

ROBERT TAMPÉ, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE

## Struktur, Funktion und Zellbiologie der Antigen-Prozessierungsmaschinerie

Das adaptive Immunsystem der Vertebraten hat effiziente Strategien entwickelt, um infizierte sowie bösartig veränderte Zellen zu beseitigen. Proteine werden durch den Proteasomkomplex im Zytosol degradiert. Die Degradationsprodukte werden anschließend vom Antigen-Transportkomplex (TAP) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transloziert, wo sie auf den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) geladen und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die Peptid-MHC-Komplexe werden schließlich von zytotoxischen T-Zellen erkannt, die somit die mit Viren infizierten oder malignen Zellen effizient eliminieren (Abb. 1)

Abbildung 1: Antigen-Prozessierung über MHC Klasse I Moleküle

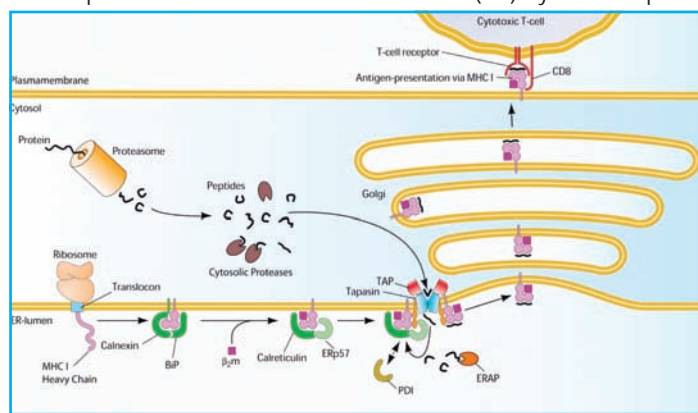


Figure 1: Pathways of Antigen-Processing via MHC Class I Molecules

Der TAP-Komplex ist Teil der makromolekularen Peptidbeladungsmaschinerie (500 – 700 kDa), die sich aus TAP1/2, Tapasin, MHC I und der Hilfsproteine Calreticulin sowie ERp57 zusammensetzt. Tapasin fungiert als entscheidendes Brückenmolekül, um TAP mit MHC I-Komplexen zu verbinden. Weiterhin stabilisiert Tapasin den TAP-Translokationskomplex, hält leere MHC I-Moleküle im ER zurück und kontrolliert die Qualität der MHC I-gebundenen Peptide (Abb. 2). Wir setzen biochemische, immunologische, zell- und strukturelle Techniken und Methoden ein, um die strukturelle und funktionelle Organisation des PLC zu verstehen.

Abbildung 2: Assemblierung des makromolekularen MHC-Peptid-Beladungskomplexes

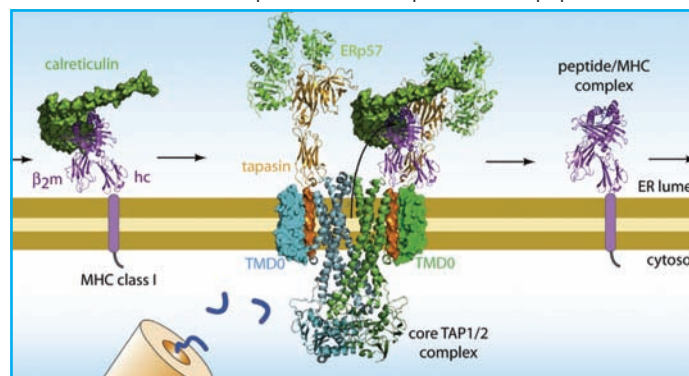


Figure 2: Assembly of the Macromolecular MHC-Peptid Loading Complex

### VIRALE INHIBITOREN DER ANTIGENPROZESSIERUNGSMASCHINERIE

Viren haben vielfältige Mechanismen entwickelt, um unser Immunsystem zu überlisten und so ein Leben lang in dem Wirtsorganismus zu überdauern. Von mehreren Mitgliedern der Herpesvirus-Familie wissen wir, dass sie durch MHC-Klasse-I-Moleküle mit der Antigenpräsentation interferieren. Mehrere nicht verwandte, membranassoziierte virale Proteine – ICP47 des Herpes-Simplex-Virus (HSV), US6 des humanen

ROBERT TAMPÉ, INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY

## Structure, Function and Cell Biology of the Antigen-Processing Machinery

The adaptive immune system has evolved in vertebrates to eliminate invasive pathogens and malignantly transformed cells. Proteins are degraded in the cytoplasm by the proteasome. Subsequently, the peptides are transported from the cytoplasm into the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) by the transporter associated with antigen processing (TAP) where they are loaded on MHC class I molecules. Peptide-MHC complexes leave the ER for presenting the antigenic peptides on the cell surface. Cytotoxic T-cells screen the presented peptides on the cell surface and kill virus infected or transformed cells (Figure 1).

The TAP complex is part of the macromolecular peptide-loading complex (500 – 700 kDa) composed of TAP1/2, tapasin, MHC I and the auxiliary proteins calreticulin and ERp57. Tapasin acts as a bridging molecule linking TAP and MHC I complexes. In addition, tapasin stabilizes the TAP complex, retains peptide free MHC I in the ER, and controls the quality of MHC I bound peptides (Figure 2). We are using molecular biology, immunological, biophysical and structural techniques to investigate the structural and functional organization the PLC in order to understand how that different components orchestrate an optimal peptide loading onto MHC I molecules.

### VIRAL INHIBITORS OF THE ANTIGEN-PROCESSING MACHINERY

Viruses have developed manifold mechanisms to evade the immune response causing lifelong persistence in the host. Several members of the herpes virus family are known to interfere with antigen presentation via major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. By forming an inhibitory complex with TAP, four unrelated, membrane-associated viral proteins, ICP47 of herpes simplex virus (HSV), US6 of



Cytomegalievirus (HCMV), UL49.5 des bovinen Herpes-Virus (BHV) sowie BNLF2a des Epstein-Barr-Virus - haben unterschiedlichste Strategien entwickelt, um die Peptidtranslokation in das ER zu verhindern, indem sie mit TAP einen inhibitorischen Komplex bilden (Abb. 3).

So bindet ICP47 mit hoher Affinität speziesspezifisch an zytosolische Bereiche des humanen TAP-Komplexes und verhindert so die Peptidbindung an den Transporter. Die aktive Domäne, die funktionalen Aminosäurenreste und die NMR-Struktur von ICP47 wurden identifiziert. Im Gegensatz zu ICP47 bindet das Membranglykoprotein US6 mit seiner ER-luminalen Domäne an den TAP-Komplex und stabilisiert so eine TAP-Konformation, die eine ATP-Bindung an der zytosomatischen Seite von TAP verhindert. Zusätzlich zu einer Arretierung des TAP-Komplexes in einer Translokation inkompetenten Konformation, induziert UL49 eine proteasomale Degradation des Peptidbeladungskomplexes. BNLF2a bindet an TAP und blockiert sowohl Peptid- als auch ATP-Bindung an TAP.

Wir zielen auf die Identifizierung von neuen viralen Faktoren, die den intrazellulären Transport von antigenen Peptiden blockieren. Detailliertes Wissen über inhibitorische Komplexe und Netzwerke der Antigenprozessierungsmaschinerie wird die Entwicklung effizienter Immunsuppressiva und antiviraler Arzneimitteln inklusive neuer Impfstrategien stimulieren.

Wir zielen auf die Identifizierung von neuen viralen Faktoren, die den intrazellulären Transport von antigenen Peptiden blockieren. Detailliertes Wissen über inhibitorische Komplexe und Netzwerke der Antigenprozessierungsmaschinerie wird die Entwicklung effizienter Immunsuppressiva und antiviraler Arzneimitteln inklusive neuer Impfstrategien stimulieren.

Abbildung 3: Virale Modulatoren der Antigen-Translokationsmaschinerie TAP

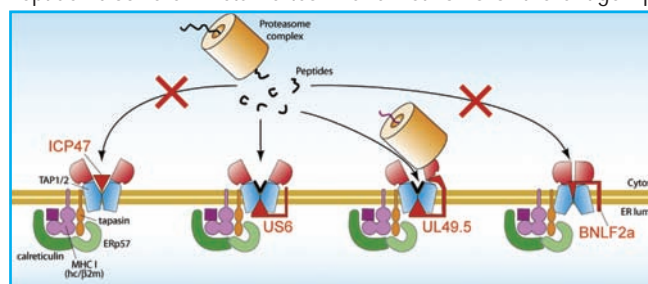


Figure 3: Viral Modulators of the Antigen Translocation Machinery TAP

## ASSEMBLIERUNG UND REGULIERUNGSKONTROLLE MAKROMOLEKULARER RNA-PROTEINKOMPLEXE

Das *Twin ATP-binding cassette* (ABC)-Protein ABCE1 (RNase-L Inhibitor 1, HP68) ist eines der am höchsten konservierten Proteine in der Evolution und findet sich in allen Organismen außer Bakterien. Dieses Protein spielt eine Schlüsselrolle in der Assemblierung großer RNA-Proteinkomplexe, essenziell bei der Regulierung der Proteintranslation sowie die HIV-1-Kapsid (RNA-gag) Assemblierung. Ein Funktionsverlust von ABCE1 führt zu Fehlern in der Assemblierung des Pre-Initiationskomplexes und der Prozessierung ribosomaler RNA. Mit Hilfe von biochemischen, biophysischen und zellbiologischen Ansätzen wollen wir die molekulare Funktion von ABCE1 in diesen essentiellen Zellprozessen aufklären.

Abbildung 4: Struktur und Funktion von ABCE1 in der Assemblierung von RNPs und Translationskontrolle. Die Kristallstruktur von ABCE1 von *Sulfolobus solfataricus* wurde kürzlich in ADP-gebundenem Zustand mit 2.0 Å aufgeklärt (Barthelme et al., in prep.). Polysomprofile und *in vitro* Bindungsassays zeigen eine Wechselwirkung von ABCE1 im ATP-gebundenen Zustand mit ribosomalen Untereinheiten und rRNA.

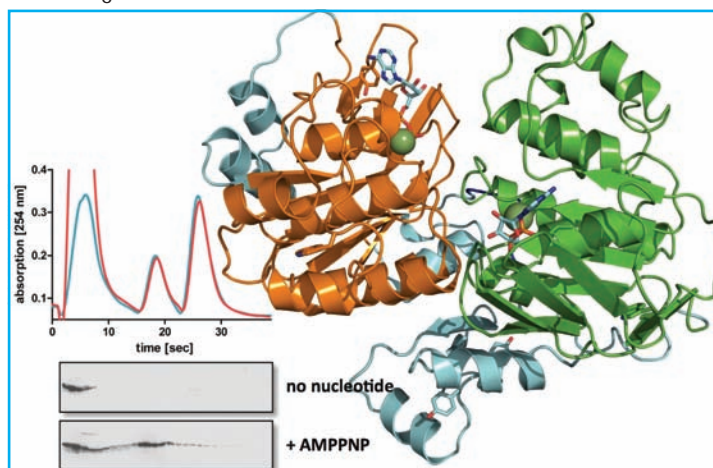


Figure 4: Structure and function of ABCE1 in RNP assembly and translation regulation. The X-ray structure of ABCE1 was determined in the ADP-bound state at 2.0 Å resolution (Barthelme et al., in prep). The interaction with rRNA and ribosomal subunits is dependent of the ATP-hydrolysis cycle of ABCE1. Polysome profiles and *in vitro* binding assays of ABCE1 reveal a tight interaction of ABCE1 with ribosomal subunits and rRNA in its ATP-bound state.

human cytomegalovirus (HCMV), UL49.5 of bovine herpes virus (BHV), and BNLF2a of Epstein-Barr virus have selected different strategies to block the peptide translocation into the endoplasmic reticulum (ER).

ICP47 binds with high affinity specifically to cytosolic residues of human TAP and prevents peptide binding to the transporter. The active region, functional residues, and the NMR structure of ICP47 have been identified. In contrast to ICP47, the type I membrane glycoprotein US6 binds with its ER-luminal domain to the TAP complex arresting a conformation that inhibits ATP-binding at the cytoplasmic side of TAP. Apart from arresting the TAP complex in a translocation-incompetent state, UL49 induces proteasomal degradation of the peptide-loading complex. BNLF2a binds to TAP and blocks both peptide and ATP binding to TAP.

We aim to identify new viral factors blocking the intracellular transport of antigenic peptides. Detailed knowledge about inhibitory assemblies and networks of the antigen processing machinery will stimulate the development of potent immune suppressors and antiviral drugs including novel vaccination strategies restoring immune response against infected cells.

We aim to identify new viral factors blocking the intracellular transport of antigenic peptides. Detailed knowledge about inhibitory assemblies and networks of the antigen processing machinery will stimulate the development of potent immune suppressors and antiviral drugs including novel vaccination strategies restoring immune response against infected cells.

## ASSEMBLY AND REGULATORY CONTROL OF MACROMOLECULAR RNA-PROTEIN COMPLEXES

The *twin ATP-binding cassette* (ABC) protein ABCE1 (RNase-L inhibitor, HP68) is one of the most conserved proteins in evolution and found in all organisms, except bacteria. The protein emerges as a key player in the assembly of large RNA-protein complexes essential for translational regulation and HIV-1 capsid (RNA-gag) maturation. ABCE1 depletion causes defects in assembly of the pre-initiation complex and processing of ribosomal RNA. However, the molecular function of ABCE1 and RNA-ABCE1 interaction in these key cellular processes remains to be discovered and will be addressed by a combination of biochemical, biophysical and cell biological approaches.

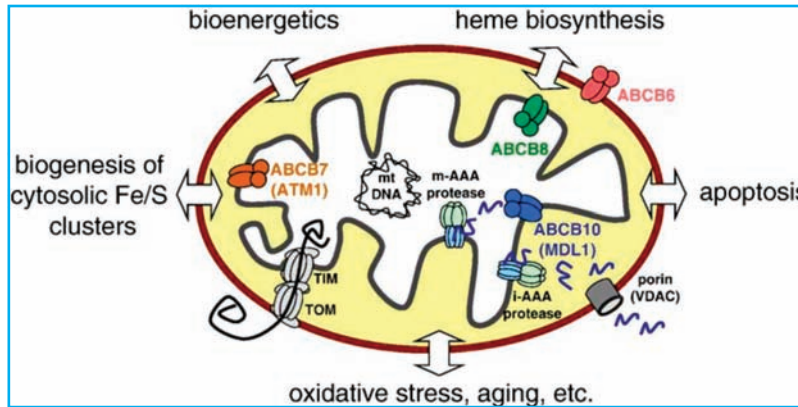




**FUNKTION MITOCHONDRIALER ABC-PROTEINE**

ABC-Transporter stellen eine der größten Membranproteinfamilien dar, die in allen drei Lebensreichen zu finden sind. Mitochondrien umfassen bis zu vier ABC-Systeme: ABCB7/ATM1, ABCB10/MDL1, ABCB8 und ABCB6. Diese so genannten Halbtransporter, die jeweils Homodimere bilden, sind an einer Reihe von wichtigen Zellprozessen, z. B. Biogenese von zytosolischen Eisen-Schwefel-Komplexen, Hämbiosynthese, Eisenhomöostase, Multidrug-Resistenz und Schutz gegen oxidativen Stress, beteiligt (Abb. 5). Wir zielen darauf zu verstehen, wie diese ABC-Systeme in der inneren und äußeren mitochondrialen Membran ihre Funktionen in wichtigen (patho-)physiologischen Prozessen wie neurodegenerativen und hämatologischen Krankheiten erfüllen.

Abbildung 5: Funktionen des mitochondrialen ABC-Proteine.



**FUNCTION OF THE MITOCHONDRIAL ABC PROTEINS**

ABC transporters represent one of the largest families of membrane proteins that are found in all three phyla of life. Mitochondria comprise up to four ABC systems, ABCB7/ATM1, ABCB10/MDL1, ABCB8 and ABCB6. These half-transporters, which assemble into homodimeric complexes, are involved in a number of key cellular processes, e.g. biogenesis of cytosolic iron-sulfur clusters, heme biosynthesis, iron homeostasis, multidrug resistance, and protection against oxidative stress (Figure 5).

We are aiming at understanding how these ABC systems in the inner and outer mitochondrial membrane fulfill their functions in important (patho) physiological processes, including neurodegenerative and hematological disorders.

Figure 5: Functions of mitochondrial ABC proteins.

**NANOBIOTECHNOLOGIE, CHEMISCHE UND SYNTHETISCHE BIOLOGIE**

Biologische Systeme organisieren sich spontan von kleinen chemischen Einheiten zu komplexen supramolekularen Strukturen mit neuen Eigenschaften. Dieses Grundprinzip findet Anwendung beim Assemblieren von Bio/Chem Hybridstrukturen, die auf multivalenten Wechselwirkungen zwischen Metallchelatorverbindungen und Histidinmarkierten Proteinen beruhen. Die Stabilität, Spezifität und Reversibilität dieser Interaktionen erlauben es, Proteine an biokompatiblen Grenzflächen orientiert zu immobilisieren. Die immobilisierten Proteine können in Echtzeit durch verschiedene Techniken wie Oberflächen-Plasmonenresonanz (SPR), Interne Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie (TIRFM) verfolgt werden. Darüber hinaus wir haben die native Protein-Nanolithographie (NPNL) für die nanostrukturierte in situ Assemblierung empfindlicher Proteine oder Multiproteinkomplexe unter nativen Bedingungen eingeführt. Proteine werden dank eines neuen AFM-Kontakoszillationsmodus (contact oscillation mode) durch andere Proteine ausgetauscht (Abb. 6, links); durch die Nanolithographie ist ein schnelles und vielseitiges Schreiben, Lesen und Löschen der Proteinarrays möglich. Funktionelle Proteinkomplexe lassen sich bei gleichmäßiger Orientierung zu Dimensionen von bis zu 50 nm assemblieren. Die zweidimensionale Organisation von Nanoobjekten mit biologischer Aktivität stellt eine leistungsstarke Methode für das proteomweite Interaktionsscreening dar.

Die chemische Biologie zielt auf eine perfekte Kontrolle der zellulären Prozesse in Zeit und Raum durch ortsspezifische Markierung, Kontrolle und strukturierte Organisation von Proteinkomplexen. Wir entwickeln multivalente Metallchelatorverbindungen, deren Affinität für Histidinmarkierte Proteine von nahezu null bis nanomolar durch Belichtung ausgelöst wird. Die Multiplexorganisation der Proteinkomplexe gelingt durch ein iteratives Schreiben eines Bindungsprozesses mittels *in situ*

**NANOBIOTECHNOLOGIE, CHEMICAL AND SYNTHETIC BIOLOGY**

Biological systems organize spontaneously from small chemical building blocks to complex supramolecular structures with novel properties. This basic principle is applied for the assembling of bio/chem hybrid structures based on multivalent interactions between metal-chelating organic compounds and His-tagged proteins. Due to the stability, specificity and reversibility of these interactions, it is possible to immobilize proteins on a biocompatible interface in an oriented manner. These immobilized proteins are accessible to real-time analysis by various techniques such as surface plasmon resonance (SPR), total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). We introduced native protein nanolithography (NPNL) for the nanostructured *in situ* assembly of fragile proteins or multi-protein complexes under native conditions. Immobilized proteins are detached by a novel vibrational AFM mode (contact oscillation mode) and replaced by other proteins, which are selectively self-assembled from the bulk (Figure 6, left). This nanolithography permits rapid writing, reading and erasing of protein arrays in a versatile manner. Functional protein complexes may be assembled with uniform orientation at dimensions down to 50 nm. Such fabrication of two-dimensionally arranged nano-objects with biological activity will prove powerful for proteome-wide interaction screens and single molecule/virus/cell analyses.

Chemical biology aims for a perfect control of cellular processes in time and space by site-specific labeling, manipulation, and structured organization of protein complexes. We aim at developing multivalent chelator heads (MCH), whose affinity for tagged proteins is triggered from almost none to nanomolar by exposure to light. Multiplexed organization of protein complexes is realized by an iterative writing of a binding process using *in situ* laser lithography (Figure 6). These photoactivatable key-lock pairs should allow for a spatiotemporal control of



Laserlithographie (Abb. 6, rechts). Diese photoaktivierbaren Verbindungen sollen eine spatiotemporale Kontrolle der Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie eine lichtinduzierte Clusterbindung von Rezeptoren erlauben.

protein-protein interactions and cellular processes by light-triggered receptor clustering.

Abbildung 6: *In situ* Organisation von Proteinkomplexen mittels AFM (links) und Licht (rechts).

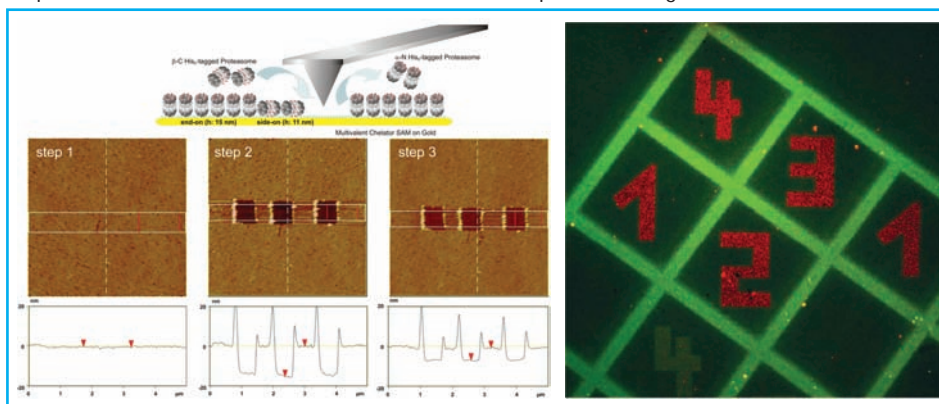


Figure 6: *In situ* organization of protein complexes by AFM (left) and by light (right).

## LITERATUR / REFERENCES

- [1] Abele, R. & Tampé, R. (2009) Peptide trafficking and translocation across membranes in cellular signaling and self-defense strategies. *Curr. Opin. Cell Biol.*, in press. IF 13.444
- [2] Oancea, G., O'Mara, M., Bennett, D., Tieleman, D.P., Abele, R. & Tampé, R. (2009) Structural arrangement of the transmission interface in the ABC transporter TAP critical in antigen binding and translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5551-5556. IF 9.598
- [3] Burgdorf, S., Schölz, C., Kautz, A., Tampé, R. & Kurts, C. (2008) Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nature Immunol.* 9, 558-566. IF 27.011
- [4] Loch, S., Klauschies, F., Schölz, C., Verweij, M.C., Wiertz, E.J.H.J., Koch, J. & Tampé, R. (2008) Signaling of a varicelloviral factor across the ER membrane induces destruction of the peptide-loading complex and immune evasion. *J. Biol. Chem.* 283, 13428-13436. IF 5.581
- [5] Hofacker, M., Gompf, S., Zutz, A., Presenti, C., Haase, W., van der Does, C., Model, K. & Tampé, R. (2007) Structural and functional fingerprint of the mitochondrial ABC transporter MDL1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 282, 33951-61. IF 5.581
- [6] Herget, M., Oancea, G., Schrod, S., Karas, M., Tampé, R. & Abele, R. (2007) Mechanism of substrate sensing and signal transmission within an ABC transporter – Use of a Trojan-horse strategy TAP. *J. Biol. Chem.*, 282, 3871-3880. IF 5.581
- [7] Tinazli, A., Piehler, J., Beuttler, M., Guckenberger, R. & Tampé, R. (2007) Native protein nanolithography that can write, read and erase. *Nature Nanotech.* 2, 220-225. IF 14.917
- [8] Barthelme, D., Scheele, U., Dinkelaker, S., Janoschka, A., MacMillan, F., Albers, S.-V., Driessen, A.J.M., Salamone-Stagni, M., Bill, E., Meyer-Klaucke, W., Schünemann, V., & Tampé, R. (2007) Structural organization of essential iron-sulfur clusters in the evolutionarily highly conserved ATP-binding cassette protein ABCE1. *J. Biol. Chem.* 282, 14598-14607. IF 5.581

## KONTAKT / CONTACT:

Prof. Dr. Robert Tampé

Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
 Institut für Biochemie  
 Max-von-Laue-Str. 9  
 D-60438 Frankfurt am Main

Tel: ++49 (0)69 798 29475  
 Fax: ++49 (0)69 798 29495  
 E-Mail: tampe@em.uni-frankfurt.de  
<http://www.biochem.uni-frankfurt.de>

