

**Molekulare Mechanismen der Immunmodulation durch den  
Zytomegalievirus-kodierten Chemokinrezeptor US28**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

Eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Thilo Mokros  
Berlin 2003

Max-Delbrück-Centrum  
für Molekulare Medizin  
Berlin-Buch



1. Gutachter: Dr. habil. Martin Lipp

2. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann

Datum der Abgabe: 26.08.2003

Datum der Disputation: 29.01.2004



*Das Wissen im Sinne der Naturwissenschaften ist Vermutungswissen; es ist ein kühnes Raten ..., das durch rationale Kritik diszipliniert wird. Das macht den Kampf gegen das dogmatische Denken zur Pflicht und es macht auch die äußerste intellektuelle Bescheidenheit zur Pflicht.*

(KARL RAIMUND POPPER)



# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abkürzungen</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>5</b>  |
| 1.1 Das humane Zytomegalievirus.....                                       | 5         |
| 1.2 Chemokine und ihre Rezeptoren.....                                     | 6         |
| 1.3 G-Protein gekoppelte Signalübertragung.....                            | 10        |
| 1.3.1 Die Struktur G-Protein gekoppelter Rezeptoren.....                   | 10        |
| 1.3.2 Aktivierung heterotrimerer G-Proteine.....                           | 12        |
| 1.3.3 Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Chemokinrezeptoren .... | 14        |
| 1.3.4 Regulation der GPCR-Aktivität.....                                   | 15        |
| 1.4 Der HCMV-kodierte $\beta$ -Chemokinrezeptor US28.....                  | 18        |
| 1.5 Fragestellung der Arbeit .....   | 19        |
| <b>2. Material</b>   | <b>21</b> |
| 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....                             | 21        |
| 2.2 Bakterien .....  | 23        |
| 2.3 Plasmide und Cosmide.....  | 23        |
| 2.4 Zellen .....   | 25        |
| 2.5 Oligonukleotide.....   | 25        |
| 2.6 Enzyme.....  | 26        |
| 2.7 Antikörper und Streptavidin-Konjugate .....                            | 26        |
| 2.8 Geräte und sonstige Materialien .....                                  | 27        |
| 2.9 Medien .....   | 28        |
| 2.10 Puffer und Lösungen.....  | 29        |
| <b>3. Methoden</b>   | <b>35</b> |
| 3.1 Nukleinsäure-Techniken .....   | 35        |
| 3.1.1 DNA-Amplifikation mit Hilfe der PCR.....                             | 35        |
| 3.1.2 Agarosegelelektrophorese von DNA.....                                | 36        |
| 3.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....                  | 36        |
| 3.1.4 Reinigung von DNA aus wässrigen Lösungen.....                        | 36        |
| 3.1.5 Enzymatische Spaltung von DNA .....                                  | 37        |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.1.6  | Abspaltung von 5'-Phosphatresten durch alkalische Phosphatase .....   | 37 |
| 3.1.7  | Ligation von DNA-Fragmenten .....   | 37 |
| 3.2    | Klonierung von DNA .....  | 38 |
| 3.2.1  | Bereitstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien.....   | 38 |
| 3.2.2  | Transformation .....  | 38 |
| 3.3    | Isolierung von Plasmid-DNA .....  | 38 |
| 3.4    | DNA-Sequenzierung .....   | 39 |
| 3.5    | Einführung von Mutationen in DNA mittels PCR .....  | 40 |
| 3.6    | Herstellung rekombinanter Fusionsproteine .....   | 41 |
| 3.6.1  | Klonierung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen.....   | 41 |
| 3.6.2  | Induktion der Proteinexpression .....   | 42 |
| 3.6.3  | Bakterienaufschluß.....   | 42 |
| 3.6.4  | Proteinreinigung durch Glutathion-Affinitätschromatographie.....  | 42 |
| 3.7    | <i>In vitro</i> Transkription und Translation .....   | 43 |
| 3.7.1  | <i>In vitro</i> Transkription .....   | 43 |
| 3.7.2  | <i>In vitro</i> Translation.....  | 44 |
| 3.8    | Zellkultur .....  | 44 |
| 3.9    | Transfektion von Säugetierzellen mit der Calciumphosphat-Methode.....   | 45 |
| 3.10   | Infektion humaner embryonaler Lungenfibroblasten mit HCMV.....  | 45 |
| 3.11   | Herstellung monoklonaler Antikörper.....  | 46 |
| 3.11.1 | Immunisierung von Mäusen.....   | 46 |
| 3.11.2 | Gewinnung von Maus-Peritonealmakrophagen.....   | 46 |
| 3.11.3 | Fusion von Milzzellen mit Myelomzellen .....  | 46 |
| 3.11.4 | Selektion und Klonierung von Hybridomzellen .....   | 47 |
| 3.11.5 | Enzymgekoppelter Immuntest (ELISA) zum Nachweis spezifischer<br>Antikörper .....                                    | 48 |
| 3.11.6 | Enzymgekoppelter Immuntest zur Bestimmung der Immunglobulin-<br>Klasse .....  | 49 |
| 3.11.7 | Antikörperreinigung durch Protein A-Affinitätschromatographie.....  | 49 |
| 3.11.8 | Kovalente Kopplung von Biotin an Antikörper .....   | 50 |
| 3.12   | Metabolische Zellmarkierung mit Radioisotopen .....   | 50 |
| 3.12.1 | Metabolische Zellmarkierung mit [ <sup>35</sup> S]L-Methionin/-Cystein .....  | 50 |
| 3.12.2 | Metabolisches Pulsmarkieren mit [ <sup>35</sup> S]L-Methionin/-Cystein ( <i>Pulse-<br/>Chase</i> -Experimente)..... | 51 |
| 3.12.3 | Metabolische Zellmarkierung mit [ <sup>35</sup> S]Natriumsulfat .....   | 51 |
| 3.12.4 | Metabolisches Markieren von Zellen mit [ <sup>32</sup> P]Orthophosphat.....   | 51 |
| 3.13   | Zellextraktion mit Detergenz.....   | 52 |
| 3.14   | Immunpräzipitation .....  | 52 |



|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.15      | Quantifizierung des biosynthetischen Einbaus radioaktivmarkierter Aminosäuren .....      | 53        |
| 3.16      | Untersuchung der Proteinglykosylierung .....   | 54        |
| 3.16.1    | Inhibition der <i>N</i> -Glykosylierung mit Tunicamycin .....                            | 54        |
| 3.16.2    | Enzymatische Hydrolyse von <i>N</i> -Glykosylierungen mit Endoglykosidase H .....        | 54        |
| 3.16.3    | Inhibition der <i>O</i> -Glykosylierung durch BADG .....                                 | 55        |
| 3.17      | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....                                     | 55        |
| 3.17.1    | Autoradiographie .....   | 56        |
| 3.18      | Immunblots .....   | 57        |
| 3.18.1    | Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF- und Nitrocellulosemembranen (Western-Blot) ..... | 57        |
| 3.18.2    | Immunfärbung von Chemokinrezeptoren in Western-Blots .....                               | 57        |
| 3.18.3    | Immunfärbung von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) in Western-Blots .....        | 57        |
| 3.18.4    | Chemilumineszenz-Nachweis .....  | 58        |
| 3.19      | Quantitative Analyse von Proteinbanden in Polyacrylamidgelen .....                       | 58        |
| 3.20      | Bestimmung phosphorylierter Aminosäuren .....  | 59        |
| 3.20.1    | Proteinhydrolyse .....   | 59        |
| 3.20.2    | Zweidimensionale Dünnschicht-Elektrophorese .....  | 60        |
| 3.21      | Durchflußzytometrie (FACS-Analysen) .....  | 60        |
| 3.21.1    | Fixierung und Digitonin-Permeabilisierung .....  | 61        |
| 3.21.2    | Immunfluoreszenzfärbung und Durchflußzytometrie .....                                    | 61        |
| 3.22      | Immunzytochemie und Immunfluoreszenzmikroskopie .....                                    | 62        |
| 3.23      | Bestimmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Luziferase-Assay) .....                       | 63        |
| 3.24      | Internalisierung von [ $^{125}$ I]-markiertem RANTES .....                               | 63        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse</b> .....  | <b>65</b> |
| 4.1       | Herstellung monoklonaler Antikörper spezifisch für US28 .....                            | 65        |
| 4.1.1     | Herstellung rekombinanter Fusionsproteine .....  | 65        |
| 4.1.2     | Zellfusion und Klonierung von Hybridomzellen .....                                       | 66        |
| 4.2       | Charakterisierung US28-spezifischer monoklonaler Antikörper .....                        | 67        |
| 4.2.1     | Immunpräzipitation von <i>in vitro</i> translatiertem US28 .....                         | 68        |
| 4.2.2     | Nachweis von US28 in Immunblots transfizierter HEK293A Zellen ...                        | 69        |
| 4.2.3     | Immunpräzipitation von US28 aus Lysaten transfizierter HEK293A Zellen .....              | 70        |
| 4.2.4     | Expressionskinetik von US28 in HCMV infizierten Fibroblasten .....                       | 71        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 4.2.5     | Durchflußzytometrie und Immunzytochemie der US28-Expression in HEK293A Zellen.....              | 72         |
| 4.3       | Zelluläre Lokalisation des HCMV-kodierten Chemokinrezeptors US28 .....                          | 74         |
| 4.3.1     | US28 wird überwiegend intrazellulär exprimiert.....   | 75         |
| 4.3.2     | Subzelluläre Lokalisation von US28.....   | 76         |
| 4.4       | Posttranslationale Modifikationen des US28-Rezeptors .....                                      | 77         |
| 4.4.1     | Untersuchung der Glykosylierung von US28 .....  | 77         |
| 4.4.2     | Untersuchung der Tyrosin-Sulfatierung von US28.....   | 81         |
| 4.5       | Phosphorylierung des US28-Rezeptors.....  | 82         |
| 4.5.1     | US28 besitzt ein hohes basales Phosphorylierungsniveau.....                                     | 82         |
| 4.5.2     | Fractalkine hemmt die basale US28-Phosphorylierung .....  | 83         |
| 4.5.3     | Modulation der basalen US28-Phosphorylierung durch sekundäre Botenstoff-abhängige Kinasen ..... | 84         |
| 4.5.4     | Überexpression von GRK2 verstärkt die US28-Phosphorylierung .....                               | 86         |
| 4.5.5     | Bestimmung der phosphorylierten Aminosäuren.....  | 87         |
| 4.5.6     | Identifizierung der US28-Phosphorylierungsstellen.....  | 88         |
| 4.6       | Bedeutung der US28-Phosphorylierung für die Signalleitung.....                                  | 90         |
| 4.6.1     | NF- $\kappa$ B wird unabhängig von der US28-Phosphorylierung aktiviert ....                     | 90         |
| 4.6.2     | US28 vermittelt die Aktivierung von ERK1, ERK2 und der p38-MAPK .....                           | 91         |
| 4.6.3     | Unterschiedliche Mechanismen der ERK-Aktivierung durch US28 und US28 <sup>ST/A</sup> .....      | 93         |
| 4.7       | Die konstitutive US28-Phosphorylierung reguliert die Zelloberflächenexpression .....            | 94         |
| 4.8       | Biologische Halbwertszeit von US28 und US28-Varianten .....                                     | 97         |
| 4.9       | Die RANTES-Internalisierung wird durch die US28-Phosphorylierung reguliert.....                 | 99         |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>101</b> |
| 5.1       | US28-Phosphorylierung .....   | 101        |
| 5.2       | US28 phosphorylierende Kinasen .....  | 104        |
| 5.3       | Zelluläre Lokalisation und Transportwege des US28-Rezeptors.....                                | 107        |
| 5.3.1     | Die zelluläre Verteilung des US28-Rezeptors .....   | 108        |
| 5.3.2     | Die Internalisierung des US28-Rezeptors.....  | 109        |
| 5.3.3     | Der anterograde Rezeptortransport .....   | 113        |
| 5.4       | Die Signalleitung des US28-Rezeptors .....  | 115        |
| 5.5       | Die Rolle des US28-Rezeptors während einer HCMV-Infektion .....                                 | 118        |

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| <b>6. Zusammenfassung</b>        | 123 |
| <b>Summary</b>                   | 125 |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b>   | 127 |
| <b>Danksagung</b>                |     |
| <b>Erklärung und Publikation</b> |     |

