CAC kodierend für LVI**ITQQLH** generiert (siehe **Abbildung IV.26.**)

Die hergestellten TAP-cDNAs mit ausgetauschten Switch-Regionen wurden mit pBIKS-1N2SW1 (enthält die mutierte TMD1NBD2-cDNA) und pBIKS-2N1SW2 (enthält die mutierte TMD2NBD1-cDNA) bezeichnet.



**Abbildung IV.26. Aminosäureaustausche in der Switch-Region zwischen 1N2 und 2N1. Nur die Switch-Regionen beider TAP-Konstrukte sind dargestellt.**

Die 2,69 kb- und 2,45 kb-EcoRI-Fragmente, die jeweils die cDNA für 2N1SW2 und 1N2SW1 enthalten, wurden aus dem pBIKSP isoliert und in die EcoRI-Klonierungsstelle des Expressionsvektor pH $\beta$ Apr1neo eingeführt. Sie wurden mit pH $\beta$ Apr1neo-2N1SW2 und pH $\beta$ Apr1neo-1N2SW1 bezeichnet. Mittels Restriktionsanalysen mit BamHI für 1N2SW1 und SalI 2N1SW2 wurde die klonierungsorientierung der Konstrukte im Expressionsvektor überprüft. Bei richtiger Orientierung sollten 1,8 kb- und 11,1 kb-Fragmente aus pH $\beta$ Apr1neo-1N2SW1 bzw. 1,2 kb- und 12,2 kb-Fragmente aus pH $\beta$ Apr1neo-2N1SW2 generiert werden (siehe **Abbildung IV.27.**).



**Abbildung IV.27. Restriktionsanalysen zur Prüfung der Klonierungsorientierung von den hergestellten TAP-Ketten in den Expressionsvektor pH $\beta$ Apr1neo.**

Die Konstrukte wurden durch ScaI-Verdau linearisiert und als Einzelkette oder in Kombination mit anderen TAP-Ketten in TAP-negativen T2-Zellen transfiziert.

In der **Abbildung IV.28.** sind die vorgenommenen Transfektionen dargestellt.

In weiterführenden Studien soll die Charakterisierung der positiven Klone durchgeführt werden. Dabei soll vor allem geprüft werden, ob 1N2SW1 das gleiche Nukleotidbindeverhalten wie 1C2 zeigt und mit TAP2 einen aktiven Transporter bilden kann. Sollte die Switch-Region trotz Sequenzunterschiede nicht für die unterschiedliche Funktionalität zwischen NBD1 und NBD2 verantwortlich sein, so sollte 1N2SW1 in

Kombination mit 2N1 das gleiche Phänotyp wie 1N2/2N1 (Daumke et al. 2001) zeigen und einen aktiven Transporter bilden. Das gleiche gilt für 2N1SW2. Es soll untersucht werden, ob 2N1SW2 das gleiche Nukleotidbindeverhalten wie 2C1 zeigt.

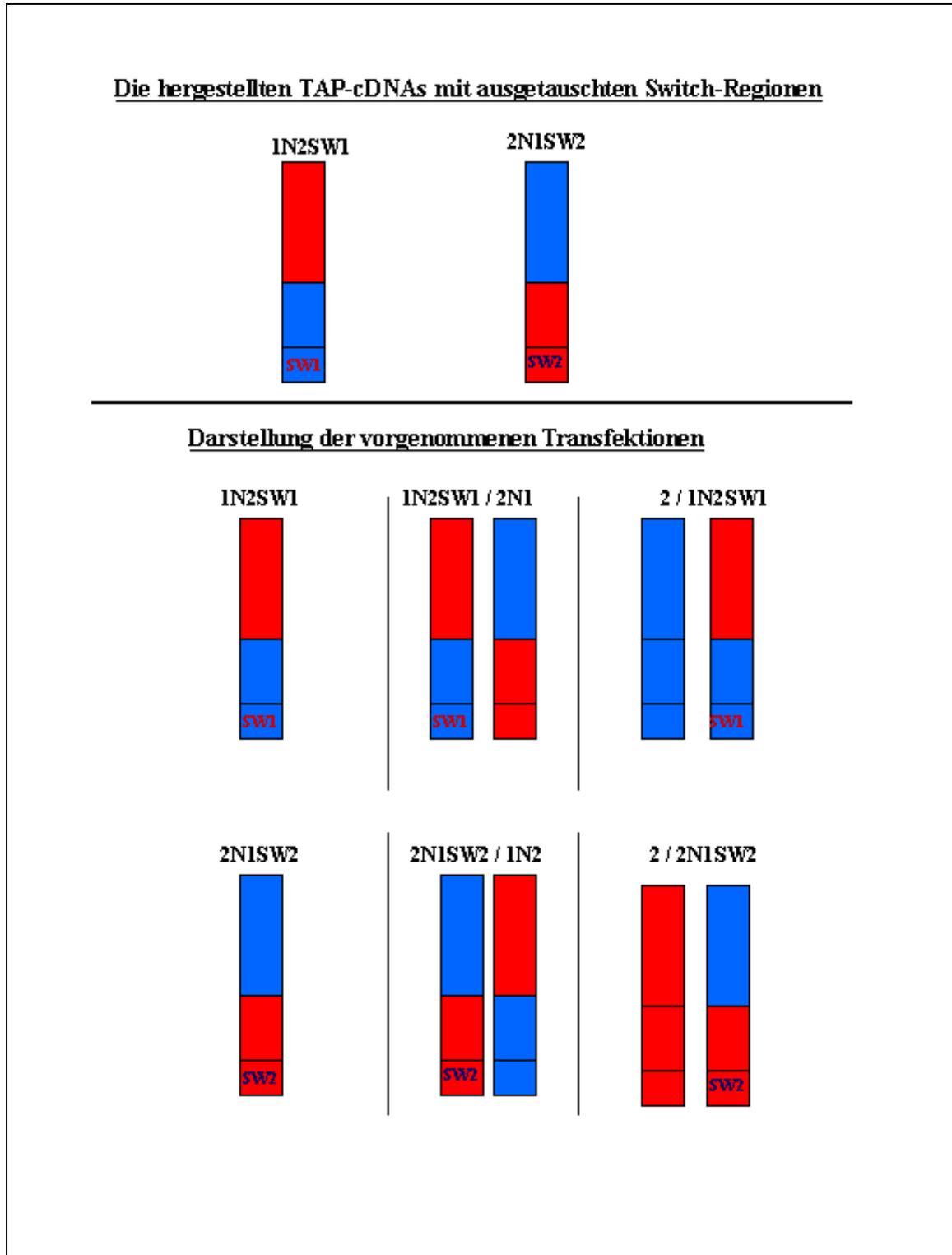


Abbildung IV.28. Schematische Darstellung der hergestellten TAP-cDNAs mit ausgetauschten Switch-Regionen (oben). Unten sind die TAP-Einzel- bzw. Doppelketten dargestellt, die in T2-Zellen transfiziert wurden.

## V. Diskussion

Der Transporter associated with antigen processing (TAP) gehört zur Familie der ATP-Binding Cassette (ABC)-Transporter (Higgins 1992). TAP besteht aus zwei Untereinheiten TAP1 und TAP2. Jede Untereinheit besteht aus einer Transmembrandomäne (TMD) und einer Nukleotidbindedomäne (NBD). Sowohl die TMDs als auch die NBDs sind funktional verschieden (Alberts et al. 2001, Daumke et al. 2001, Lapinski et al. 2001). Bei den NBDs beruht die unterschiedliche Funktionalität auf intrinsischen Eigenschaften (Daumke et al. 2001). In dieser Arbeit wurde untersucht, in wieweit die ca. 70 Aminosäuren langen C-Termini und die Kern-NBDs von TAP (siehe **Abbildung I.6.**) die asymmetrische Funktionalität der Nukleotidbindedomänen bedingen. Dazu wurden rekombinante Transporter hergestellt, in denen die C-Termini oder die Kern-NBDs zwischen NBD1 und NBD2 wechselseitig ausgetauscht wurden (siehe **Abbildung I.6.**). Überdies wurde eine weitere TAP-Mutante, der die C-terminale V-Region fehlt, hergestellt. Die cDNAs für diese chimären Transporter wurden generiert (siehe **Abschnitt IV.A.1.a. und b. sowie IV.B.1. und 2.**) und in TAP-negativen T2-Zellen stabil transfiziert (siehe **Abschnitt III.2.4.**). Es wurden insgesamt sechzehn T2-Zelllinien, die stabil ein oder zwei TAP-Ketten exprimieren, etabliert (siehe **Abschnitt IVA.2.a. sowie IV.B.2.**). Bei der Auswahl der Kombinationen von TAP-Ketten wurde berücksichtigt, dass keine Transporter mit identischen TMDs oder NBDs hergestellt werden. Arora et al.(2001) und Daumke et al. (2001) zeigten, dass solche chimäre TAP-Transporter nicht funktional sind. Die Ergebnisse der Untersuchungen an den hergestellten chimären Transportern sind tabellarisch dargestellt (**Abbildung V.1.**).

	<b>1V2</b>		<b>1C2</b>		<b>2V1</b>		<b>2C1</b>		<b>2AV2</b>		<b>1 / 2V1</b>		<b>1 / 2C1</b>		<b>2 / 1V2</b>		<b>TAP-WT</b>	
Assoziation beider TAP-Ketten											+		+		+		+	
MHC-Ladekomplexbildung		+																+
<b>ADP</b>		+																+
Bindung an Nukleotidagarose: <b>ATP</b>		-																+
8-Azido-ATP-Kreuzvernetzung		-																+
Peptidkreuzvernetzung																		+
Transportaktivität		-																+++++

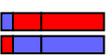
**Abbildung V.1. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen an den hergestellten TAP-Chimären.**

„-“: keine messbare Aktivität, bzw. Bindung usw.

„+“: messbare Aktivität bzw. Bindung usw. Anzahl der „+“ gibt quantitative Unterschiede wider.

Bei Feldern ohne Zeichen wurden die Experimente an den entsprechenden TAP-Chimären nicht durchgeführt.

Siehe Vorsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite.

								
Assoziation beider TAP-Ketten	+	+	+	+	+	+	+	+
MHC-Ladekomplexbildung	+	+	+	+		+		
ADP								
Bindung an Nukleotidagarose:								
ATP								
8-Azido-ATP-Kreuzvernetzung	+	+	+	+				
Peptidkreuzvernetzung	+	+	-	+	-		+	
Transportaktivität	++	-	-	+	-	-	-	-

Siehe Legende am Fuß des ersten Tabellenteils.

Die Expression der TAP-Chimären wurde durch Westernblotanalysen untersucht (siehe **Abschnitt IV.A.2.b. und IV.B.2.**). Mit Ausnahme von 2V1 und 2ΔV2 zeigten alle TAP-Chimären, im Vergleich zum TAP-WT, normale Expression. Die Koexpression von 2V1 mit einer anderen Kette führte zu dessen Stabilisierung. Immunpräzipitationsuntersuchungen (siehe **Abschnitt IV.A.3.**) zeigten, dass 2V1 mit der jeweiligen koexprimierten TAP-Kette (mit 1V2, TAP1 oder 1N2) ein Dimer bildet. Dies deutet darauf hin, dass die Dimerisation einerseits den schnellen Abbau von 2V1 verhindert und andererseits in einem sehr frühen Stadium, während oder unmittelbar nach der Synthese, erfolgt. Daumke et al. (2001) postulieren, dass TAP2-Ketten zuerst Homodimere bilden, dann wird eine TAP2-Kette von TAP1 verdrängt und ein TAP1/TAP2-funktionales Heterodimer gebildet. Möglicherweise ist TAP2 überhaupt nur als Dimer stabil. Durch den Austausch der V-Region könnte 2V1 die Fähigkeit, Homodimere zu bilden, verloren haben und als Monomer schnell abgebaut werden. Solch ein Phänomen wurde z.B. bei den  $\alpha$ -Untereinheiten der Phospholipase PAF-AH (platelet-activating factor acetylhydrolase) beobachtet (McMullen et al. 2000). Die Inhibierung der Dimerisierung durch hohe Calciumkonzentrationen führt zur Instabilität der  $\alpha$ -Untereinheiten. Der V-Domänenaustausch scheint aber nicht die Fähigkeit von 2V1, Heterodimere zu bilden, beeinträchtigt zu haben. Dies kann damit erklärt werden, dass die Homodimerisierung und Heterodimerisierung auf die Interaktion unterschiedlicher Sequenzbereiche beruhen. Für die TAP2-Homodimerisierung scheinen damit nicht nur die TMDs (Vos et al. 2000 und 1999) sondern auch der C-Terminus verantwortlich zu sein. 2C1 zeigt, im Vergleich zu 2V1, eine stabilere Expression. Das deutet darauf hin, dass V1 und V2 strukturell stärker von einander abweichen als C1 und C2. Es bleibt abzuwarten, was eine weitere Strukturaufklärung von der NBD2 zeigen wird. Ferner zeigt die Fähigkeit von 2V1, Nukleotide und in Assoziation mit TAP1 oder 1N2 Peptide zu binden, dass der Domänenaustausch nicht die strukturellen Voraussetzungen für einen funktionellen Transporter beeinträchtigt haben.

Sehr schwache Expression zeigt auch die Deletionsmutante 2ΔV2. Die Dimerisierung mit der TAP1-Kette (bei der Zelllinie 1/2ΔV2) scheint nicht zu ihrer Stabilisierung beitragen zu können. Der Struktur der NBD1 vom humanen TAP1 (Gaudet und Wiley 2001, siehe **Abbildung I.4**) entsprechend würden der Deletionsmutante 2ΔV2 drei  $\beta$ -Faltblätter und vier  $\alpha$ -Helizes fehlen. Dies könnte zu Faltungsproblemen geführt haben und dementsprechend zur Instabilität des Proteins. Eine um 100 Aminosäuren C-terminal verkürzte CFTR-Deletionsmutante wird ebenfalls sehr schnell abgebaut (Haardt et al 1999). Gentzsch et al. (2000) konnten kurze hochkonservierte hydrophobe Sequenzen im C-Terminus der NBD2 von CFTR charakterisieren,

die für die Reifung und Stabilität des naszierenden Proteins eine kritische Rolle spielen. Ob in TAP2 auch ähnliche Sequenzen vorhanden sind, müssen weitere Untersuchungen klären.

Bei allen weiteren hergestellten chimären Transportern scheinen keine drastischen Beeinträchtigungen der Struktur aufgetreten zu sein. Dies wird durch die Nukleotid- und -Peptidbindefähigkeit der chimären Transporter und durch die Transportaktivität von 2/1C2 bestätigt. Damit können die beobachteten Phänotypen bei den hergestellten chimären Transportern auf strukturelle Funktionen der ausgetauschten Domänen und nicht auf Faltungsprobleme zurückgeführt werden.

Die Kopräzipitation der chimären Transporter mit den ER-residenten Komponenten des MHC-Ladekomplexes, ER60, Calreticulin, Tapasin und MHC-schwere Kette, deuten auf korrekte Integration der rekombinanten Transporter in der ER-Membran hin. Die Aktivität des Transporters 2/1C2 ist eine zusätzliche Bestätigung, dass die TMD-Topologie durch den Domänenaustausch nicht beeinträchtigt wurde. Da die Interaktion von TAP mit dem MHC-Ladekomplex über seine Transmembrandomänen erfolgt (z.B. Tan et al. 2002) und Austausch der NBDs zwischen TAP1 und TAP2 die Bildung des MHC-Ladekomplex nicht beeinträchtigen (Daumke et al. 2001, Arora et al. 2001), war bei den hier hergestellten TAP-Chimären keine Beeinträchtigung der MHC-Ladekomplexbildung zu erwarten.

Die Untereinheiten aller hergestellten chimären Transporter können Dimere bilden (siehe **Abschnitt IV.A.3. und IV.B.3.**). Die Fähigkeit, Dimere zu bilden, deutet darauf hin, dass der Domänenaustausch keine grundlegende Beeinträchtigung der Struktur von TAP herbeigerufen hat. Die Dimerbildung stellt eine wichtige Voraussetzung für die Funktionalität eines Transporters dar. Überdies zeigt die Kopräzipitation, dass beide Ketten in der selben Zelle exprimiert werden.

Die Nukleotidbindassays zeigen ein verändertes Nukleotidbindeverhalten der TAP-Chimären. Saveanu et al. (2001) und Alberts et al. (2001) konnten zeigen, dass TAP1 und TAP2 Affinität zu ADP besitzen, während ATP präferentiell nur an TAP1 bindet. Überdies ist dieses Nukleotidbindeverhalten eine intrinsische Eigenschaft der NBDs (Daumke et al. 2001). Durch den Austausch der C-terminalen V-Region konnte keine ATP-Bindung mehr an NBD1 nachgewiesen werden. 1V2 und 2C1 zeigten nur noch ADP-Bindung. Dagegen bedingte der Austausch bei der NBD2 die Fähigkeit, ATP zu binden. Sowohl für 2V1 als auch für 1C2 konnten ADP und ATP-Bindungen nachgewiesen werden. Das Nukleotidbindeverhalten von NBD1 und NBD2 wird damit durch den C-Terminus beeinflusst. Die V2-Region scheint eine für ATP-Bindung ungünstige Konformation in der NBD zu induzieren, während V1 die Bindung

von ADP und ATP zulässt. Der C-Terminus von TAP2 (V2) stellt möglicherweise einen limitierenden strukturellen Faktor dar, der die Nukleotidbindung während des Transportzyklus reguliert. Dem 42 Aminosäure langen C-Terminus vom ABC-Transporter SUR wird auch eine regulatorische Funktion bei der Nukleotidbindung zugesprochen (Fujita et al. 2001). Die regulatorische Funktion von V scheint eine intrinsische Eigenschaft zu sein. Die V-Region reguliert die Nukleotidbindung an jeder Kern-NBD, an die sie fusioniert ist.

Überraschend war die Feststellung das  $2\Delta V2$  stark ADP binden kann. Es scheint, dass die ADP-Bindung eine natürliche intrinsische Eigenschaft der Kern-NBD ist, die die Sequenzmotive Walker A, Walker B, Q-Loop und Linkerpeptid enthält. Erst durch die hier ausgetauschte C-terminale Verlängerung erlangte die NBD die Fähigkeit, ATP zu binden. Diese Vermutung wird durch Strukturanalysen gestützt. Die Struktur von HisP zeigt, dass die C-terminal vorhandene Switch Region über ein Histidin Kontakt zum  $\gamma$ -Phosphat aufnimmt (Hung et al. 1998), möglicherweise stabilisiert die Interaktion die ATP-Bindung. Ferner zeigte die Strukturanalyse des NBD1-ADP-Komplexes vom humanen TAP, dass alle Aminosäurenreste, die mit ADP interagieren, in der Kern-Domäne liegen (Gaudet und Wiley 2001). Damit scheint der C-Terminus die für die stabile Bindung von ATP notwendige funktionelle Struktur zu bedingen und überdies eine regulatorische Rolle zu spielen. Diese Vermutung wird durch Ergebnisse von Velarde et al. (2001) unterstützt, die beobachten konnten, dass die Vorinkubation der TAP-enthaltenden Zellysate mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von TAP2 (KVYAHLVQQRLEA) vor dem Nukleotidbindeassay zu einer erhöhten ATP-Bindung an TAP2 führt. Sie erklärten dieses Phänotyp damit, dass möglicherweise der Antikörper eine Konformationsänderung der NBD2 verursacht und die ATP-Bindung begünstigt. Die Regulation der Nukleotidbindung ist im Hinblick auf die intrazellulären physiologischen Bedingungen von enormer Bedeutung. Denn ein Protein, das beide in der Zelle vorhandenen ADP- und ATP-Moleküle binden kann, muß in der Lage sein, eine Art Selektion durchzuführen. Der C-Terminus scheint eine regulatorische Domäne zu sein, die strukturelle Voraussetzungen schafft, die Affinität zu ADP oder zu ATP zu modulieren.

Ein Peptidtransportassay, der in Abhängigkeit vom ATP/ADP-Konzentrationsverhältnis durchgeführt wurde (siehe Abschnitt IV.A.8., **Abbildung IV.19.**), zeigte bei einem ATP/ADP-Konzentrationsverhältnis von 1:1 eine TAP-WT-Transportaktivität von ca. 80 %. Solche Stressbedingungen, in denen die ADP-Konzentration hoch ist, könnten in der Zelle z.B. durch eine Infektion verursacht werden. TAP scheint unter solchen Bedingungen ATP selektiv binden zu können und seine Funktionalität, die für die zelluläre Immunantwort notwendig ist,

beizubehalten. Möglicherweise ist die unterschiedliche Nukleotidbindeeigenschaft von TAP1 und TAP2 der Grund für diese Toleranz von TAP gegenüber einer hohen ADP-Konzentration. Während des Transportzyklus besitzen NBD1 und NBD2 abwechselnd hohe oder niedrige Affinität zu ADP und ATP (Karttunen et al. 2001, Alberts et al. 2001). Bei hoher ADP-Konzentration könnte eine NBD ADP wegfangen und somit eine ATP-Bindung an der anderen mit ihr gepaarten NBD begünstigen. Karttunen et al. (2001) konnten durch Studien mit Vanadat und  $8N_3ATP\gamma$ biotin zeigen, dass ADP-Bindung in TAP2 die Bindung von  $8N_3ATP\gamma$ biotin an TAP1 erhöht. Ferner wurde dieses Phänomen auch bei anderen ABC-Transportern wie SUR1 und MRP1 beobachtet (Ueda et al. 1997, Hou et al. 2000). Die unterschiedliche Funktionalität der beiden NBDs ist möglicherweise eine Anpassung an die zellulären Stressbedingungen, unter denen die Transporter aktiv sein müssen.

Bei einem ATP/ADP-Konzentrationsverhältnis von 1:2 erreicht TAP-WT fast die Hintergrundtransportaktivität von TAP-negativen T2-Zellen (siehe **Abbildung IV.19.**). Die Funktionalität von TAP wird damit von einer zu hohen ADP-Konzentration herunterreguliert. Es wird postuliert, dass diese Regulation die Induktion der Autoimmunität bei gestressten Zellen mit niedriger Energierate verhindert (Van Endert 1999).

Alberts et al. (2001) und Karttunen et al. (2001) schlugen einen Transportzyklus für TAP vor, in dem eine alternierende Bindung und Hydrolyse von ATP in NBD1 und NBD2 erfolgt. Tatsächlich konnten sie eine ATP-Bindung nur an NBD1 detektieren. Dies wurde damit erklärt, dass ATP an NBD2 sehr schnell hydrolysiert wird. In dieser Arbeit konnte zum ersten mal durch die Chimären 1C2 und 2V1 gezeigt werden, dass die Kern-NBD2, die die stark konservierten Nukleotidbindemotive der ABC-Transporter enthält, ATP binden kann. Überdies konnte durch den aktiven Transporter 2/1C2 gezeigt werden, dass die NBD2 bzw. Kern-NBD2 tatsächlich eine ATPase-Aktivität besitzt. Damit kann die postulierte alternierende ATPase-Aktivität der beiden NBD-Untereinheiten der ABC-Transporter bestätigt werden (Karttunen et al. 2001, Alberts et al. 2001, Urbatsch et al. 1998, Senior et al. 1998). In Anlehnung an die Strukturanalysen von der ATPase Rad50, die eine starke Homologie zu den NBDs der ABC-Transporter aufweist, wurde auch für ABC-Transporter das Modell vorgeschlagen, das besagt, dass für die Bindung und Hydrolyse eines ATP-Moleküls die Interaktion des ATP mit den beiden NBDs notwendig ist (Hopfner et al. 2000, Manavalan et al. 1995). Ein in Rad50 wie auch in ABC-Transportern konserviertes Serin jedes Linkerpeptids nimmt Kontakt zum  $\gamma$ -Phosphat des an der gegenüberliegenden NBD-Untereinheit gebundenen ATP auf. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen Zweifel an dieser Postulierung. Die Linkerpeptidmotive des Transporters 2/1C2 weisen

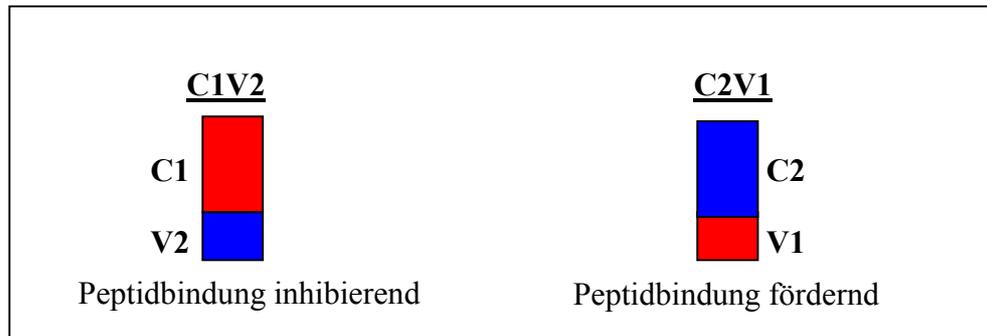
Abweichungen zur typischen Konsensussequenz von ABC-Transportern und Rad50 auf. Anstelle des reaktionsfreudigen Serins besitzen sie ein Alanin mit einer nichtreaktiven Seitenkette. Der chimäre Transporter 2/1C2 kann dennoch ATP binden und seine Transportaktivität weist auf die Fähigkeit, ATP zu hydrolysieren, hin.

Karttunen et al. (2001) stellten ein kooperatives Verhalten zwischen TAP1 und TAP2 fest. Sie zeigten, dass die ADP-Bindung in TAP2 zu einer erhöhten ATP-Bindung in TAP1 führt. Das Nukleotidbindeverhalten von 1/2V1 zeigte bei den 8-Azido-ATP-Kreuzvernetzungsstudien (siehe Abschnitt IV.A.5.) ein überraschendes neues Phänomen. Es konnte ATP-Bindung nur an 2V1 detektiert werden. Dies deutet auf die stärkere dominante Rolle der Kern-NBD von TAP2 bei der Wechselwirkung zwischen den beiden TAP-Ketten hin. Überdies scheint es keine ATP-Bindung gleichzeitig an beiden NBDs zu geben und es scheint, dass TAP2 eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Nukleotidbindung spielt. Dieses Ergebnis stellt eine weitere Unterstützung für die postulierte alternierende ATP-Bindung und -Hydrolyse in den beiden NBD-Untereinheiten der ABC-Transporter dar (Karttunen et al. 2001, Alberts et al. 2001, Urbatsch et al. 1998, Senior et al. 1998).

Um den beobachteten Einfluss des C-Terminus auf die Nukleotidbindeigenschaften genauer zu charakterisieren, wurden weitere cDNAs für TAP-Chimäre hergestellt, in denen drei in der Switch Region von NBD1 (TQQ) und NBD2 (AHR) nicht konservierte Aminosäuren zwischen 1N2 und 2N1 ausgetauscht wurden. Diese als 1N2SW1 und 2N1SW2 bezeichnete Konstrukte wurden einzeln oder in Kombination mit anderen TAP-Ketten (siehe **Abschnitt IV.C.**) in TAP-negativen T2-Zellen transfiziert. Ein besonderes Merkmal in diesem Motiv ist ein konserviertes Histidin, das Kontakt zum  $\gamma$ -Phosphat aufnimmt (Hung et al. 1998). Sollten weiterführende Studien an 1N2SW1 das selbe Nukleotidbindeverhalten wie 1C2 zeigen und bei 2/1N2SW1 eine Transportaktivität wie 2/1C2 aufweisen, so wäre das ein Nachweis dafür, dass die Switch-Region für den festgestellten Einfluss des C-Terminus verantwortlich ist. Sollten aber die Transporter 2N1/1N2SW1 und 1N2/2N1SW2, trotz des Austausches der Switch-Region, die Aktivität von 1N2/2N1 beibehalten, so scheidet die Switch-Region als Kandidat für die Ursache der unterschiedlichen Funktionalität der beiden NBDs aus. In diesem Fall könnten nicht einzelne Aminosäuren sondern die ganze Struktur des C-Terminus entscheidend sein.

Ein verändertes Verhalten bedingt durch die Domänenaustausche wurde auch bei den Peptidbindeigenschaften der chimären Transporter festgestellt. Keine Peptidbindung wurde für die Chimären 1/2C1, 2/1V2, 1C2/2C1 und 1N2/2C1 beobachtet. Dagegen konnten 1/2V1, 2/1C2, 1V2/2V1, 1N2/2V1 und 2N1/1C2 Peptid binden, wobei 1/2V1 niedrigere Peptidaffinität zeigte.

Im allgemeinen ist zu beobachten, dass alle Transporter, die eine Nukleotidbindedomäne bestehend aus der Kern-NBD von TAP2 (C2) und der V-Region von TAP1 (V1) enthalten (C2V1), Peptid binden können. Während keine Peptidbindung festzustellen ist, wenn eine NBD-Untereinheit des Transporters aus der Kern-NBD von TAP1 (C1) und der V-Region von TAP2 (V2) besteht (C1V2) (siehe **Abbildung V.2.**).



**Abbildung V.2.** Schematische Darstellung der NBDs C1V2 und C2V1, die jeweils einen „negativen“ bzw. einen „positiven“ dominanten Einfluss auf die Peptidbindung von den chimären TAP-Transportern besitzen.

Das hier beobachtete Peptidbindeverhalten deutet darauf hin, dass die NBD-Kette, C2V1, einen „positiven“ und die NBD-Kette, C1V2, einen „negativen“ dominanten Einfluss auf die Peptidbindung besitzen. Daumke et al. (2001) stellten verminderte Peptidbindung beim aktiven chimären Transporter 1N2/2N1 fest. Sie konnten nicht entscheiden, ob dieses Verhalten auf strukturelle, intrinsische Eigenschaften oder auf den unterschiedlichen Nukleotidbindezustand von NBD1 und NBD2 zurückzuführen ist. Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen jedoch, dass unabhängig von der Art der Nukleotidbindung der an die TMDs fusionierten NBDs, ein Einfluss auf die Peptidbindung von den NBDs ausgeht. Z.B. zeigt der chimäre Transporter 1V2/2V1, trotz ATP-Bindung in 2V1, Peptidbindung.

Interessant ist das Peptidbindeverhalten von 1V2/2V1 und 1C2/2C1. Hier kommen beide dominant wirkenden NBDs C1V2 und C2V1 im selben Transporter vor. 1V2/2V1 zeigt, dem positiv dominanten Verhalten von C2V1 entsprechend, Peptidbindung. Während 1C2/2C1 das negativ dominante Verhalten von C1V2 widerspiegelt und kein Peptid bindet. Der Unterschied zwischen den beiden Transportern liegt in den TMDs, an denen die jeweiligen NBDs fusioniert sind. Sowohl das negativ dominante Verhalten von C1V2 als auch das positiv dominante Verhalten von C2V1 scheinen durch die Fusion an die TMD2 begünstigt zu werden. Es scheint eine besondere strukturelle direkte oder indirekte Kommunikation zwischen der TMD2 und dem

C-Terminus der an sie fusionierten NBD zu geben. Diese strukturelle Kommunikation könnte für Konformationsänderungen in der Peptidbindetasche, die in peptidkompetente oder -inkompetente Form resultieren, von entscheidender Bedeutung sein. Der Einfluss des C-Terminus auf die Substratbindung konnte für eine Reihe von ABC-Transportern nachgewiesen werden (Schneider, Hunke, 1998). Die Mutation des Histidin in der Switch Region von MalK, HisP und KpsT beeinträchtigen stark den Substrattransport. In P-Glykoprotein Mdr3 führt die Substitution des Threonin zu Cystein in der Switch Region zu einem veränderten Pharmakaresistenzprofil (Beaudet et al. 1995). Ferner konnte ein L-Histidin-Transporter, dem das Bindeprotein fehlt, durch eine Suppressormutation in der Switch-Region wieder Transportaktivität zeigen (Speiser et al. 1991).

Die Nukleotid- und Peptidbindeassays zeigten, dass der C-Terminus einen Einfluss sowohl auf die Nukleotid- als auch die Peptidbindung des Transporters besitzt.

Die Untersuchungen zur Transportaktivität der unterschiedlichen chimären Transporter zeigten Aktivität nur bei 2/1C2. Die Aktivität von 2/1C2 entsprach ca. 50% des TAP-WT. Dies deutet darauf hin, dass die C2- die C1-Domäne ersetzen kann nicht aber umgekehrt, da 1/2C1 nicht aktiv ist. 1N2/2V1 besitzt identische NBDs wie 2/1C2, die aber in umgekehrter Weise an die TMDs fusioniert sind. Da die NBDs intrinsische Eigenschaften besitzen (Daumke et al. 2001) sollte dieser Transporter ebenfalls aktiv sein. Tatsächlich zeigt 1N2/2V1 ca. 20 % Aktivität im Vergleich zu WT und ca. 40 % im Vergleich zu 2/1C2. Ein ähnliches Verhältnis in der Aktivität wurde zwischen TAP-WT und 1N2/2N1 festgestellt (Arora et al. 2001, Daumke et al. 2001). Nach dem wechselseitigen Austausch der NBDs des WT-Transporters behält zwar dieser, aufgrund der intrinsischen Eigenschaften der NBDs einen Teil seiner Aktivität, scheint aber nicht die optimale funktionale Struktur des WT-Transporters zu besitzen. Überdies zeigt die 2V1-Kette starke Instabilität, wenn sie einzeln exprimiert wird. Dies könnte bedeuten, dass beim dimeren Transporter 1N2/2V1 keine optimale funktionale Konformation erreicht werden konnte. Yan et al. 1999 berichten von einer TAP2-Isoform, die eine um 50 Aminosäuren C-terminal gekürzte TAP2-Variante darstellt und mit TAP1 einen aktiven Transporter bildet. Der Transporter 1/2ΔV2 zeigt dagegen keine Aktivität. Ob Transporter mit solchen großen Deletionen wie die TAP2-Isoform aktiv sein können, ist zweifelhaft. Yan et al. (1999) zeigten Daten nur zur DNA und mRNA. Möglicherweise täuschten PCR-Fehler die Existenz eines solchen Isomers vor. Ähnliche Deletionsmutanten von P-Glykoprotein MDR1 zeigen keine Transportaktivität (Currier et al. 1989).

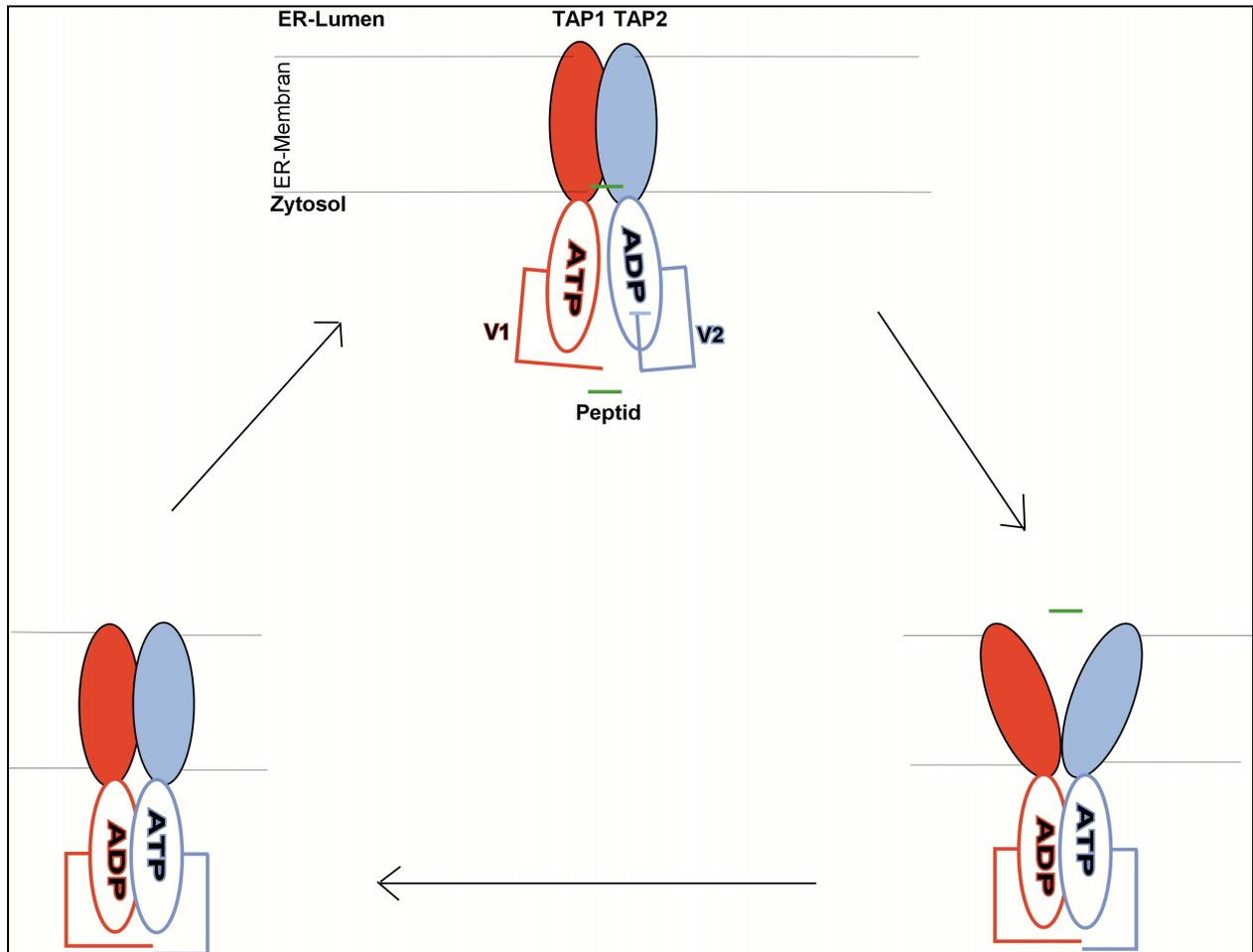
Die Transporter 1/2C1, 1C2/2C1, 1V2/2V1 und 2N1/1V2 zeigen trotz der unterschiedlichen Nukleotidbindeeigenschaften der beiden NBDs keine Transportaktivität. Da TAP1 bzw. 1C2 in Kombination mit TAP2 und 2N1 in Kombination mit 1N2 (Daumke et al. 2001) aktive Transporter bilden können, ist das Transportdefizit bei den oben genannten Transportern auf Defekte in den Untereinheiten 1V2 und 2C1 zurückzuführen. Während NBD2, durch den Austausch des C-Terminus, die Funktion von NBD1 ersetzen kann, konnte die chimäre NBD1, trotz verändertem Nukleotidbindeverhalten nach dem Austausch des C-Terminus, die NBD2 in ihrer Funktion nicht ersetzen. C1V2 (Nukleotidbindedomäne bestehend aus Kern-NBD1 und C-Terminus von NBD2) scheint in einem ADP-Bindezustand zu verharren und keine Konformationsänderung mehr zuzulassen, die für den Austausch des ADP gegen ATP essentiell ist und eine Voraussetzung für die Transportaktivität ist (Lankat-Buttgereit und Tampe 2002, Karttunen et al. 2001). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die für die Transportaktivität notwendige Kommunikation zwischen der TMD und dem C-Terminus in 1V2 und 2C1 nicht gegeben ist. Diese Kommunikation scheint für V2 nur über C2 zu erfolgen. Möglicherweise sind entscheidende Aminosäuren oder Sequenzen, die in C2 nicht aber in C1 vorhanden sind, an der Interaktion zu V2 beteiligt. Ames et al. (1992) sprechen dem Linkerpeptid eine Rolle beim Substrattransport zu. Demnach soll das Linkerpeptid nach ATP-Hydrolyse eine Konformationsänderung erfahren. Diese induziert wiederum eine strukturelle Bewegung der Transmembrandomäne. Möglicherweise ist bei 1V2 und 2C1 das Linkerpeptid von C1 nicht kompatibel mit der V2-Region, so dass der Informationsfluss von der NBD über das Linkerpeptid an die Transmembrandomäne (Schmitt und Tampe, 2000) unterbrochen ist. Um dies zu untersuchen, können weitere Sequenzaustausche in den Kern-NBDs vorgenommen werden, um diesen Informationsfluss in 1V2 und 2C1 wiederherzustellen. Der Austausch der Kern-NBDs zwischen NBD1 und NBD2 des P-Glykoproteins (Hrycyna et al. 1999) führt zu keiner Veränderung der Nukleotidbindeeigenschaften der NBDs. Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass, im Gegensatz zu TAP1 und TAP2, die NBDs vom P-Glykoprotein identische Linkerpeptid-Motive besitzen.

Es wurde im Laufe dieser Arbeit eine cDNA von 1V2, in der das Linkerpeptid in den Sequenzkontext von der NBD2 überführt wurde, hergestellt. In weiterführenden Studien sollte diese cDNA in T2-Zellen in Kombination mit der TAP-Kette 2N1 transfiziert werden und der so hergestellte chimäre Transporter nach der Aktivität untersucht werden. Der gleiche Linkerpeptid-Austausch könnte in der 2C1-Kette vorgenommen werden, chimäre Transporter in Kombination mit 1C2 und TAP1 hergestellt und nach ihrer Aktivität untersucht werden. Sollten diese

chimären Transporter Aktivität zeigen, so wäre das ein Nachweis auf direkte Interaktion zwischen dem C-Terminus und dem Linkerpeptid.

Ein Modell für den Transportzyklus von TAP, in dem alternierend ATP in NBD1 und NBD2 gebunden und hydrolysiert wird, wurde vorgeschlagen (Karttunen et al. 2001, Alberts et al. 2001). Während Alberts et al. (2001) die ATP-Hydrolyse in TAP1 für die Translokation des Peptids verantwortlich machen, postulieren Saveanu et al. (2001) und Karttunen et al. (2001), dass die ATP-Bindung und Hydrolyse in TAP2 die entscheidende Rolle bei der Peptidbindung und dem Transport spielen. Beide Modelle schlagen jedoch vor, daß der Nukleotidbindezustand, in dem ADP in TAP2 und ATP in TAP1 gebunden sind, die Peptidbindung begünstigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen jedoch darauf hin, daß unabhängig von der Art des an die NBDs gebundenen Nukleotids, ein C-terminal bedingter Einfluß der NBDs auf die Peptidbindung ausgeht. Möglicherweise wurde durch die vorgenommenen Austausche die Nukleotidbindung von der Peptidbindung entkoppelt. Bei der NBD bestehend aus der Kern-NBD von TAP1 (C1) und dem C-Terminus von TAP2 (V2): C1V2 (siehe Abbildung V.2.) ist möglicherweise keine Informationweitergabe an die TMD über den Nukleotidbindezustand in der NBD möglich, und damit keine Konformationsänderung der Peptidbindetasche, die Peptidbindung erlaubt, hervorgerufen werden. Karttunen et al. (2001) entsprechend konnte gezeigt werden, daß die Kern-NBD von TAP2 einen dominanten Einfluss auf die mit ihr gepaarte NBD auszuüben scheint (am Beispiel vom Nukleotidbindeverhalten von 1/2V1 zu sehen) und über ihren C-Terminus die Nukleotidbindung reguliert. Der C-Terminus von TAP2 muß im Laufe des Transportzyklus Konformationsänderungen erfahren, um die Bindung von ATP an der NBD zu begünstigen. Der C-Terminus könnte in Anlehnung an Alberts et al. (2001) und Karttunen et al. (2001) folgende Rolle im Transportzyklus von TAP-WT spielen:

Ausgehend von einem Grundzustand, in dem ATP in NBD1 und ADP in NBD2 gebunden ist und TAP eine peptidkompetente Konformation besitzt, bedingt die Substratbindung Konformationsänderung unter anderem von V2 (C-Terminus von TAP2). Hierdurch wird die ATP-Bindung in NBD2 begünstigt. Da ATP-Bindung an NBD2 keine ATP-Bindung an NBD1 zulässt (siehe Nukleotidbindeverhalten von 1/2V1), führt dies zur Hydrolyse vom in NBD1-gebundenem ATP. Die freiwerdende Energie wird für den Peptidtransport umgesetzt. Die durch den Peptidtransport induzierte Konformationsänderungen in der TMD wird auf V2 übertragen und resultiert in eine für ATP ungünstige Konformation. Hierauf wird ATP in NBD2 hydrolysiert und der Transporter geht in den peptidbindekompetenten Ausgangszustand zurück. Ein erneuter Transportzyklus kann beginnen.



**Abbildung V.3. Modell zur Regulation des Peptidtransports durch den C-Terminus von TAP2.** Im Grundzustand sind ATP in TAP1 und ADP in TAP2 gebunden. Peptidbindung führt zu einer Konformationsänderung von V2, die ATP-Bindung in TAP2 begünstigt und die Hydrolyse von ATP in TAP1 induziert. Die durch den Peptidtransport induzierte Konformationsänderungen in der TMD werden auf V2 übertragen und resultieren in einer für ATP ungünstigen Konformation. Hierauf wird ATP in NBD2 hydrolysiert und der Transporter geht in den peptidkompetenten Ausgangszustand zurück. Ein erneuter Transportzyklus kann beginnen.

## VI. Zusammenfassung

Der Transporter associated with antigen processing (TAP) gehört zur Familie der ATP-Binding Cassette (ABC)-Transporter. (Higgins 1992). TAP besteht aus zwei Untereinheiten TAP1 und TAP2. Jede Untereinheit besteht aus einer Transmembrandomäne (TMD) und einer Nukleotidbindedomäne (NBD). Sowohl die TMDs als auch die NBDs sind funktional verschieden (Alberts et al. 2001, Daumke et al. 2001, Lapinski et al. 2001). Bei den NBDs beruht die unterschiedliche Funktionalität auf intrinsischen Eigenschaften (Daumke et al. 2001). In dieser Arbeit wurde untersucht, in wieweit die ca. 70 Aminosäuren langen C-Termini (V-Regionen) und die Kern-NBDs von TAP (siehe **Abbildung I.6.**) die asymmetrische Funktionalität der Nukleotidbindedomänen bedingen. Dazu wurden rekombinante Transporter hergestellt, in denen die C-Termini oder die Kern-NBDs zwischen NBD1 und NBD2 wechselseitig ausgetauscht wurden (siehe **Abbildung I.6.**). Überdies wurde eine weitere TAP-Mutante, der die C-terminale V-Region fehlt, hergestellt. Die cDNAs für diese chimären Transporter wurden generiert und in TAP-negativen T2-Zellen stabil transfiziert. Es wurden insgesamt sechzehn T2-Zelllinien, die stabil ein oder zwei TAP-Ketten exprimieren, etabliert.

Bei den Untersuchungen zum Nukleotidbindeverhalten stellte sich heraus, daß der C-Terminus von TAP2 eine für ATP-Bindung ungünstige Konformation in der NBD hervorruft, während der C-Terminus von TAP1 die Bindung von ADP und ATP zulässt. Der C-Terminus von TAP2 (V2) stellt möglicherweise einen limitierenden strukturellen Faktor dar, der die Nukleotidbindung während des Transportzyklus reguliert. Die Bindung von ATP in NBD2 blockiert ATP-Bindung in NBD1, was auf eine strukturelle Wechselwirkung zwischen den beiden NBDs hindeutet. Überdies konnte gezeigt werden, daß die ADP-Bindung eine gegebene intrinsische Eigenschaft der Kern-NBD2 ist.

Ein verändertes Verhalten bedingt durch die C-Termini wurde auch bei den Peptidbindeeeigenschaften der chimären Transporter festgestellt. Die Untersuchungen zum Peptidbindeverhalten zeigten, daß unabhängig von der Art der Nukleotidbindung der an die TMDs fusionierten NBDs, ein Einfluss auf die Peptidbindung von den NBDs ausgeht.

Die Untersuchungen zur Transportaktivität zeigten, daß nur der Transporter 2/1C2 eine nennenswerte Aktivität aufweist. Dies deutet darauf hin, daß die Kern-NBD2 (C2) die Kern NBD1 (C1) ersetzen kann aber umgekehrt nicht. Das spricht dafür, daß der C-Terminus mit der Kern-NBD in Wechselwirkung tritt, diese Wechselwirkung ist in der hergestellten NBD: C1V2 zerstört.

Zur Charakterisierung der entscheidenden Aminosäuren, die für den beobachteten Einfluß des C-Terminus verantwortlichen sein könnten, wurden TAP-cDNAs, in denen die Switch-Regionen zwischen NBD1 und NBD2 ausgetauscht wurden, hergestellt. Diese wurden in TAP-negativen T2-Zellen transfiziert und sollen in weiterführenden Studien charakterisiert werden.

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ABC Transporter</b>	ATP Binding Cassette Transporter
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AK</b>	Antikörper
<b>Amp</b>	Ampicillin
<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>Bq</b>	Becquerel (Einheit der Aktivität einer radioaktiven Substanz)
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
<b>CFTR</b>	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
<b>Chaps</b>	3[(3-Cholamidopropyl) dimethylaminio]-1-propansulfonat
<b>Ci</b>	Curie (Einheit der Aktivität einer radioaktiven Substanz)
<b>cpm</b>	counts per minutes, Zerfälle pro Minute (Maß für Radioaktivität)
<b>CTL</b>	cytotoxische T-Lymphozyten
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidin
<b>DMF</b>	N,N-Dimethylformamid
<b>DMP</b>	Dimethyl-Pimelimidat Hydrochloride
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>ddNTP</b>	didesoxynukleotidtriphosphat
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DriPs</b>	Defective ribosomal products
<b>dsDNA</b>	doppelsträngige DNA
<b>DTT</b>	Dithiotreithol
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>ECL</b>	Enhanced Chemie Luminiscence
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGTA</b>	Ethylene bis (oxyethenenitriol)-tetraacetic acid

<b>Endo H</b>	Endoglykosidase H
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FACS</b>	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung, <b>Fluorescence Activated Cell Sorting</b>
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	Stunde
<b>HEPES</b>	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
<b>HisP</b>	Histidinpermease P
<b>HLA</b>	humanes Leukozytenantigen
<b>HPLC</b>	High pressure liquid chromatography: Hochdruckflüssigkeitschromatographie
<b>HRP</b>	horse radish peroxidase ( Meerrettichperoxidase)
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IMDM</b>	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
<b>IP</b>	Immunpräzipitation
<b>IVS</b>	Intervenierende Sequenz
<b>kb</b>	Kilobasenpaare = 1000 Basenpaare
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>Kit</b>	Box mit allen Komponenten, die man für einen Versuch braucht
<b>L</b>	Liter
<b>LB</b>	Luria Broth, ein Bakterienmedium
<b>MCS</b>	Multiple cloning site
<b>MDR</b>	Multidrogen-Resistenz
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex
<b>NBD</b>	Nukleotidbindedomäne
<b>min.</b>	Minuten
<b>neo</b>	Neomycin-Resistenzgen
<b>NTP</b>	Nukleotidtriphosphat
<b>OAc</b>	Acetat
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>ORF</b>	Open reading frame (offenes Leseraster)
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid Gelelektrophorese

<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>RCF</b>	relative centrifugal force wird in g (Erdbeschleunigung gemessen)
<b>rpm</b>	rounds (Umdrehungen) per minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate ( Natriumdodecylsulfat)
<b>sec.</b>	seconds
<b>Sek.</b>	Sekunden
<b>SLO</b>	Streptolysin O
<b>Sulfo-HSAB</b>	Sulfo-N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoate
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TAP</b>	transporter associated with antigen processing
<b>TCR</b>	T-Zellrezeptor (T cell receptor)
<b>TEMED</b>	N, N, N', N' tetramethylendiamin
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>TM</b>	Transmembran
<b>TMD</b>	Transmembrandomäne
<b>Tris</b>	Tris (hydroxymethyl)aminomethan
<b>Tween 20</b>	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
<b>U</b>	Unit, Mengenabgabe bei Enzymen
<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>v / v</b>	volume / volume
<b>Vol</b>	Volumen
<b>w / v</b>	weight (Masse) / Volumen; Beispiel 10 % (w/v) = 10 g je 100 ml Lösung
<b>Wt</b>	Wildtyp

## VII. Literaturverzeichnis

Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R. & Walker, J.E. (1994) **Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria.**

Nature 370, 621-628.

Alberts P, Daumke O, Deveson EV, Howard JC, Knittler MR. (2001): **Distinct functional properties of the TAP subunits coordinate the nucleotide-dependent transport cycle.**

Curr Biol; 11(4):242-51

Alberts P. (1999): **Charakterisierung von Mutationen in der Nukleotidbindedomäne des Peptidtransporters TAP.** Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.

Aleksandrov L, Aleksandrov AA, Chang Xb X, Riordan JR. (2002): **The first nucleotide binding domain of CFTR is a site of stable nucleotide interaction whereas the second is a site of rapid turnover.** J Biol Chem 2002 Feb 22.

Ames GF, Lecar H: **ATP-dependent bacterial transporters and cystic fibrosis: analogy between channels and transporters.** FASEB J 1992 Jun;6 (9):2660-6.

Anderson K, Cresswell P, Gammon M, Hermes J, Williamson A, Zweerink H. (1991): **Endogenously synthesized peptide with an endoplasmic reticulum signal sequence sensitizes antigen processing mutant cells to class I-restricted cell-mediated lysis.** J Exp Med;174(2):489-92

Androlewicz, M.J., Anderson, K.S. & Cresswell, P. (1993) **Evidences that transporters associated with antigen-processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9130-9134.

Arora S, Lapinski PE and Raghavan M. (2001): **Use of chimeric proteins to investigate the role of transporter associated with antigen processing (TAP) structural domains in peptide binding and translocation.** Proc Natl Acad Sci U S A; 98(13):7241-6

Bachmann BJ. (1990): **Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 8.** Microbiol Rev; 54(2):130-97

Bachmann BJ. (1983): **Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 7.** Microbiol Rev; 47(2):180-230.

Bangia N, Lehner PJ, Hughes EA, Surman M, Cresswell P. (1999): **The N-terminal region of tapasin is required to stabilize the MHC class I loading complex.** Eur J Immunol. 29(6):1858-70.

Barnden M. J., Purcell A. W., Gorman J. J. and McCluskey J.. (2000): **Tapasin-mediated retention and optimization of peptide ligands during the assembly of class I molecules.** J. Immunol. 165:322.

Beaudet L, Gros P. (1998): **Mutational analysis of P-glycoprotein in yeast Saccharomyces cerevisiae.** Methods Enzymol; 292:414-27

Belich MP, Glynne RJ, Senger G, Sheer D, Trowsdale J., 1994: **Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins.** Curr Biol.; 4(9):769-76.

Bennett MJ, Kearse KP. (1999): **Influence of N-glycan chain length on chaperone association and intracellular transport of major histocompatibility complex class I proteins.** Biochem Biophys Res Commun. 27;262(2):473-8.

Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C.O.A., Schirmer, N.K., Sprinzl, M. & Hilgenfeld, R. (1993) **Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements.** *Nature* 365, 126-132.

Berger AL, Ikuma M, Hunt JF, Thomas PJ, Welsh MJ. (2002): **Mutations that change the position of the putative gamma-phosphate linker in the nucleotide binding domains of CFTR alter channel gating.** J Biol Chem; 277(3):2125-31

Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennet W.S., Strominger J.L., Wiley D.C.: **Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2.** Nature. 1987 Oct 8-14;329 (6139):506-12.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC.: **The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens.** Nature. 1987 Oct 8-14;329(6139):512-8.

Borst P, Zelcer N, van Helvoort A. (2000): **ABC transporters in lipid transport.** Biochim Biophys Acta ;1486(1):128-44

Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC, Hendil KB, Tanaka K, Dyson J, Rivett J. (2000): **Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells.** Biochem J ; 346 Pt 1:155-61

Byeon L, Shi Z, Tsai MD.(1995): **Mechanism of adenylate kinase. The "essential lysine" helps to orient the phosphates and the active site residues to proper conformations.** Biochemistry; 34(10):3172-82

Carreno, B. M., J. C. Solheim, M. Harris, I. Stroynowski, J. M. Connolly, and T. H. Hansen. (1995): **TAP associates with a unique class I conformation, whereas calnexin associates with multiple class I forms in mouse and man.** J. Immunol. 155:4726.

Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL. (2001): **26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide.** EMBO J 2001; 20 (10):2357-66.

Chang G, Roth CB. (2001): **Structure of MsbA from E. coli: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters.** Science;293(5536):1793-800

Chen D, Androlewicz MJ. (2001): **Heat shock protein 70 moderately enhances peptide binding and transport by the transporter associated with antigen processing.** Immunol Lett; 75(2):143-8

Chu-Ping, M., Slaughter C.A. and DeMartino G.N., 1992: **Identification, purification and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S Proteasome (Macropain).** J Biol Chem.; 267(15):10515-23.

Ciechanover, A., and Schwartz, A. L. (1998): **The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death.** Proc Natl Acad Sci U S A 95, 2727-2730.

Cline J, Braman JC, Hogrefe HH (1996): **PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases.** Nucleic Acids Res. 24(18):3546-51.

Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T. & Diedrich, G. (1999): **The nature of the MHC class I peptide loading complex.** Immunol. Rev. 172, 21-28, 1999.

Currier SJ, Ueda K, Willingham MC, Pastan I, Gottesman MM (1989): **Deletion and insertion mutants of the multidrug transporter.** Biol Chem 1989 Aug 25;264(24):14376-81

Dassa E. (1990) **Cellular localization of the MalG protein from maltose transport system in *Escherichia coli* K12.** Mol. Gen. Genetics 222, 33-36.

Dassa, E. & Hofnung, M. (1985) **Sequence of gene malG in *E. coli* K12: Homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems.** EMBO J. 4, 2287-2293.

Daumke O, Knittler MR. (2001): **Functional asymmetry of the ATP-binding-cassettes of the ABC transporter TAP is determined by intrinsic properties of the nucleotide binding domains.** Eur J Biochem; 268(17):4776-86

Daumke O. (2000): **Untersuchungen zum modularen Aufbau des eukaryontischen ABC-Transporters TAP;** Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.

Degen, E., and D. B. Williams. (1991): **Participation of a novel 88-kD protein in the**

**biogenesis of murine class I histocompatibility molecules.** J. Cell Biol. 112:1099.

DeMars R, Chang CC, Shaw S, Reitnauer PJ, Sondel PM. (1984): **Homozygous deletions that simultaneously eliminate expressions of class I and class II antigens of EBV-transformed B-lymphoblastoid cells. I. Reduced proliferative responses of autologous and allogeneic T cells to mutant cells that have decreased expression of class II antigens.** Hum Immunol; 11(2):77-97

DeMartino GN, Proske RJ, Moomaw CR, Strong AA, Song X, Hisamatsu H, Tanaka K, Slaughter CA. (1996): **Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome.** J Biol Chem.; 271(6):3112-8.

Deverson EV., Leong L., Seelig A., Coadwell WJ, Tredgett EM., Butcher Geoffrey W. and Howard JC. (1998): **Functional Analysis by Site-Directed Mutagenesis of the Complex Polymorphism in Rat Transporter Associated with Antigen Processing.** The Journal of Immunology, , 160: 2767–2779.

Deverson, E.V., Gow, I.R., Coadwell, W.J., Monaco, J.J., Butcher, Geoffrey W. & Howard, J.C. (1990): **MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters.** Nature 348, 738-741.

Dick TP, Bangia N, Peaper DR, Cresswell P. (2002): **Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes.** Immunity.;16(1):87-98.

Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, Stevanovic S, Schild H, Rammensee HG, (1996): **Coordinated dual cleavages by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands.** Cell;86: 253–62.

Diederichs K, Diez J, Greller G, Muller C, Breed J, Schnell C, Vonrhein C, Boos W, Welte W. (2000): **Crystal structure of Malk, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon Thermococcus litoralis.** EMBO J;19(22):5951-61

Diedrich G, Bangia N, Pan M, Cresswell P. (2001): **A role for calnexin in the assembly of the MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum.** J Immunol. 1;166(3): 1703-9.

Driscoll, J., M. G. Brown, D. Finley, and J. J. Monaco. (1993): **MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome.** Nature 365:262.

Egner U, Tomasselli AG, Schulz GE. (1987): **Structure of the complex of yeast adenylate kinase with the inhibitor P1,P5-di(adenosine-5'-)pentaphosphate at 2.6 Å resolution.** Mol Biol;195(3):649-58

Elliot, T. (1997) **How does TAP associate with MHC class I molecules?** Immunol. Today 18, 375-379.

Elliott, T., Cerundolo, V., Elvin, J., and Townsend A. (1991): **Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain.** Nature 351, 402-406.

Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE.(1991): **Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP.** Nature 24;353(6346):726-30.

Foley GE., Lazarus H., Farber S., Uzman BG., Boone BA. And McCarthy RE. (1965): **Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia.** Cancer 18: 522-529.

Frigge Andrea (1996): **Untersuchungen zur Funktion von TAP-Transporter Associated with antigen Processing.** Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.

Fujita A, Matsuoka T, Matsushita K, Kurachi Y. (2001): **Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by ADP and K<sup>+</sup> channel openers: homology model of sulfonylurea receptor carboxyl-termini]** Nippon Yakurigaku Zasshi; 118(3):177-86

Gaczynska, M., K. L. Rock, and A. L. Goldberg. (1993): **γ-Interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes.** Nature 365:264.

Gao B, Adhikari R, Howarth M, Nakamura K, Gold MC, Hill AB, Knee R, Michalak M, Elliott T. (2002): **Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin.** *Immunity*; 16(1):99-109.

Gaudet R, Wiley DC. (2001): **Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing.** *EMBO J* 2001 Sep 3;20(17):4964-72

Geier E, Pfeifer G, Wilm M, Lucchiari-Hartz M, Baumeister W, Eichmann K, Niedermann G. (1999): **A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome.** *Science.*; 12;283(5404):978-81.

Gentzsch, Martina and John R. Riordan (2001): **Localization of Sequences within the C-terminal Domain of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Which Impact Maturation and Stability.** *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 276, No. 2, pp. 1291–1298.

Gileadi, U. & Higgins, C.F. (1997): **Membrane topology of the ATP-binding cassette transporter associated with antigen presentation (TAP1) expressed in Escherichia coli.** *J. Biol. Chem.* 272, 11103-11108.

Gray, C.W., Slaughter, C.A., and DeMartino, G.N. (1994): **PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings.** *J. Mol. Biol.* 236, 7–15.

Groettrup M.und Schmidtke G. (1999): **Die intrazelluläre Prozessierung von Virus- und Tumorantigenen durch das Proteasom.** *Schweiz Med Wochenschr*; 129:1660–5

Groettrup, M., A. Soza, M. Eggers, L. Kuehn, T. P. Dick, H. Schild, H.-G. Rammensee, U. H. Koszinowski, and P.-M. Kloetzel. (1996a): **A role for the proteasome regulator PA28 in antigen presentation.** *Nature* 381:166.

Groettrup M., Kraft R., Kostka S., Standera S., Stohwasser R and Kloetzel P-M. (1996b): **A third interferon- $\gamma$ -induced subunit exchange in the 20S proteasome.** *Eur J immunol* ; 26:863–9.

Groettrup M., Ruppert T., Kuehn L., Seeger M., Standera S., Koszinowski U. and Kloetzel P. M. (1995): **The interferon- $\gamma$ -inducible 11S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20S proteasome in vitro.** J Biol Chem; 270: 23808–15.

Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Sato, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. (1997): **Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution.** Nature, 386, 463-471.

Gunning P., Leavitt J., Muscat G., Ng S.Y., Kedes L. (1987): **A human  $\beta$ -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts.** PNAS Vol. 84: 4831-35.

Hanahan D. (1983): **Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.** J Mol Biol, 166(4):557-80

Harris JL, Alper PB, Li J, Rechsteiner M, Backes BJ. (2001): **Substrate specificity of the human proteasome.** Chem Biol; 8(12):1131-41

Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. (1999): **C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation.** J Biol Chem ;274(31):21873-7

Helenius, A. and Aebi, M. (2001): **Intracellular functions of N-linked Glycans.** Science 291, 2364-2369.

Higgins, C.F. (1992): **ABC Transporters: From Microorganism to Man.** Annu. Rev. Cell. Biol, 67-113.

Hilton CJ, Dahl AM, Rock KL. (2001): **Anti-peptide antibody blocks peptide binding to MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum.** J Immunol; 166(6):3952-6

Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA. (2000): **Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily.** Cell; 101(7):789-800

Hou Y, Cui L, Riordan JR, Chang X (2000): **Allosteric interactions between the two non-equivalent nucleotide binding domains of multidrug resistance protein MRP1.** J Biol Chem 2000 Jul 7;275(27):20280-7

Howard JC. (1995): **Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules.** Curr Opin Immunol ; 7(1):69-76

Hrycyna CA, Ramachandra M, Germann UA, Cheng PW, Pastan I, Gottesman MM. (1999): **Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric.** Biochemistry; 38(42):13887-99

Hughes, E.A. & Cresswell, P. (1998): **The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex.** Curr. Biol. 8, 709-712.

Hughes, E. A., Ortmann, B., Surman, M. & Cresswell, P. (1996): **The protease inhibitor, N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-leucyl-L-norleucinal, decreases the pool of major histocompatibility complex class I-binding peptides and inhibits peptidetrimming in the endoplasmic reticulum.**J. Exp. Med.183, 1569–1578.

Hung, L.-W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.-Q., Ames, G.F.-L. & Kim, S.-H. (1998): **Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter.** Nature 396, 703-707.

Hwang LY, Lieu PT, Peterson PA, Yang Y. (2001): **Functional regulation of immunoproteasomes and transporter associated with antigen processing.** Immunol Res; 24(3):245-72

Janeway A.C., Travers P. (1997): **Immunologie.** Spektrum Akademischer Verlag.

Karttunen JT, Lehner PJ, Gupta SS, Hewitt EW, Cresswell P. (2001): **Distinct functions and cooperative interaction of the subunits of the transporter associated with antigen processing (TAP).** Proc Natl Acad Sci U S A; 98(13):7431-6

Kelly, A.P., Powis, S.H., Kerr, L.-A., Mockridge, I., Elliott, T., Bastin, J., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Trowsdale, J. & Townsend, A. (1992) **Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex.** Nature 355, 641-644.

Kloetzel P.-M. (2001): **Antigen processing by the proteasome.** Nature reviews,2,179-187.

Knittler, M.: **Untersuchungen zu BiP-Interaktion, Kettenassoziation und Degradation leichter Ketten von Immunglobulinen** (1994). Doktorarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.

Knittler, M.R., Alberts, P., Deverson, E.V. & Howard, J.C. (1999): **Nucleotide binding by TAP mediates association with peptide and release of assembled MHC class I molecules.** Curr. Biol. 9, 999-1008.

Koopmann JO, Albring J, Huter E, Bulbuc N, Spee P, Neefjes J, Hammerling GJ, Momburg F. (2000): **Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel.** Immunity. Jul;13 (1): 117-27.

Koopmann JO, Hammerling GJ, Momburg F. (1997): **Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules.** Curr Opin Immunol.; 9 (1):80-8. Review.

Kreimer DI, Chai KP, Ferro-Luzzi Ames G. (2000): **Nonequivalence of the nucleotide-binding subunits of an ABC transporter, the histidine permease, and conformational changes in the membrane complex.** Biochemistry; 39(46):14183-9

Koopmann J.O., Post, M., Neefjes, J.J., Hämmerling, G.J. & Momburg, F. (1996): **Translocation of long peptides by transporters associated with antigen-processing (TAP).** Eur. J. Immunol. 26, 1720-1728.

Laemmli, U.K. (1970): **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 227: 680-685

Lammert, E., D. Arnold, M. Nijenhuis, F. Momburg, G.J.Hammerling, J. Brunner, S. Stevanovic, H.G. Rammensee and H. Schild. 1997: **The endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP.** Eur. J. Immunol. 27:923–927.

Lankat-Buttgereit B, Tampe R. (2002): **The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases.** Physiol Rev.;82(1):187-204. Review.

Lapinski PE, Neubig RR, Raghavan M. (2001): **Walker A lysine mutations of TAP1 and TAP2 interfere with peptide translocation but not peptide binding.** J Biol Chem; 276(10):7526-33

Lauvau G, Kakimi K, Niedermann G, Ostankovitch M, Yotnda P, Firat H, Chisari FV, van Endert PM. (1999): **Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells.** J Exp Med.; 190(9):1227-40.

Leberman R, Egner U. (1984): **Homologies in the primary structure of GTP-binding proteins: the nucleotide-binding site of EF-Tu and p21.** EMBO J ;3(2):339-41.

Lehninger, Albert L. / Nelson, David L. / Cox, Michael M. (1994): **Prinzipien der Biochemie.** Spektrum Akademischer Verlag.

Lehner, P.J. & Trowsdale, J. (1998): **Antigen presentation: Coming out gracefully.** Curr. Biol. 8, 605-608.

Leitzgen, K. and Hass, I. G. (1998): **Protein maturation in the endoplasmic reticulum.** Chemtracts-Biochem. Mol. Biol. 11:423.

Lewis, J. W., and Elliott, T. (1998): **Evidence for successive peptide binding and quality control stages during MHC class I assembly.** Curr. Biol. 8, 717–720.

Lindquist JA, Hammerling GJ, Trowsdale J. (2001): **ER60/ERp57 forms disulfide-bonded intermediates with MHC class I heavy chain.** FASEB J.;15(8):1448-50. No abstract available.

Lindquist, J.A., Jensen, O.N., Mann, M. & Hämmerling G.J. (1998): **ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly.** EMBO J. 17, 2186-2195.

Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998): **Bioanalytik.** Spektrum Akademischer Verlag.

Lutz PM, Cresswell P. (1987): **An epitope common to HLA class I and class II antigens, Ig light chains, and beta 2-microglobulin.** Immunogenetics 1987;25(4):228-33

Madden DR.: **The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes.** Annu Rev Immunol 1995;13:587-622.

Manavalan, P., Dearborn, D.G., McPherson, J.M. & Smith, A.E. (1995): **Sequence homologies between nucleotide binding regions of CFTR and G-proteins suggest structural and functional similarities.** FEBS Lett. 366, 87-91.

Matsuo M, Tanabe K, Kioka N, Amachi T, Ueda K. (2000): **Different binding properties and affinities for ATP and ADP among sulfonylurea receptor subtypes, SUR1, SUR2A, and SUR2B.** J Biol Chem; 275(37):28757-63

Matsuoka T, Matsushita K, Katayama Y, Fujita A, Inageda K, Tanemoto M, Inanobe A, Yamashita S, Matsuzawa Y, Kurachi Y. (2000): **C-terminal tails of sulfonylurea receptors control ADP-induced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive K(+) channels.** Circ Res 2000 Nov 10;87(10):873-80

McConahey, P.J. & Dixon, F.J. (1980): **Radioiodination of proteins by use of the chloramine-T method.** Meth. Enzymol. 70, 429-431.

McMullen TW, Li J, Sheffield PJ, Aoki J, Martin TW, Arai H, Inoue K, Derewenda ZS. (2000): **The functional implications of the dimerization of the catalytic subunits of the mammalian brain platelet-activating factor acetylhydrolase (Ib)**. *Protein Eng*; 13(12): 865-71

Meyer, T.H., van Endert, P.M., Uebel, S., Ehring, B. & Tampé, R. (1994) **Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells**. *FEBS Lett.* 351, 443-447.

Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin (1999): **one protein, one gene, many functions**. *Biochem J.* 1;344 Pt 2:281-92. Review.

Momburg, F. & Hämmerling G.J. (1998): **Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class-I molecules**. *Adv. Immunol.* 68, 191-256.

Momburg F, Ortiz-Navarrete V, Neefjes J, Goulmy E, van de Wal Y, Spits H, Powis SJ, Butcher GW, Howard JC, Walden P, et al. (1992): **Proteasome subunits encoded by the major histocompatibility complex are not essential for antigen presentation**. *Nature*;360(6400):174-7

Monaco, J.J., Cho, S. & Attaya, M. (1990) **Transporter protein genes in the murine MHC: Possible implications for antigen processing**. *Science* 250, 1723-1726.

Morrice, N.A. & Powis, S.J. (1998): **A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules**. *Curr. Biol.* 8, 713-716.

Mott, J.D., Pramanik, B.C., Moomaw, C.R., Afendis, S.J., DeMartino, G.N., and Slaughter, C.A. (1994): **PA28, an activator of the 20 S proteasome, is composed of two nonidentical but homologous sub-units**. *J. Biol. Chem.* 269, 31466–31471.

Mourez M, Hofnung M, Dassa E. (1997): **Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases**

**defines an important site of interaction with the ATPase subunits.** EMBO J; 16(11):3066-77.

Mülhardt, C. (2000): **Der Experimentator: Molekularbiologie.** Spektrum Akademischer Verlag.

Murata S, Udono H, Tanahashi N, Hamada N, Watanabe K, Adachi K, Yamano T, Yui K, Kobayashi N, Kasahara M, Tanaka K, Chiba T. (2001): **Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta.** EMBO J.; 20 (21) :5898-907.

Nandi D, Jiang H, Monaco JJ., 1996: **Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit.** J Immunol.; 156(7):2361-4.

Neefjes, J.J., Momburg, F. & Hämmerling, G.J. (1993): **Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter.** Science 261, 769-771.

Nijenhuis, M. & Hämmerling, G.J. (1996b): **Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding-site.** J. Immunol. 157, 5467-5477.

Nossner, E. and Parham, P. (1995): **Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules.** J. Exp. Med.181: 327-337.

Oliver J.D., Roderick, H.L., Liewellyn, D.H., and High, S. (1999): **ERp functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin.** Mol.Biol.Cell 10, 2573-2582.

Okudo H, Urade R, Moriyama T, Kito M. (2000): **Catalytic cysteine residues of ER-60 protease.** FEBS Lett.;465(2-3):145-7.

Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P.J., Sadasivan, B., Herberg, J.A., Grandea, A.G., Riddell, S.R., Tampé, R., Spies, T. & Trowsdale, J. (1997): **A critical role for tapasin in the**

**assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes.** Science 277, 1306-1309.

Ortmann, B., Androlewicz, M.J., and Cresswell, P. (1994): **MHC class I/beta 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding.** Nature 386, 864-867.

Otsu M, Urade R, Kito M, Omura F, Kikuchi M. (1995): **A possible role of ER-60 protease in the degradation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum.** J Biol Chem.; 270(25):14958-61.

Owen, B. A., and L. R. Pease. (1999): **TAP association influences the conformation of nascent MHC class I molecules.** J. Immunol. 162:4677.

Pamer, E. and Cresswell, P. (1998): **Mechanism of MHC class I-restricted antigen processing.** Annu. Rev. Immunol. 16, 323-358.

Paulsson KM, Wang P, Anderson PO, Chen S, Pettersson RF, Li S. (2001): **Distinct differences in association of MHC class I with endoplasmic reticulum proteins in wild-type, and beta 2-microglobulin- and TAP-deficient cell lines.** Int Immunol. 13 (8):1063-73.

Pearce RB, Trigler L, Svaasand EK, Chen HM, Peterson CM. (1995) **Levels of Tap-1 and Tap-2 mRNA and expression of Kd and Db on splenic lymphocytes are normal in NOD mice.** Diabetes May;44(5):572-9

Powe A, Zhou Z, Hwang TC, Nagel G. (2002): **Quantitative analysis of ATP-dependent gating of CFTR.** Methods Mol Med; 70:67-98

Powis, S.J., Townsend, A.R.M., Deverson, E.V., Bastin, J., Butcher, Geoffrey W. & Howard, J.C. (1991): **Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter.** Nature 354, 528-531.

Proff C, Kolling R. (2001): **Functional asymmetry of the two nucleotide binding domains in the ABC transporter Ste6.** Mol Gen Genet; 264(6):883-93

Rajagopalan, S. and Brenner, MB. (1994): **Calnexin retains unassembled major histocompatibility complex class I free heavy chains in the endoplasmic reticulum;** J. Exp. Med. 180: 407- 412.

Rehm, H. (2000): **Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics.** Spektrum Akademischer Verlag.

Reits EAJ, Vos JC, Gromme M. and Neefjes J. (2000): **The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins.** Nature; 404:774-778.

Roth, M., Lewit-Bentley, A., Michel, H., Deisenhofer, J., Huber, R. and Oesterhelt, D. (1989): **Detergent structure in crystals of a bacterial photosynthetic reaction center.** Nature 340, 659-662.

Rock, K. L., and Goldberg, A. L. (1999): **Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides.** Annu. Rev. Immunol. 17, 739-779.

Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994): **Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules.** Cell 78, 761–771.

Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T., and Cresswell, P. (1996): **Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP.** Immunity 5, 103-114.

Salter RD, Howell DN, Cresswell P. (1985): **Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids.** Immunogenetics; (3):235-46

Sambrook J., Frisch E. and Maniatis T (1989): **Molecular Cloning – A Laboratory Manual;** Cold Spring Laboratory Press.

Saveanu L, Daniel S, van Endert PM. (2001): **Distinct functions of the ATP binding cassettes of transporters associated with antigen processing: a mutational analysis of Walker A and B sequences.** J Biol Chem; 276(25):22107-13

Schmitt L, Tampe R. (2000): **Affinity, Specificity, Diversity: A Challenge for the ABC Transporter TAP in Cellular Immunity.** Chembiochem Europ J Chem Biol; 1(1):16-35

Schneider E. (2000): **ABC-Transporter: Eine Proteinfamilie für den Transport chemischer Verbindungen über biologische Membranen.** Chemie in unserer Zeit, 34.Jahrg. 2000 / Nr.2.

Schneider E, Hunke S.(1998): **ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains.**  
FEMS Microbiol Rev ; 22(1):1-20

Schneider E, Wilken S, Schmid R. (1994): **Nucleotide-induced conformational changes of MalK, a bacterial ATP binding cassette transporter protein.**  
J Biol Chem; 269 (32):20456-61

Schneider C, Newman RA, Sutherland DR, Asser U, Greaves MF. (1982): **A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix.** J Biol Chem; 257(18):10766-9.

Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. (2000): **Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes.** Nature; 404(6779):770-4

Schwarz, K., M. Eggers, A. Soza, U. H. Koszinowski, P. M. Kloetzel, and M. Groettrup. 2000a: **The proteasome regulator PA28  $\alpha/\beta$  can enhance antigen presentation without affecting 20S proteasome subunit composition.** Eur. J. Immunol. 30:3672.

Schwarz, K., M. van den Broek, S. Kostka, R. Kraft, A. Soza, G. Schmidtke, P. M. Kloetzel, and M. Groettrup. 2000b: **Overexpression of the proteasome sub-units LMP2, LMP7, and MECL-1 but not PA28 $\alpha/\beta$  enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope.** J. Immunol. 165:768.

Seeger, M., Ferrell, K., Frank, R. and Dubiel, W. (1997): **HIV-1 Tat inhibits the 20S proteasome and its 11S regulator-mediated activation.** J. Biol. Chem. 272, 8145-8148.

Senior AE, Bhagat S. (1998): **P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites.** *Biochemistry*; 37(3):831-6

Senior, A.E. & Gadsby, D.C. (1997) **ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR.** *Semin. Cancer Biol.* 8, 143-150.

Senior, A.E., Wilke-Mounts, S. & Al-Shawi, M.K. (1993) **Lysine 155 in beta-subunit is a catalytic residue of Escherichia coli F1 ATPase.** *J. Biol. Chem.* 268, 6989-6994.

Serwold T., Gaw S. and Shastri N. (2001): **ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules.** *Nature immunology*; 2; 644-651.

Sherperd, J.C., Schumacher, T.N.M., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L., Janeway, C.A.J. & Tonegawa, S. (1993) **TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective.** *Cell* 74, 577-584.

Shyamala V, Baichwal V, Beall E, Ames GF. (1991):**Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations.** *J Biol Chem*; 266(28):18714-9

Speiser DM, Ames GF. (1991): **Salmonella typhimurium histidine periplasmic permease mutations that allow transport in the absence of histidine-binding proteins.** *J Bacteriol*; 173(4):1444-51

Spies, T., Cerundolo, V., Colonna, M., Cresswell, P., Townsend, A. & DeMars, R. (1992): **Presentation of viral antigen by MHC class molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer.** *Nature* 355, 644-646.

Sugita, M. and Brenner, MB. (1994): **An unstable beta 2-microglobulin: major histocompatibility complex class I heavy chain intermediate dissociates from calnexin and then is stabilized by binding peptide.** *J. Exp. Med.* 180: 2163-2171.

Suh, W.K., Mitchell, E.K., Yang, Y., Peterson, P.A., Waneck, G.L. & Williams, D.B. (1996): **MHC-class I molecules form ternary complexes with calnexin and TAP and undergo**

**peptide-regulated interaction with TAP via extracellular domains.** J. Exp. Med. 184, 337-348.

Suh, W.K., Cohen-Doyle, M.F., Früh, K., Peterson, P.A. & Williams, D.B. (1994): **Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing.** Science 264, 1322-1326.

Tan P, Kropshofer H, Mandelboim O, Bulbuc N, Hammerling GJ, Momburg F. (2002): **Recruitment of MHC class I molecules by tapasin into the transporter associated with antigen processing-associated complex is essential for optimal peptide loading.** J Immunol.; 15;168(4):1950-60.

The WTO NOMENCLATURE COMMITTEE. **Factors of the HLA system.** Immunogenetics 36: 135-148, 1991.

Trapani JA, Mizuno S, Kang SH, Yang SY, Dupont B. (1989): **Molecular mapping of a new public HLA class I epitope shared by all HLA-B and HLA-C antigens and defined by a monoclonal antibody.** Immunogenetics; 29(1):25-32

Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. (1990): **Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters.** Nature; 348(6303):741-4

Townsend, A., Elliot, T., Cerundolo, V., Foster, L., Barber, B. & Tse, A. (1990) **Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro.** Cell 62, 285-295.

Townsend, A. & von Bodmer, H. (1989): **Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes.** Annu. Rev. Immunol. 7, 601-624.

Townsend A, Trowsdale J. (1993): **The transporters associated with antigen presentation.** Semin Cell Biol; 4(1):53-61.

Uebel, S., Kraas, W., Kienle, S., Wiesmüller K.-H., Jung, G. & Tampé, R. (1997) **Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial libraries.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 8976-8981.

Ueda K, Inagaki N, Seino S (1997) **MgADP antagonism to Mg<sup>2+</sup>-independent ATP binding of the sulfonyleurea receptor SUR1.** J Biol Chem Sep 12;272(37):22983-6.

Urade R, Nasu M, Moriyama T, Wada K, Kito M. (1992 a): **Protein degradation by the phosphoinositide-specific phospholipase C-alpha family from rat liver endoplasmic reticulum.** J Biol Chem. 1992 Jul 25;267(21):15152-9.

Urade R, Kito M. (1992 b): **Inhibition by acidic phospholipids of protein degradation by ER-60 protease, a novel cysteine protease, of endoplasmic reticulum.** FEBS Lett.; 312(1):83-6.

Urbatsch IL, Beaudet L, Carrier I, Gros P (1998): **Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites.** . Biochemistry 1998 Mar 31;37(13):4592-602

Urlinger, S., Kuchler, K., Meyer, T.H., Uebel, S. & Tampé, R. (1997): **Intracellular location, complex-formation, and function of the transporter associated with antigen-processing in yeast.** Eur. J. Biochem. 245, 266-272.

van Endert, P.M. (1999) **Role of nucleotides and peptide substrate for stability and functional state of the human ABC family transporters associated with antigen processing.** J. Biol. Chem. 274, 14632-14638.

van Endert, P.M., Tampé, R., Meyer, T.H., Tisch, R., Bach, J.F.& McDevitt, H.O. (1994): **A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing.** Immunity 1, 491-500.

van Hall, T., A. Sijts, M. Camps, R. Offringa, C. Melief, P. M. Kloetzel, and F. Ossendorp. (2000): **Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28.** J. Exp. Med. 192:483.

Van Kaer L. (2001): **Accessory proteins that control the assembly of MHC molecules with peptides.** Immunol Res.; 23(2-3):205-14. Review.

Vassilakos, A., Cohendoyle, M.F., Peterson, P.A., Jackson, M.R. & Williams, D.B. (1996) **The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class-I histocompatibility molecules.** EMBO J. 15, 1495-1506.

Velarde G, Ford RC, Rosenberg MF, Powis SJ. 2001: **Three-dimensional structure of transporter associated with antigen processing (TAP) obtained by single Particle image analysis.** J Biol Chem; 276(49):46054-63

Vos JC, Reits EA, Wojcik-Jacobs E, Neefjes J. (2000): **Head-head/tail-tail relative orientation of the pore-forming domains of the heterodimeric ABC transporter TAP.** Curr Biol, 13;10(1):1-7

Vos, J.C., Spee, P., Momburg, F. & Neefjes, J.J. (1999): **Membrane topology of the two subunits of the transporter associated with antigen processing revealed a three domain structure.** J. Immunol. 163, 6679-6685.

Wang EW, Kessler BM, Borodovsky A, Cravatt BF, Bogyo M, Ploegh HL, Glas R. (2000): **Integration of the ubiquitin-proteasome pathway with a cytosolic oligopeptidase activity.** Proc Natl Acad Sci U S A.; 29;97(18):9990-5.

Wei ML, Cresswell P. (1992): **HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides.** Nature; 356(6368):443-6

Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E, Bauer JC (1994): **Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction.** Gene 151, 119-123.

White LC, Wright KL, Felix NJ, Ruffner H, Reis LF, Pine R, Ting JP. (1996): **Regulation of LMP2 and TAP1 genes by IRF-1 explains the paucity of CD8+ T cells in IRF-1-/- mice.** Immunity; 5(4):365-76

Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P: **Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity.** Biotechniques 1997 Mar; 22 (3): 474-6, 478-81.

Woodward EC, Monaco JJ., 1995: **Characterization and mapping of the gene encoding mouse proteasome subunit DELTA (Lmp19)**. Immunogenetics.; 42 (1):28-34.

Yan G, Shi L, Faustman D (1999): **Novel splicing of the human MHC-encoded peptide transporter confers unique properties**. J Immunol; 162(2):852-9

Yoshida M, Amano T. (1995): **A common topology of proteins catalyzing ATP-triggered reactions**. FEBS Lett; 359(1):1-5

Yuan YR, Blecker S, Martsinkevich O, Millen L, Thomas PJ, Hunt JF. (2001): **The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter**. J Biol Chem ; 276(34):32313-21

## IX. Anhang

### Nukleotidsequenz von den hergestellten chimären TAP-Ketten in dem Expressionsvektor pHBApr1neo:

#### TAP1C2:

1 GGCTTCCTTT GTCCCAATC TGGGCGCGC CCGGCGCCC CTGGCGGCCT AAGGACTCGG  
61 CGCGCCGGAA GTGGCCAGGG CGGGGGCGAC TTCGGCTCAC AGCGCGCCCG GCTATTCTCG

pHBApr1neo | TAP1  
← EcoRI →

121 CAGGATCAGT SalI CGACCTGCAG EcoRI CCAAGCTGG AATTCGGCG CGGAGAGTTC CAGGCTGGGA

→ ORF

181 CCGGACTCTG GACAGCGCAC GCTCGATGGC TGCGCACGCC TGGCCGACGG CCGCCTTGCT  
241 GCTGCTGCTG GTGGACTGGC TGCTGCTGCG GCCCGTGCTC CCGGAATCT TCTCCCTGTT  
301 GGTTCCTGAG GTGCCACTGC TCCGGGTCTG GGCCGTGGGC CTGAGTCGCT GGGCTATCCT  
361 GGGACTAGGG GTCCGCGGGG TCCTCGGGGT CACCGCGGGA GCCCGTGGCT GGCTGGCTGC  
421 TTTGCAGCCG CTGGTGGCGG CGCTGGGTTT GGCCCTGCCT GGACTTGCCCT CGTTCCGAAA  
481 GCTGTCCGCC TGGGGAGCAC TCCGGGAGGG TGACAACGCT GGACTGCTCC ACTGGAACAG  
541 TCGCTTAGAT GCCTTCGTTT TCAGTTATGT GGCCGCATTG CCCGCAGCTG CCCTGTGGCA  
601 CAAGTTGGGG GGCTTCTGGG CGCCAGTGG CCACAAGGGC GCTGGAGACA TGCTGTGTCTG  
661 GATGCTAGGC TTCCTGGACT CCAAGAAGGG GCGTCTCCAC CTGGTTCTGG TTCTCTTGAT

BamHI

721 CCTCTCCTGC CTTGGGGAAA TGGCCATTCC CTTCTTCACA GGCCGCATCA CTGACTGGAT  
781 CCTTCAGGAT AAGACAGCCC CCAGCTTCGC CCGCAACATG TGGCTCATGT GTATTCTTAC  
841 CATAGCCAGT ACAGTGCTGG AGTTTGCAGG AGATGGAATC TACAACATCA CCATGGGCCA  
901 CATGCACAGC CGCGTGCATG GAGAGGTGTT TCGGGCCGTC CTTACCAGG AGACAGGATT  
961 TTTCTGAAG AACCCAACAG GTTCCATCAC ATCTCGGGTG ACTGAGGACA CCTCCAACGT  
1021 GTGCGAGTCC ATTAGTGACA AGCTGAACCT GTTCCTGTGG TACCTGGGGC GAGGCCTGTG  
1081 TCTCCTGGCG TTCATGATTT GGGGGTCATT CTACCTCACT GTGGTCACCC TGCTCAGCCT  
1141 GCCTCTGCTT TTCCTTCTGC CCAGGAGGCT GGGGAAAGTG TACCAGTCAC TGGCAGTGAA  
1201 GGTGCAGGAG TCTCTAGCAA AGTCCACGCA GGTGGCCCTC GAGGCCCTGT CGGCGATGCC  
1261 TACCGTACGG AGCTTTGCCA ACGAGGAGGG AGAGGCCAG AAGTTTAGGC AGAAGTTGGA  
1321 AGAAATGAAG CCGCTAAACA AGAAAGAGGC CTTGGCTTAC GTCAGTGAAG TCTGGACCAT  
1381 GAGTGTCTCG GGAATGCTGC TGAAGGTGGG TATTCTGTAC CTCGGTGGGC AGCTGGTGGT

1441 CAGAGGGGCT GTCAGCAGCG GCAACCTCGT CTCCTTTGTT CTCTACCAGC TTCAGTTCAC  
 1501 CAGGGCCGTG GAGGTCCTGC TCTCCATCTA TCCCTCCATG CAGAAGTCCG TGGGCGCTTC  
 1561 GGAGAAAATA TTCGAATACC TGGACCGGAC TCCCTGCTCT CCGCTCAGTG GCTCACTGGC  
 1621 ACCTTTAAAC ATGAAAGGCC TCGTCAAGTT CCAAGATGTC TCCTTTGCCT ACCCAAACCA  
  

**TAP1** ◀ ▶ **TAP2 (C2)**

 1681 TCCCAACGTC CAGGTGCTTC AGGGGCTGAC TTTTACTCTA CATCCTGGAA AGGTGACGGC  
 1741 TTTGGTGGGA CCCAATGGGT CAGGGAAGAG CACCGTGGCC GCCCTGCTGC AGAACCTGTA  
 1801 CCAGCCCACC GGGGGCCAGC TGCTGCTGGA TGGCGAGCCC CTGGTCCAGT ACGATCATCA  
 1861 CTACCTGCAC CGCCAGGTGG TTCTGGTGGG GCAGGAGCCT GTGCTGTTCT CCGGTTCTGT  
 1921 CAAGGACAAT ATTGCCTATG GCCTGAGGGA CTGTGAGGAC GCTCAAGTGA TGGCTGCTGC  
 1981 CCAGGCGGCC TGTGCAGACG ACTTCATAGG GGAAATGACG AATGGAATAA ACACAGAAAT  
 2041 CGGGGAGAAA GGGAGCCAGT TAGCTGTGGG ACAGAAACAA CGTCTGGCCA TTGCCCGGGC  
  

**(C2) TAP2** ← || → **TAP1**

 2101 CCTTGTGCGG AACCCGCGGG TCCTCATCCT GGATGAGGCT ACCAGTGCCC TGGACGCCGG  
 2161 CAACCAGCTA CGGGTCCAGC GGCTCCTGTA TGAGAGCCCC GAGTGGGCCT CTCGACCGGT  
 2221 TCTTCTGATC ACCCAGCAGC TCAGCCTGGC AGAGCGGGCC CACCACATCC TCTTCCTCAA  
 2281 AGAAGGCTCT GTCTGCGAGC AGGGCACCCA CCTGCAGCTC ATGGAGAGAG GAGGGTGTTA  

↓ **ORF - Ende**

 2341 CCGGTCCATG GTGGAGGCTC TTGCGGCTCC TTCAGACTGT GAGGCCTCCA GACACTGAGC  
 2401 CCTCTCAGGA CTGTGGCCAG GATCTGACCC ACAGGGACTG TGCTGGAGGC TAGCGTCAGG  
 2461 ATAAAGATTG GGACCCTTTG GACTTTGTTT ATTTTGGTGG GCTTGGTGGG TGAGGGCCAG  
 2521 GGGATGGGAT GGTGCTGGG TGGGGTGGGT GGTTTAAACA TTATTTTTTTT CTAAATATAA  
  

**pHSApr1ne**  
 ○ →  
**EcoRI**

 2581 AAATAATAAA TATATATATA ATACTTTAAA AAAAAAAAAA AAAAAAACCG GAATTCCAGC  
  

**BamHI**

 2641 TTCGAGGGAT CCAGACATGA TAAGATACAT TGATGAGTTT GGACAAACCA CAACTAGAAT  
 2701 GCAGTGAAAA AAATGCTTTA TTTGTGAAAT TTGTGATGCT ATTGCTTTAT TTGTAACCAT  
 2761 TATAAGCTGC AATAACAAG TTAACAACAA CAATTGCATT CTTTTATGT TTCAGGTTCA  
 2821 GGGGAGGTG TGGGAGGTTT TTTAAAGCAA GTAAAACCTC TACAAATGTG GTAT

## TAP1V2:

1 GTGTTTGCCT TTTATGGTAA TAACGCGGCC GGCCCGGGCT TCCTTTGTCC CCAATCTGGG  
61 CGCGCGCCGG CGCCCCCTGG CGGCCTAAGG ACTCGGCGCG CCGGAAGTGG CCAGGGCGGG  
121 GGCGACTTCG GCTCACAGCG CGCCCGGCTA TTCTCGCAGG ATCAGTCGAC CTGCAGCCCA  
**SalI**  
pH5Apr1neo | TAP1  
← EcoRI →  
181 AGCTGGAATT CCGGCGCGGA GAGTTCAGG CTGGGACCGG ACTCTGGACA GCGCACGCTC  
→ ORF  
241 GATGGCTGCG CACGCCTGGC CGACGGCCGC CTTGCTGCTG CTGCTGGTGG ACTGGCTGCT  
301 GCTGCGGCC GTGCTCCCGG GAATCTTCTC CCTGTTGGTT CCCGAGGTGC CACTGCTCCG  
361 GGTCTGGGCC GTGGGCCTGA GTCGCTGGGC TATCCTGGGA CTAGGGGTCC GCGGGTCTCT  
421 CGGGGTACCC GCGGGAGCCC GTGGCTGGCT GGCTGCTTTG CAGCCGCTGG TGGCGGCGCT  
481 GGGTTTGGCC CTGCCTGGAC TTGCCTCGTT CCGAAAGCTG TCCGCCTGGG GAGCACTCCG  
541 GGAGGGTGAC AACCGTGGAC TGCTCCACTG GAACAGTCGC TTAGATGCCT TCGTTCCTCAG  
601 TTATGTGGCC GCATTGCCCCG CAGCTGCCCT GTGGCACAAG TTGGGGGGCT TCTGGGCGCC  
661 CAGTGGCCAC AAGGGCGCTG GAGACATGCT GTGTCGGATG CTAGGCTTCC TGACTCCAA  
721 GAAGGGGCGT CTCCACCTGG TTCTGGTTCT CTTGATCCTC TCCTGCCTTG GGGAAATGGC  
**BamHI**  
781 CATTCCCTTC TTCACAGGCC GCATCACTGA CTGGATCCTT CAGGATAAGA CAGCCCCCAG  
841 CTTCGCCCCG AACATGTGGC TCATGTGTAT TCTTACCATA GCCAGTACAG TGCTGGAGTT  
901 TGCAGGAGAT GGAATCTACA ACATCACCAT GGGCCACATG CACAGCCGCG TGCATGGAGA  
961 GGTGTTTCGG GCCGTCTTTC ACCAGGAGAC AGGATTTTTC CTGAAGAACC CAACAGGTTT  
1021 CATCACATCT CGGGTGA CTG AGGACACCTC CAACGTGTGC GAGTCCATTA GTGACAAGCT  
1081 GAACCTGTTC CTGTGGTACC TGGGGCGAGG CCTGTGTCTC CTGGCGTTCA TGATTTGGGG  
1141 GTCATTCTAC CTCACTGTGG TCACCCTGCT CAGCCTGCCT CTGCTTTTCC TTCTGCCCAG  
1201 GAGGCTGGGG AAAGTGTACC AGTCACTGGC AGTGAAGGTG CAGGAGTCTC TAGCAAAGTC  
1261 CACGCAGGTG GCCCTCGAGG CCCTGTCGGC GATGCCCTACC GTACGGAGCT TTGCCAACGA  
1321 GGAGGGAGAG GCCCAGAAGT TTAGGCAGAA GTTGAAGAA ATGAAGCCGC TAAACAAGAA  
1381 AGAGGCCTTG GCTTACGTCA CTGAAGTCTG GACCATGAGT GTCTCGGGAA TGCTGCTGAA  
1441 GGTGGGTATT CTGTACCTCG GTGGGCAGCT GGTGGTCAGA GGGGCTGTCA GCAGCGGCAA  
1501 CCTCGTCTCC TTTGTTCTCT ACCAGCTTCA GTTCACCAGG GCCGTGGAGG TCCTGCTCTC  
1561 CATCTATCCC TCCATGCAGA AGTCCGTGGG CGCTTCGGAG AAAATATTCG AATACCTGGA  
1621 CCGGACTCCC TGCTCTCCGC TCAGTGGCTC ACTGGCACCT TTAAACATGA AAGGCCTCGT

1681 CAAGTTCCAA GATGTCTCCT TTGCCTACCC AAACCATCCC AACGTCCAGG TGCTTCAGGG  
 1741 GCTGACTTTT ACGCTGTATC CCGGGAAGGT GACCGCCTTG GTGGGACCCA ATGGGTCAGG  
 1801 GAAGAGCACC GTGGCCGCC TGCTGCAGAA CCTGTACCAG CCCACCGGGG GCAAGGTGCT  
 1861 CCTGGATGGC GAGCCCCTGG TCCAGTATGA TCACCACTAC CTGCACACGC AGGTGGCCGC  
 1921 AGTGGGACAA GAGCCACTGC TATTTGGAAG AAGTTTTCGG GAAAATATTG CCTATGGCCT  
 1981 GACGCGGACT CCAACCATGG AGGAAAATCAC AGCTGTGGCC ATGGAGTCCG GAGCCCACGA  
 2041 TTTTCATCTCT GGATTCCCTC AGGGCTATGA CACAGAGGTA GGTGAAACTG GGAACCAGCT  
 2101 GTCAGGAGGT CAGCGACAGG CGGTGGCCTT GGCTCGAGCC TTGATCCGGA AGCCACGCCT  
  
 2161 GCTTATCTTG GACGATGCCA  **TAP2 (V2)** TGCGAGCAGG CCCTTCAGAC  
 2221 CTGGAGATCG CAGGAGGACA GGACGATGCT GGTCATTGCT CACCGGCTGC ACACGGTTCA  
 2281 GAATGCTGAC CAAGTTCTGG TGCTCAAGCA GGGCAGCTG GTGGAGCACG ACCAGCTCAG  
 2341 GGATGAGCAG GATGTCTACG CTCACTTGGT ACAGCAGCGG CTGGAGGCGT  **ORF - Ende** GAGGCCTCCA  
 2401 GACACTGAGC CCTCTCAGGA CTGTGGCCAG GATCTGACCC ACAGGGACTG TGCTGGAGGC  
 2461 TAGCGTCAGG ATAAAGATTG GGACCCTTTG GACTTTGTTT ATTTTGGTGG GCTTGGTGGG  
 2521 TGAGGGCCAG GGGATGGGAT GGTGTCTGGG TGGGGTGGGT GGTTTAAACA TTATTTTTTT  
 2581 CTAAATATAA AAATAATAAA TATATATATA AACTTTTAAA AAAAAAAAAA AAAAAAACCG  
  
**pH5Apr1neo**  
EcoRI  BamHI  
 2641 GAATTCCAGC TTCGAGGGAT CCAGACATGA TAAGATACAT TGATGAGTTT GGACAAACCA  
 2701 CAACTAGAAT GCAGTGAAAA AAATGCTTTA TTTGTGAAAT TTGTGATGCT ATTGCTTTAT  
 2761 TTGTAACCAT TATAAGCTGC AATAACAAG TTAACAACAA CAATTGCATT CATTTTATGT  
 2821 TTCAGGTTCA GGGGAGGTG TGGGAGGTTT TTTAAAGCAA GTAAAACCTC TACAAATGTG  
 2881 GTATGGCTGA TTATGATCCG GCTGCCCTCG CCGTTTCGGT GATGACGGTG AAAACCTCTG  
 2941 ACACATGCAG

## TAP2C1:

1 GTGTTTGCCT TTTATGGTAA TAACGCGGCC GGCCCGGGCT TCCTTTGTCC CCAATCTGGG  
61 CGCGCGCCGG CGCCCCCTGG CGGCCTAAGG ACTCGGCGCG CCGGAAGTGG CCAGGGCGGG  
121 GGCGACTTCG GCTCACAGCG CGCCCGGCTA TTCTCGCAGG ATCAGTTCGAC CTGCAGCCCA  
**Sali**

pH5Apr1neo | | TAP2  
← EcoRI →

181 AGCTGGAATT CCGGGCGTCG CTGCGCACCC AGAAGACCCA GTTTGGGAGG AAGCAGATTT  
241 CAGAAGCTCT CCTGAGGTGC CGCTCCGAG CCGCAGACCC CACCATGGCG CTGTCCCACC  
301 CGAGGCCCTG GGCCTCTCTG CTGCTGGTGG ACCTGGCTTT ACTTGGGTTG CTACAAAGCT  
361 CTCTGGGAAC TCTGCTTCCC CCGGGGCTGC CAGGACTATG GCTGGAGGGC ACCCTGCGAC  
421 TTGGAGTGCT GTGGGGACTG CTAAAAGTGG GAGGGCTGCT GAGACTCGTG GGGACCTTTC  
481 TGCCCTTGCT CTGCCTGACT AACCCCCTGT TTTTCTCGCT GAGAGCCCTG GTGGGAAGCA  
541 CCATGAGCAC CTCAGTAGTC AGAGTGGCTT CTGCCCTTTG GGGCTGGCTG CTTGCTGACT  
601 ATGGAGCCGT GCGTGTGAGC CTTGCCGTGT GGGCTGTGCT GAGCCCCGCT GGAGCACAGG  
661 AGAAGGAACC AGGCCAGGAG AATAACAGAG CACTCATGAT ACGGTTGCTG AGGCTGTCCA  
721 AGCCGGATCT GCCTTTCCTC ATCGTTGCCT TCATCTTTCT TGCATGGCT GTGTGGTGGG  
781 AGATGTTTAT CCCTCATTAT TCGGGTCGTG TGATTGACAT CCTGGGAGGT GATTTTGACC  
841 CAGACGCCTT TGCAGCGCC ATCTTTTTCA TGTGCTTATT CTCTGTTGGG AGCTCCCTCT  
901 CTGCAGGCTG CCGAGGAGGC TCCTTCCTCT TTGCCGAGTC CAGGATCAAC CTGCGCATA  
961 GAGAGCAGCT TTTCTCATCT TTGTTGCGCC AAGACCTTGC ATTCTTCCAG GAGACCAAGA  
1021 CAGGGGAGCT GAACTCACGG CTGAGCTCGG ACACCTCCCT GATGAGCCAG TGGCTCTCTT  
1081 TAAATGCCAA TATCCTGCTG CGGAGCCTGG TGAAGGTGGT GGGGCTGTAC TACTTCATGC  
1141 TCCAGGTCTC CCCGAGACTT ACCTTCCTCT CCCTGCTGGA CCTGCCCTC ACAATAGCAG  
1201 CCGAGAAGGT GTACAACCCC CGCCATCAGG CTGTGCTAAA GGAGATCCAG GATGCAGTGG  
1261 CGAAGGCAGG GCAGGTGGTG CGTGAGGCCG TAGGAGGCCT GCAGACCGTG AGAAGCTTTG  
**Sali**

1321 GGGCGGAGGA GCAGGAAGTC AGACGCTACA AGGAGGCCCT GGAGCGATGT CGACAGCTGT  
1381 GGTGGCGCCG AGACCTGGAA AAAAGCTTGT ATTTAGTTAT ACAGAGGGTA ATGGCCTTGG  
1441 GCATGCAGGT GCTGATTCTG AACGTCGGTG TGCAGCAGAT CCTGGCTGGG GAGGTCACCC  
1501 GGGGCGGCCT GCTCTCCTTC CTGCTGTATC AGGAGGAAGT GGGGCACCAT GTCCAGAACC  
1561 TGGTATACAT GTATGGGGAT ATGCTGAGCA ACGTGGGTGC TGCGGAAAAG GTTTTTTCTC  
1621 ACTTGGACCG AAGGCCAAAT CTGCCGAATC CTGGGACCCT GGCCCCCTCC AGGCTGGAGG

1681 GGCGCGTGGA ATTTCAAGAT GTCTCCTTCT CGTACCCCAG TCGCCCCGAG AAGCCTGTGC

**TAP2** ◀▶ **TAP1 (C1)**

1741 TCCAGGGCCT GACGTTTACT CTATATCCCG GGAAGGTGAC CGCCTTGGTG GGACCCAATG

1801 GGTCAGGGAA GAGCACCGTG GCCGCCCTGC TGCAGAACCT GTACCAGCCC ACCGGGGGCA

1861 AGGTGCTCCT GGATGGCGAG CCCCTGGTCC AGTATGATCA CCACTACCTG CACACGCAGG

1921 TGGCCGCAGT GGGACAAGAG CCACTGCTAT TTGGAAGAAG TTTTCGGGAA AATATTGCCT

1981 ATGGCCTGAC GCGGACTCCA ACCATGGAGG AAATCACAGC TGTGGCCATG GAGTCCGGAG

2041 CCCACGATTT CATCTCTGGA TTCCCTCAGG GCTATGACAC AGAGGTAGGT GAAACTGGGA

2101 ACCAGCTGTC AGGAGGTCAG CGACAGGCGG TGGCCTTGGC TCGAGCCTTG ATCCGGAAGC

**TAP1 (C1)** ◀▶ **TAP2**

2161 CACGCCTGCT TATCTTGGAC GATGCCACCA GTGCCCTGGA TGCTGAGTGC GAGCAGGCC

2221 TTCAGACCTG GAGATCGCAG GAGGACAGGA CGATGCTGGT CATTGCTCAC CGGCTGCACA

2281 CGGTTCAGAA TGCTGACCAA GTTCTGGTGC TCAAGCAGGG GCAGCTGGTG GAGCACGACC  
ORF - ↓

**Ende**

2341 AGCTCAGGGA TGAGCAGGAT GTCTACGCTC ACTTGGTACA GCAGCGGCTG GAGGCGTGAC

2401 GGGCTTCTGG ACTGCAAGCT GCGCGAGTCC CTCCCCCTGC TGTCTCTGC TCTGTGTGGC

2461 GGAGAACCTG GGAGCAAAGA TTTTACCACA TCCACGGAGA TAGTTGAGGA GCGATGGTGT

2521 TTGTTACATG AGGAAAATGT AACCTCTAGG AGATGCCCGG AATTTACCAC AATGTTTTCC

2581 CGCCCCGCC CCTGTTAGAC GGGGATGGG GGTAGGTACC CCAGGCTAAC ACTGAGCTGC

2641 TGAGTCTCCT GTCTCCCGTG GAGTTTGCAT CACGGCATGC GCCACAAAC CTGGCTTATG

2701 TGGCGTTGGG ACAGAATGAG AAGAAAACGCT CAAAATGTAC AGAGAAGGGG CAAATAGCTT

2761 GCAATTAACC AAAGGCATAG GCTGGCCTAT GGGTGTTCGG CGGTTCTTG ATATTTATAA

**pH8Apr1neo**  
**EcoRI** ▶ **BamHI**

2821 TAAAACCTGGT GTTTTGTAAA AAAAAAAGAA TTCCAGCTTC GAGGGATCCA GACATGATAA

2881 GATACATTGA TGAGTTTGGG CAAACCACAA CTAGAATGCA GTGAAAAAAA TGCTTTATTT

2941 GTGAAATTTG TGATGCTATT GCTTTATTTG TAACCATTAT AAGCTGCAAT AAACAAGTTA

3001 ACAACAACAA TTGCATTCAT TTTATGTTTC AGGTTTCAGG GGAGGTGTGG GAGGTTTTTT

3061 AAAGCAAGTA AAACCTCTAC AAATGTGGTA TGGCTGATTA TGATCCGCT GCCTCGCGC

3121 TTTCCGGTGAT GACGGTGAAA ACCTCTGACA CATGCAG

## TAP2V1:

1 GTGTTTGCCT TTTATGGTAA TAACGCGGCC GGCCCGGGCT TCCTTTGTCC CCAATCTGGG  
61 CGCGCGCCGG CGCCCCCTGG CGGCCTAAGG ACTCGGCGCG CCGGAAGTGG CCAGGGCGGG

121 GCGACTTCG GCTCACAGCG CGCCCGGCTA TTCTCGCAGG ATCAGTCGAC CTGCAGCCCA  
**pH5Apr1neo** | **TAP2**  
← EcoRI →

181 AGCTGGAATT CCGGGCGTCG CTGCGCACCC AGAAGACCCA GTTTGGGAGG AAGCAGATTT  
241 CAGAAGCTCT CCTGAGGTGC CGCTCCGAG CCGCAGACCC CACCATGGCG → **ORF**  
301 CGAGGCCCTG GGCCTCTCTG CTGCTGGTGG ACCTGGCTTT ACTTGGGTTG CTACAAAGCT  
361 CTCTGGGAAC TCTGCTTCCC CCGGGGCTGC CAGGACTATG GCTGGAGGGC ACCCTGCGAC  
421 TTGGAGTGCT GTGGGGACTG CTAAAAGTGG GAGGGCTGCT GAGACTCGTG GGGACCTTTC  
481 TGCCCTTGCT CTGCCTGACT AACCCCTGT TTTTCTCGCT GAGAGCCCTG GTGGGAAGCA  
541 CCATGAGCAC CTCAGTAGTC AGAGTGGCTT CTGCCCTTTG GGGCTGGCTG CTTGCTGACT  
601 ATGGAGCCGT GCGTGTGAGC CTTGCCGTGT GGGCTGTGCT GAGCCCCGCT GGAGCACAGG  
661 AGAAGGAACC AGGCCAGGAG AATAACAGAG CACTCATGAT ACGGTTGCTG AGGCTGTCCA  
721 AGCCGGATCT GCCTTTCCTC ATCGTTGCCT TCATCTTTCT TCGGATGGCT GTGTGGTGGG  
781 AGATGTTTAT CCCTCATTAT TCGGGTCGTG TGATTGACAT CCTGGGAGGT GATTTTGACC  
841 CAGACGCCTT TGCAGCGCC ATCTTTTTCA TGTGCTTATT CTCTGTTGGG AGCTCCCTCT  
901 CTGCAGGCTG CCGAGGAGGC TCCTTCCTCT TTGCCGAGTC CAGGATCAAC CTGCGCATA  
961 GAGAGCAGCT TTTCTCATCT TTGTTGCGCC AAGACCTTGC ATTCTTCCAG GAGACCAAGA  
1021 CAGGGGAGCT GAACTCACGG CTGAGCTCGG ACACCTCCCT GATGAGCCAG TGGCTCTCTT  
1081 TAAATGCCAA TATCCTGCTG CGGAGCCTGG TGAAGGTGGT GGGGCTGTAC TACTTCATGC  
1141 TCCAGGTCTC CCCGAGACTT ACCTTCCTCT CCCTGCTGGA CCTGCCCTC ACAATAGCAG  
1201 CCGAGAAGGT GTACAACCCC CGCCATCAGG CTGTGCTAAA GGAGATCCAG GATGCAGTGG  
1261 CGAAGGCAGG GCAGGTGGTG CGTGAGGCCG TAGGAGGCCT GCAGACCGTG AGAAGCTTTG

1321 GGGCGGAGGA GCAGGAAGTC AGACGCTACA AGGAGGCCCT GGAGCGATGT Sali CGACAGCTGT  
1381 GGTGGCGCCG AGACCTGGAA AAAAGCTTGT ATTTAGTTAT ACAGAGGGTA ATGGCCTTGG  
1441 GCATGCAGGT GCTGATTCTG AACGTCGGTG TGCAGCAGAT CCTGGCTGGG GAGGTCACCC  
1501 GGGGCGGCCT GCTCTCCTTC CTGCTGTATC AGGAGGAAGT GGGGCACCAT GTCCAGAACC  
1561 TGGTATACAT GTATGGGGAT ATGCTGAGCA ACGTGGGTGC TGCGGAAAAG GTTTTTTCTCCT  
1621 ACTTGGACCG AAGGCCAAAT CTGCCGAATC CTGGGACCCT GGCCCCCTCC AGGCTGGAGG

1681 GGC GCGTGGA ATTTCAAGAT GTCTCCTTCT CGTACCCAG TCGCCCCGAG AAGCCTGTGC  
1741 TCCAGGGCCT GACGTTTACC CTGCATCCTG GAAAGGTGAC GGCTTTGGTG GGACCCAATG  
1801 GGTCAGGGAA GAGCACCGTG GCCGCCCTGC TGCAGAACCT GTACCAGCCC ACCGGGGGCC  
1861 AGCTGCTGCT GGATGGCGAG CCCCTGGTCC AGTACGATCA TCACTACCTG CACCGCCAGG  
1921 TGTTTCTGGT GGGGCAGGAG CCTGTGCTGT TCTCCGGTTC TGTCAAGGAC AATATTGCCT  
1981 ATGGCCTGAG GGA CTGTGAG GACGCTCAAG TGATGGCTGC TGCCAGGCG GCCTGTGCAG  
2041 AC GACTTCAT AGGGGAAAATG ACGAATGGAA TAAACACAGA AATCGGGGAG AAAGGGAGCC  
2101 AGTTAGCTGT GGGACAGAAA CAACGTCTGG CCATTGCCCC GGCCCTTGTG CGGAACCCGC  
2161 GGGTCTCAT CCTGGATGAG GCTACCAGTG CCCTGGACGC CGGCAACCAG CTACGGGTCC  
2221 AGCGGCTCCT GTATGAGAGC CCCGAGTGGG CCTCTCGGAC GGTTCCTTCTG ATCACCAGC  
2281 AGCTCAGCCT GGCAGAGCGG GCCACCACA TCCTCTTCCT CAAAGAAGGC TCTGTCTGCG  
2341 AGCAGGGCAC CCACCTGCAG CTCATGGAGA GAGGAGGGTG TTACCGGTCC ATGGTGGAGG  
2401 CTCTTGCGGC TCCTTCAGAC TGACGGGCTT CTGGACTGCA AGCTGCGCGA GTCCCTCCCC  
2461 CTGCTGTCTCT CTGCTCTGTG TGGCGGAGAA CCTGGGAGCA AAGATTTTAC CACATCCACG  
2521 GAGATAGTTG AGGAGCGATG GTGTTTGTTA CATGAGGAAA ATGTAACCTC TAGGAGATGC  
2581 CCGGAATTTA CCACAATGTT TTCCCGCCCC GCCCCTGTT AGACGGGGGA TGGGGGTAGG  
2641 TACCCAGGC TAACACTGAG CTGCTGAGTC TCCTGTCTCC CGTGGAGTTT GCATCACGGC  
2701 ATGCGCCAC AACCTGGCT TATGTGGCGT TGGGACAGAA TGAGAAGAAA CGCTCAAAT  
2761 GTACAGAGAA GGGGCAAATA GCTTGCAATT AACCAAAGGC ATAGGCTGGC CTATGGGTGT  
2821 TCCGCGGGTT CTTGATATTT ATAATAAAAC TGGTGTTTTG TAAAAAAGAA AGAATTCAG  
2881 CTTCGAGGGA TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT TGGACAAACC ACAACTAGAA  
2941 TGCAGTGA AAAATGCTTT ATTTGTGAAA TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTTGTAACCA  
3001 TTATAAGCTG CAATAAACAA GTTAACAACA ACAATTGCAT TCATTTTATG TTT CAGGTTTC  
3061 AGGGGAGGT GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAAACCT CTACAAATGT GGTATGGCTG  
3121 ATTATGATCC GGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA  
3181 G

 **TAP1 (V1)**

 **ORF-Ende**

 **pH8Apr1neo**  
**EcoRI**

**BamHI**

## TAP2ΔV2: Sequenzierung des mutierten Bereiches

```

1 ORF .....▶ .....
1793 CAGAAATCGG GGAGAAAGGN AGCCAGTTAN CTGTGGGACA GAAACAACGT CTGGCCATTG
1854 CCCGGGCCCT TGTGCGGAAC CCGCGGGTCC TCATCCTGGA TGAGGCTACC AGTGCTCTGG
      ↓ORF-Ende
1914 ACGCCTAGTG CGAGCAGGCC CTTCAGACCT GGAGATCGCA GGAGGACAGG ACGATGCTGG
1974 TCATTGCTCA CCGGCTGCAC ACGGTTCAGA ATGCTGACCA AGTTCTGGTG CTCAAGCAGG
2034 GGCAGCTGGT GGAGCACGAC CAGCTCAGGG ATGAGCAGGA TGTCTACGCT CACTTGGTAC
2094 AGCAGCGGCT GGAGGCGTGA GGCCTCCAGA CACTGAGCCC TCTCAGGACT GTGGCCAGGA
2154 TCTGACCCAC AGGGACTGTG CTGGAGGCTA GCGTCAGGAT AAAGATTGGG ACCCTTTGGA
2214 CTTTGTTTAT TTTGGTGGGC TTGGTGGGTG AGGGCCAGGG GATGGGATGG TT.....

```

**T:** In TAP2-WT ist stattdessen ein C. Diese Substitution ist aber ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz. GCT kodiert, wie GCC, auch für Alanin.

**T:** Eingeführte Mutation für einen Stop Codon (**TAG**).

————▶ : zeigt die Startposition des Mutageneseprimers.

Die angegebenen Nukleotidpositionen sind vom ORF ausgehend.

## TAP1ΔV1: Sequenzierung des mutierten Bereiches

```

1 ORF .....▶ .....
1553 GACTTTTACG CTGTATCCCG GGAAGGTGAC CGCCTTGGTG GGACCCAATG GGTCAGGGAA
1614 GAGCACCGTG GCCGCCCTGC TGCAGAACCT GTACCAGCCC ACCGGGGGCA AGGTGCTCCT
1674 GGATGGCGAG CCCCTGGTCC AGTATGATCA CCACTACCTG CACACGCAGG TGGCCGCAGT
1734 GGGACAAGAG CCACTGCTAT TTGGAAGAAG TTTTCGGGAA AATATTGCCT ATGGCCTGAC
1794 GCGGACTCCA ACCATGGAGG AAATCACAGC TGTGGCCATG GAGTCCGGAG CCCACGATTT
1854 CATCTCTGGA TTCCCTCAGG GCTATGACAC AGAGGTAGGT GAAACTGGGA ACCAGCTGTC
1914 AGGAGGTCAG CGACAGGCGG TGGCCTTGGC TCGAGCCTTG ATCCGGAAGC CACGCCTGCT
1974 TATCTTGAC GATGCCACCA GTGCTCTGGA TGCTTGAAAC CAGCTACGGG TCCAGCGGCT
      ↓ORF-Ende
2034 CCTGTATGAG AGCCCCGAGT GGGCCTCTCG GACGGTTCTT CTGATCACCC AGCAGCTCAG
2094 CCTGGCAGAG CGGGCCCACC ACATCCTCTT CCTCAAAGAA GGCTCTGTCT GCGAGCAGGG
2154 CACCCACCTG CAGCTCATGG AGAGAGGAGG GTGTTACCGG TCCATGGTGG AGGCTCTTGC

```

```

2204  GGCTCCTTCA GACTGACGGG CTTCTGGACT GCAAGCTGCG CGAGTCCCTC CCCCTGCTGT
2264  CCTCTGCTCT GTGTGGCGGA GAACCTGGGA GCAAAGATTT TACCACATCC ACGGAGATAG
2324  TTGAGGAGCG ATGGTGTTTG TTACATGAGG AAAATGTAAC CTCTAGGAGA TGCCCGGAAT
2384  TTACCACCAA TGTTTTCCCG CCCC GCCCC TGTTAGACGG GGGATGGGGG AGGTACCCCA
2444  GGCTAACCTT TGAGCTGCTG AGTCTCCTGT CTCCCCGTGG AGTTTGC... ..

```

**T:** In TAP1-WT ist stattdessen ein C. Diese Substitution ist aber ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz. GCT kodiert, wie GCC, auch für Alanin.

**T** und **A:** Eingeführte Mutationen für einen Stop Codon (TGA).

————▶ : zeigt die Startposition des Mutageneseprimers.

Die angegebenen Nukleotidpositionen sind vom ORF ausgehend.

## 1N2SW1: Sequenzierung des mutierten Bereiches

1 ORF .....  
1850 TTGCCCGGGC CCTNGTGCGG AACCCGCGGG TCCTCATCCT GGATGAGGCT ACCAGTGCCC  
1911 TGGACGCCGA GTGCGAGCAG GCCCTTCAGA CCTGGAGATC GCAGGAGGAC AGGACGATGC  
1971 TGGTCNTTAC TCAGCAGCTG CACACGGTTC AGAATGCTGA CCAAGTTCTG GTGCTCAAGC  
2031 AGGGGCAGCT GGTGGAGCAC GACCAGCTCA GGGATGAGCA GGATGT.....

**A, G, A:** Eingeführte Mutationen, die für Threonin (ACT) und Glutamin (CAG und CAG) kodieren. Die WT-Codons sind: GCT für Alanin, CAC für Histidin und CGG für Arginin.

—————▶ : zeigt die Startposition des Mutageneseprimers.

Die angegebenen Nukleotidpositionen sind vom ORF ausgehend.

## 2N1SW2: Sequenzierung des mutierten Bereiches

1 ORF .....  
1893 GGACGATGCC ACCAGTGCCC TGGATGCTGG CAACCAGCTA CGGGTCCAGC GGCTCCTGTA  
1954 TGAGAGCCCC GAGTGGGCCT CTCGGACGGT TCTTCTGATC GCCCACGGC TCAGCCTGGC  
2014 AGAGCGGGCC CACCACATCC TCTTCTCAA AGAAGGCTCT GTCTGCGAGC AGGGCACCCA  
2074 CCTGCAGCTC ATGGAGAGAG GAGGGTGTTA CCGGTCCATG GTGGAGGCTC TTGCGGCTCC  
2134 TTCAGACTGA CGGGCTTCTG GACTGCAAGC TGC GCGAGTC CCTCCCCCTG CTGTCTCTG  
2194 CTCTGTGTGG CGGANAACCT GGGAGCAAAG ATTTTACCAC ATCCACGGAG ATAGTTGAGG  
2254 AGCGATGGTG TTTGTTACAT GAGGAAAATG TANCCTCTAG GAG.....

**G, C** und **G:** Eingeführte Mutationen, die für Alanin (GCC), Histidin (CAC) und Arginin (CGG) kodieren. Die WT-Codons sind: ACC für Threonin, CAG und CAG für Glutamin.

—————▶ : zeigt die Startposition des Mutageneseprimers.

Die angegebenen Nukleotidpositionen sind vom ORF ausgehend.

## **Danksagung**

Ich danke Gott, dass er mir die Kraft und die Geduld gegeben hat, diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

Prof. Dr. Jonathan C. Howard danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für das in mich gesetzte Vertrauen.

Dr. Michael Knittler danke ich für seine Hilfsbereitschaft, die zur erfolgreichen Erstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Dr. Frank Sprenger danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Joe Dramiga möchte ich für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft danken.

I thank Revathy Uthaiyah for her large contribution to the creation of a good atmosphere in the Lab and for the comfortable and interesting discussions.

Sarah Ehses danke ich für die Sequenzierung der Klone für die TAP-Konstrukten 1N2SW1 und 2N1SW2.

Dank gilt auch Dr. Thorsten Klamp für seine Hilfe am Computer, der Rita Lange und der Claudia Poschner für das Bereitstellen des IMDM.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbst angefertigt habe und keine weiteren Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen verwendet habe

Köln 03.04.02