

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung monoklonaler Antikörper spezifisch für US28

Bislang war es nicht möglich die Proteinexpression des vom humanen Zytomegalievirus (HCMV) kodierten Chemokinrezeptors US28 direkt nachzuweisen. Daher wurden für die transiente Expression in Zelllinien häufig US28-Fusionsproteine eingesetzt, die über ihren Fusionsanteil nachweisbar waren. Die Eigenschaften eines Fusionsproteins können jedoch von denen des Rezeptors in seiner nativen Form erheblich abweichen. Um insbesondere die molekularen Merkmale des US28-Rezeptors in seiner nativen Form und ihre Bedeutung für die biologischen Funktionen von US28 untersuchen zu können, wurden US28-spezifische monoklonale Antikörper hergestellt.

4.1.1 Herstellung rekombinanter Fusionsproteine

Um monoklonale Antikörper gegen den humanen Zytomegalievirus kodierten Chemokinrezeptor US28 zu generieren, wurde ein Glutathion-S-Transferase(GST)-Fusionsprotein hergestellt. Das Fusionsprotein GST-US28¹⁻⁵¹ umfasste außer dem GST-Anteil 51 Aminosäuren des US28 N-Terminus (AS 1-51). Die mit Hilfe einer PCR amplifizierte N-terminale US28 Sequenz (Bp 1-153) wurde über die *Bam*H I und *Eco*R I Restriktionsschnittstellen in den pGEX-4T1-Vektor kloniert (Kap. 3.6). Der GST-Anteil des Fusionsproteins ist durch die Vektorsequenz kodiert und liegt N-terminal des inklonierten US28-Anteils. Daher wurde in einer Sequenzierung (Kap. 3.4) neben der korrekten Basensequenz auch der Erhalt des Leserahmens zwischen GST- und US28-Anteil kontrolliert. Die Fusionsproteine wurden dann in dem *E. coli*-Stamm DH5 α exprimiert und anschließend aufgereinigt (Kap. 3.6). Wie in Abb. 4.1 zu sehen ist, besitzt das aufgereinigte GST-US28¹⁻⁵¹-Fusionsprotein ein Molekulargewicht von etwa 32 kDa, was mit dem rechnerisch ermittelten Wert aus dem GST-Anteil (26 kDa) und den US28 Aminosäuren 1-51 übereinstimmt.

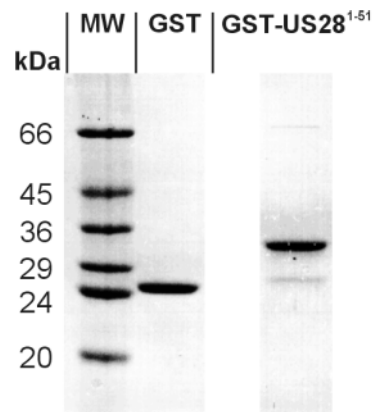


Abb. 4.1 Coomassie-Färbung der aufgereinigten GST-US28¹⁻⁵¹-Fusionsproteine. Die DNA-Sequenz der aminoterminalen Aminosäuren 1-51 des US28-Rezeptors wurde in den Vektor pGEX-4T1 kloniert. Das rekombinante Fusionsprotein GST-US28¹⁻⁵¹ wurde in dem *E. coli* Stamm DH5 α exprimiert, die Bakterien mit einer French-Press aufgeschlossen und das Fusionsprotein über eine Glutathion-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das aufgereinigte GST-US28¹⁻⁵¹ wurde in einer SDS-PAGE analysiert. Als Kontrolle diente aufgereinigtes GST-Protein ohne US28-Anteil.

4.1.2 Zellfusion und Klonierung von Hybridomzellen

Es wurden C57BL/6 Mäuse wie im Methodenteil beschrieben mit dem GST-US28¹⁻⁵¹-Fusionsprotein immunisiert. Die Verwendung eines rekombinanten GST-Fusionsproteins für die Herstellung monoklonaler Antikörper bot den Vorteil es in ausreichenden Mengen für die Immunisierung herstellen zu können. Außerdem konnte das GST-US28¹⁻⁵¹-Fusionsprotein auch als spezifischer Bindungspartner für die Antikörper in einem ELISA-Verfahren eingesetzt werden. Hierzu wurde das GST-US28¹⁻⁵¹-Fusionsprotein am Boden der ELISA-Platte gebunden, als Negativkontrolle diente das GST-Protein. Nach der Immunisierung konnten die Milzzellen der Mäuse für die Fusion mit Myelomzellen (X63-Ag8.653) eingesetzt werden. Die fusionierten Zellen wurden auf 10 Fusionsplatten mit je 24 Löchern verteilt. 10-14 Tage danach waren am Boden der Fusionsplatten makroskopisch Hybridomzellklone zu erkennen. Von den Löchern, in denen Klone gewachsen waren, wurde Kulturüberstand abgenommen und in einem differentiellen ELISA (Kap. 3.11.5) auf die Anwesenheit US28¹⁻⁵¹-spezifischer Antikörper untersucht. Nach diesem Testverfahren wurden in 18 der 240 Löcher spezifische Antikörper nachgewiesen. Die Hybridomzellen dieser 18 Löcher wurden nun zweimal in aufeinanderfolgenden Schritten vereinzelt (Klonierung und Subklonierung), um die Isolierung

Hybridomname	Antikörpername	Immunglobulin Isotyp (schwere Kette/leichte Kette)
106-F12-G2	Tub-6	IgG2b/κ
142-D2-H4	Tub-42	IgG2b/κ
145-E11-D5	Tub-45	IgG2a/κ
163-D10-C5	Tub-63	IgG2b/κ

Tab. 4.1 Hybridomzellklone und von ihnen sezernierte monoklonale Antikörper gegen das GST-US28¹⁻⁵¹-Fusionsprotein.

eines einzelnen Zellklones zu gewährleisten. Im Verlauf der Klonierung stellten einige Zellklone ihre Antikörperproduktion ein oder verloren ihre Spezifität für den US28-Anteil des Fusionsproteins. Schließlich konnten die vier stabilen Hybridomzelllinien 106-F12-G2, 142-D2-H4, 145-E11-D5 und 163-D10-C5 kloniert werden. Die von ihnen gebildeten monoklonalen Antikörper gegen das rekombinante GST-US28¹⁻⁵¹-Fusionsprotein erhielten die Bezeichnungen Tub-6, Tub-42, Tub-45 und Tub-63 (Tab. 4.1). In den folgenden Abschnitten werden die Eigenschaften der monoklonalen Antikörper charakterisiert.

4.2 Charakterisierung US28-spezifischer monoklonaler Antikörper

Um zu überprüfen, welche der vier monoklonalen Antikörper (mAk) mit dem „natürlichen“ US28-Protein reagieren, wurden die Antikörper zum Nachweis von US28 in transient überexprimierenden Zelllinien und in HCMV infizierten Primärzellen getestet. Mit einem ELISA (Kap. 3.11.6) konnten die Immunglobulin-Klassen und Subklassen (Isotyp) der Antikörper bestimmt werden (Tab. 4.1). Dadurch war es möglich die verwendeten Reagenzien, wie fluoreszenzmarkierte, sekundäre Antikörper oder Affinitätsliganden für die Immunpräzipitation und Antikörperaufreinigung auf die einzelnen Antikörper abzustimmen.

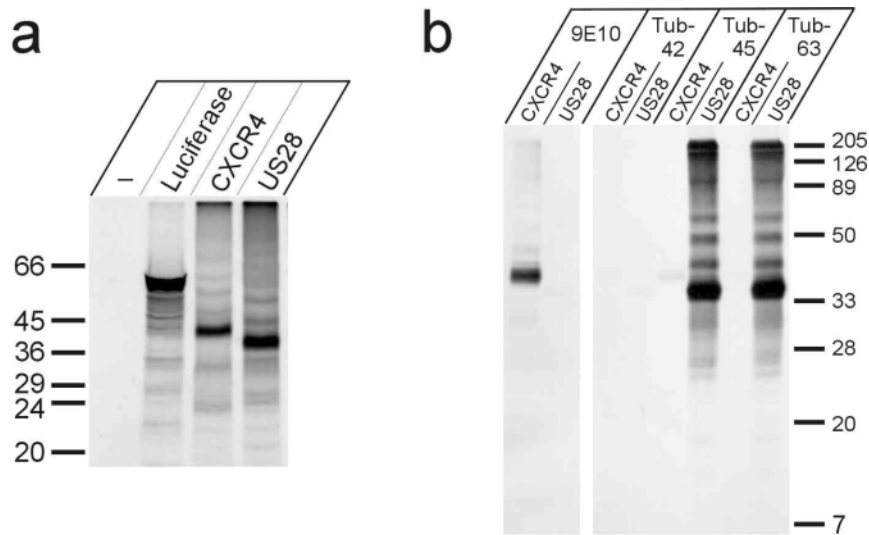


Abb. 4.2 In vitro Translation und Immunpräzipitation von US28. (a) Autoradiographie einer SDS-PAGE der in *in vitro* Translationsansätze. In einer in *in vitro* Transkription wurde die cDNA des US28-Rezeptors und des CXCR4myc-Rezeptors in RNA transkribiert. Die Ansätze ohne cDNA (-) und mit der Luziferase-cDNA dienten als Kontrollen. Die RNA wurde in einer in *in vitro* Translation zur Synthese der Proteine in Gegenwart von [³⁵S]Methionin verwendet. (b) Autoradiographie der Immunpräzipitation von US28. Der US28-Rezeptor wurde aus den in *in vitro* Translationsansätzen mit den mAk Tub-42, Tub-45 und Tub-63 und der CXCR4myc-Rezeptor mit dem Myc-Epitop-spezifischen mAk 9E10 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden in einer SDS-PAGE analysiert. Die Autoradiographie zeigt eines von zwei Experimenten mit gleichem Ergebnis.

4.2.1 Immunpräzipitation von in vitro translatiertem US28

Zunächst wurden die US28-spezifischen monoklonalen Antikörper in einer Immunpräzipitation von US28-Protein verwendet, das in einer in *in vitro* Translation (Kap. 3.7) hergestellt wurde. Die in *in vitro* Translation bietet die Möglichkeit, ein einzelnes Protein von einer RNA-Matrize mit genau definierter Basensequenz zu erzeugen. Die verwendete RNA wurde zuvor in einer in *in vitro* Transkription (Kap. 3.7) von einem pcDNA3.1(-)-Vektor mit der einklonierten US28 oder der als Kontrolle eingesetzten CXCR4 cDNA hergestellt. Anschließend wurde diese RNA in der in *in vitro* Translation mit mRNA-freien Retikulozytenlysaten in Gegenwart von [³⁵S]Methionin verwendet. Auf diese Weise konnten sowohl US28-, als auch CXCR4-Proteine synthetisiert und in einer Autoradiographie analysiert werden (Abb. 4.2a). Von den in *in vitro* Translationsansätzen wurde mit Hilfe der US28-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die mAk Tub-45 und Tub-63 spezifisch das US28-Protein banden und präzipitierten, das als Kontrolle dienende CXCR4-Protein jedoch nicht erkannten (Abb. 4.2b). Demgegenüber war der mAk Tub-42

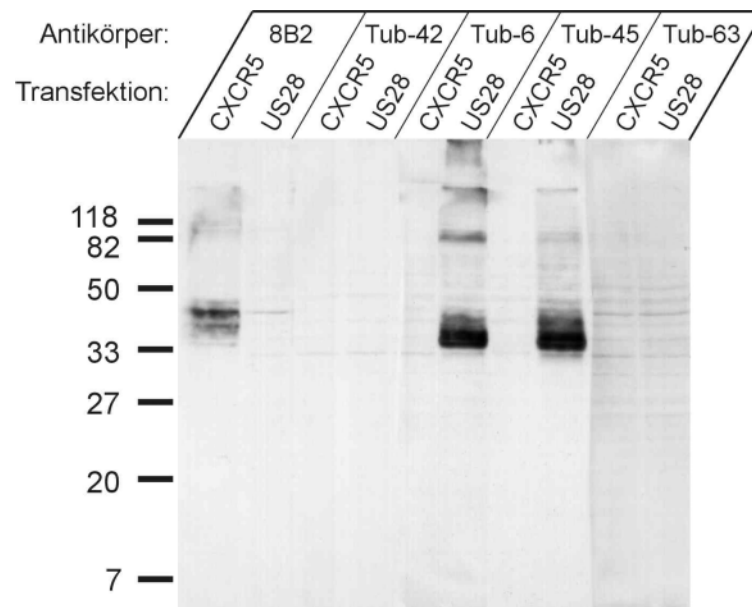


Abb. 4.3 Immunblot zum Nachweis von US28 in Gesamtzelllysaten transfizierter HEK293A Zellen. HEK293A Zellen wurden transient mit US28 oder CXCR5 (Kontrolle) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen und die Gesamtzelllysate in einem 13 %-igen SDS-PAGE Gel aufgetrennt, wie angegeben. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde die US28-Expression mit den mAk Tub-6, Tub-42, Tub-45 und Tub-63 und die CXCR5-Expression mit dem mAk 8B2 in einer Immunfärbung analysiert. Der Immunblot zeigt ein repräsentatives Ergebnis für drei unabhängige Experimente.

nicht in der Lage US28 zu präzipitieren. CXCR4 konnte über ein carboxyterminales myc-Epitop (CXCR4myc) mit dem myc-Epitop spezifischen mAk 9E10 präzipitiert werden.

4.2.2 Nachweis von US28 in Immunblots transfizierter HEK293A Zellen

Für die Herstellung der US28-spezifischen Antikörper wurden Mäuse mit dem bakteriell exprimierten Fusionsprotein GST-US28¹⁻⁵¹ immunisiert. Bei der bakteriellen Expression ist jedoch nicht die posttranslationale Modifikation der Proteine gewährleistet, wie sie in eukaryontischen Zellen stattfindet. Daher sollte als nächstes überprüft werden, ob die hergestellten Antikörper in der Lage waren in humanen Zellen exprimierten US28-Rezeptor zu erkennen. HEK293A Zellen wurden transient mit der US28-Sequenz in dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1(-) (Kap. 3.5) transfiziert. Als Kontrolle wurde der humane Chemokinrezeptor CXCR5 verwendet (Kap. 2.3). Mit den mAk Tub-6 und Tub-45 konnte der US28-Rezeptor in einem Immunblot von Gesamtzelllysaten US28-transfizierter Zellen spezifisch nachgewiesen werden, während in CXCR5-transfizierten Zellen kein Protein erkannt

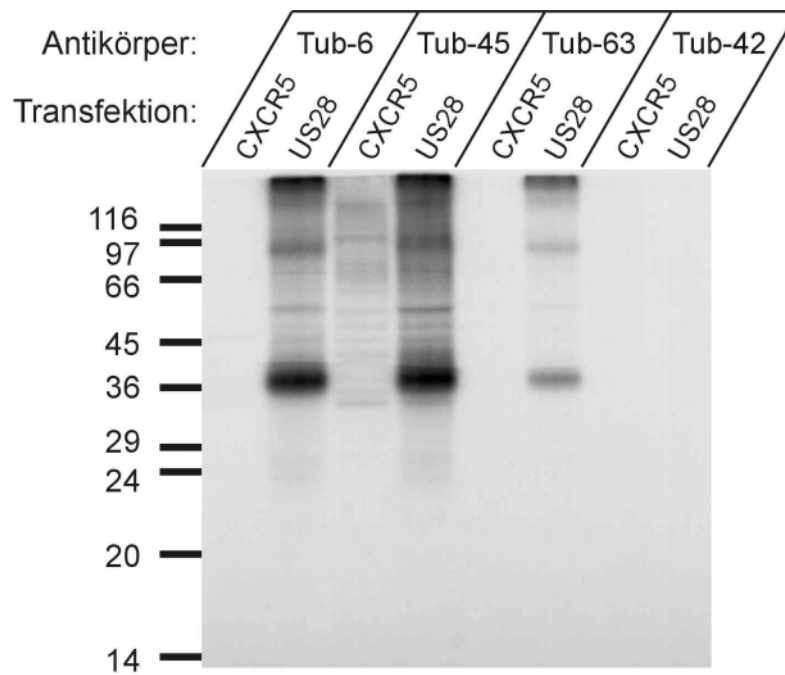


Abb. 4.4 US28 Immunpräzipitation aus transfizierten HEK293A Zellen. HEK293A Zellen wurden transient mit US28 oder CXCR5 (Kontrolle) transfiziert. 24 Stunden später wurden 5×10^6 Zellen metabolisch mit [^{35}S]Methionin/Cystein markiert. Anschließend wurde US28 mit den mAk Tub-6, Tub-42, Tub-45 und Tub-63 aus den Solubilisaten der markierten Zellen immunpräzipitiert und in einem 13 %-igen SDS-PAGE Gel analysiert. Die gezeigte Autoradiographie einer SDS-PAGE ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

wurde (Abb. 4.3). Darüber hinaus ließ sich das Molekulargewicht von US28 im Immunblot mit etwa 36 kDa bestimmen. Die CXCR5-Expression wurde mit dem 8B2-Antikörper kontrolliert. Mit den Antikörpern Tub-42 und Tub-63 konnte US28 im Immunblot nicht nachgewiesen werden.

4.2.3 Immunpräzipitation von US28 aus Lysaten transfizierter HEK293A Zellen

Im Verlauf der durchgeführten Immunblots wurden die Proteine zunächst in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Hierbei werden die Proteine denaturiert, was möglicherweise andere Epitope zugänglich macht, als es in der natürlichen Konformation des Proteins der Fall ist. Um zu überprüfen, ob die US28-spezifischen Antikörper den Rezeptor auch unter den Bedingungen einer Immunpräzipitation erkennen, wurden zunächst HEK293A Zellen mit US28 oder CXCR5 als Kontrolle transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit [^{35}S]Methionin / Cystein metabolisch markiert und die Rezeptoren aus Triton X-100 haltigen Zellsolubilisaten

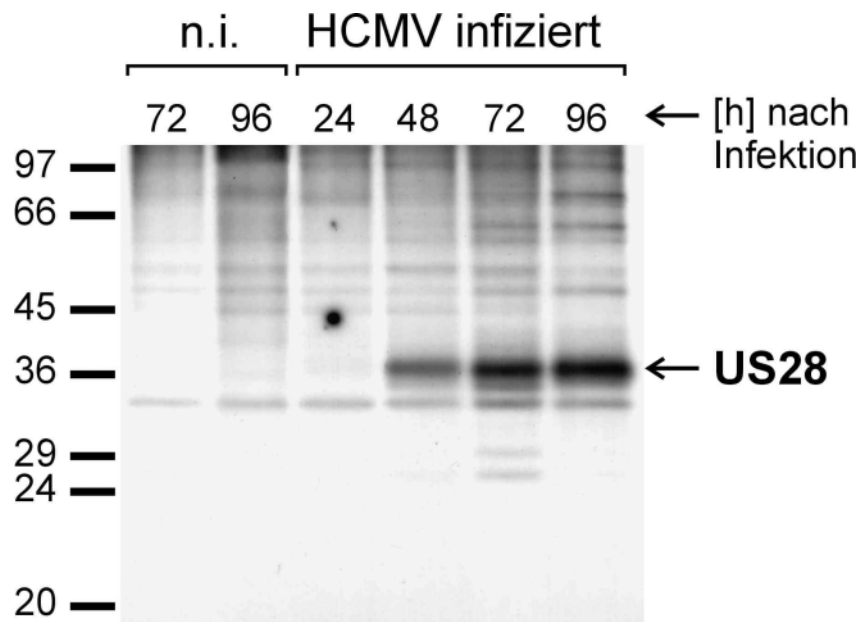


Abb. 4.5 Kinetik der US28-Expression in HCMV-infizierten humanen embryonalen Lungenfibroblasten (HELFL). Autoradiographie einer SDS-PAGE nach Immunpräzipitation von US28 aus Zellsolubilisaten. Humane embryonale Lungenfibroblasten wurden mit dem HCMV Stamm AD169 infiziert oder blieben uninfiziert (n.i.). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die Zellen metabolisch mit [35 S]Methionin/Cystein markiert, lysiert und US28 wurde aus den Zellsolubilisaten mit dem mAk Tub-45 immunpräzipitiert. Der präzipitierte Rezeptor wurde in einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und in einer Autoradiographie analysiert. Die aufgetragenen Probenmengen in der SDS-PAGE wurden entsprechend der relativen Einbausraten von [35 S]Methionin/Cystein durch die HELFL Zellen normalisiert.

immunpräzipitiert (Kap. 3.14). Wie aus Abb. 4.4 hervorgeht, sind die mAk Tub-6, Tub-45 und Tub-63 in der Lage spezifisch den US28-Rezeptor aus Zellsolubilisaten zu präzipitieren. Im Vergleich zeigt der Antikörper Tub-45 geringe unspezifische Bindungen auch in den CXCR5 transfizierten Kontrollzellen. Die von Tub-63 präzipitierte US28-Menge ist deutlich geringer als bei Tub-6 und Tub-45, was möglicherweise auf einer geringeren Affinität des Antikörpers für das US28-Molekül beruht. Der mAk Tub-42 war nicht in der Lage den Rezeptor zu erkennen. Die Lage der US28-Banden in der Immunpräzipitation bestätigte die in dem Immunblot beobachtete Größe von 36 kDa.

4.2.4 Expressionskinetik von US28 in HCMV infizierten Fibroblasten

Mit den neu hergestellten US28-spezifischen Antikörpern konnte der zeitliche Verlauf der US28-Proteinexpression in Fibroblastenzellen nach einer Infektion mit dem humanen Zytomegalievirus (HCMV) untersucht werden. Hierzu wurden humane embryonale Lungenfi-

broblasten (HELFL) mit dem HCMV-Stamm AD169 infiziert und 24, 48, 72 und 96 Stunden später metabolisch mit [³⁵S]Methionin/Cystein markiert. US28 wurde anschließend mit dem monoklonalen Antikörper Tub-45 aus den Zellysaten immunpräzipitiert. Wie die Autoradiographie zeigt (Abb. 4.5), konnte US28 frühestens 48 h nach einer HCMV-Infektion nachgewiesen werden. Die Menge des exprimierten Rezeptors nahm 72 und 96 h nach der Infektion noch zu, während US28 24 h nach der HCMV-Infektion noch nicht nachweisbar war. Eine Kreuzreaktivität wurde weder mit anderen HCMV-kodierten Proteinen (24-96 h nach Infektion), noch mit endogenen Proteinen in den nicht infizierten Kontrollzellen festgestellt. Ferner konnte bei der Immunpräzipitation aus den HCMV-infizierten Fibroblasten ebenso wie bei transient transfizierten Zelllinien (Kap. 4.2.3) ein Protein mit einem Molekulargewicht von 36 kDa spezifisch nachgewiesen werden. Diese Beobachtung stützt die Annahme, daß die hergestellten monoklonalen Antikörper (Tub-6, Tub-45, Tub-63) den nativen US28-Rezeptor erkennen.

4.2.5 Durchflußzytometrie und Immunzytochemie der US28-Expression in HEK293A Zellen

Die Expression von US28 wurde mit Hilfe der monoklonalen Antikörper auch in der Durchflußzytometrie (FACS) und der Immunzytochemie getestet, da diese Methoden die Möglichkeit bieten die Proteinexpression in einzelnen Zellen zu untersuchen. In HEK293A Zellen wurde US28 oder humanes CXCR5 transient überexprimiert und die Rezeptorexpression mit den US28-spezifischen mAk analysiert. In der Durchflußzytometrie zeigten die mAk Tub-6, Tub-45 und Tub-63 die spezifische Anfärbung einer Zellpopulation in US28 transfizierten Zellen (Abb. 4.6a, graue Flächen), aber nicht in CXCR5 transfizierten Zellen (Abb. 4.6a, weiße Flächen). Für diese Experimente wurden die Zellen vor der Färbung fixiert und permeabilisiert (Kap. 3.21), um sowohl an der Zelloberfläche befindliche, als auch intrazelluläre Proteine detektieren zu können. Ähnlich wie in der Immunpräzipitation lieferte der mAk Tub-63 schwächere Signale als Tub-6 und Tub-45, so daß von Tub-63 in nur etwa 24 % der transfizierten Zellen eine US28-Expression erkannt wurde. Demgegenüber erkannten die Antikörper Tub-45 und Tub-6 bei 45 % beziehungsweise 48 % der Zellen eine US28-Expression. Ferner setzte sich bei den beiden letzteren Antikörpern die Zellpopulation der US28-exprimierenden Zellen deutlicher in Form einer Schulter von den negativen Zellen ab. In vergleichbarer Weise waren die Antikörper Tub-6 und Tub-45 in der Immunzytochemie in

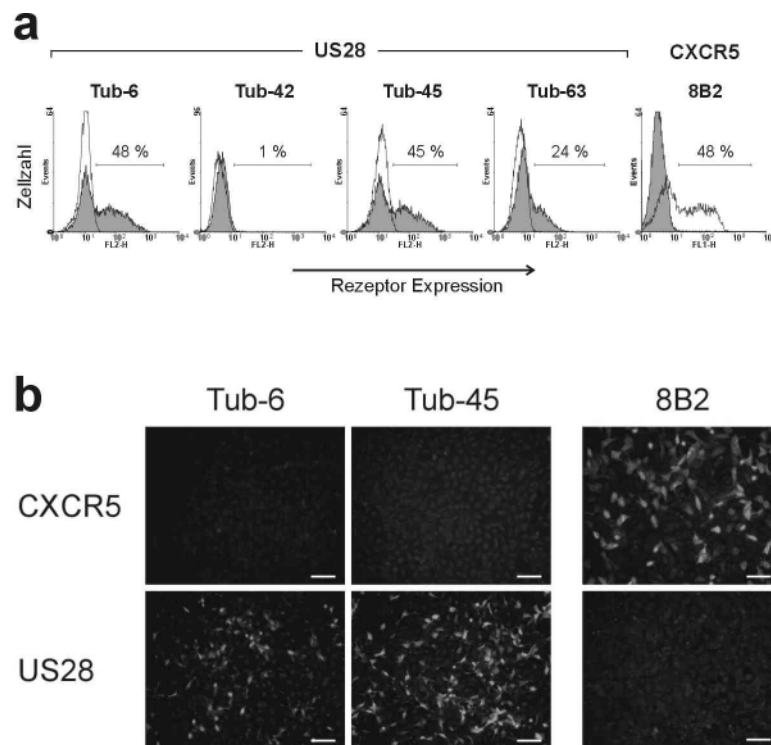


Abb. 4.6 Durchflußzytometrische und Immunzytochemische Analysen der US28-Expression in transient transfizierten HEK293A Zellen. (a) Durchflußzytometrische Analyse der US28 Expression in HEK293A Zellen. Die Zellen wurden transient mit US28 (grau) oder mit CXCR5 (weiß) transfiziert und 48 Stunden später fixiert und permeabilisiert. Die Immunfluoreszenzfärbung von US28 erfolgte mit den spezifischen mAk Tub-6, Tub-42, Tub-45 und Tub-63, die CXCR5-Färbung mit dem mAk 8B2. Angegeben ist der prozentuale Anteil von Zellen bei denen eine spezifische Rezeptorexpression nachgewiesen wurde. (b) Immunfluoreszenzmikroskopie von US28 und CXCR5 transfizierten HEK293A Zellen. Auf Objektträgern gewachsene Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion fixiert und permeabilisiert. US28 wurde mit den mAk Tub-6 und Tub-45 und CXCR5 mit dem mAk 8B2 angefärbt, wie angegeben. Der Maßstab entspricht 100 μm . Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

der Lage US28-exprimierende Zellen spezifisch von nicht exprimierenden Zellen zu unterscheiden (Abb. 4.6b).

Die Charakterisierung der hergestellten US28-spezifischen monoklonalen Antikörper läßt sich wie folgt zusammenfassen. Die monoklonalen Antikörper Tub-6 und Tub-45 waren in der Lage den US28-Rezeptor in Immunblots, Immunpräzipitationen, der Durchflußzytometrie (FACS) und der Immunzytochemie spezifisch nachzuweisen (Kap. 4.2.1-4.2.5). Ferner kann geschlossen werden, daß die Antikörper den US28-Rezeptor in seiner nativen Form erkennen, da dieser sowohl im Überexpressionssystem (HEK293A Zellen), als auch in Zytomegalievirus infizierten Primärzellen (HELFL, Kap. 4.2.4) nachgewiesen wurde. Der Antikörper

Name	Isotyp	Immunblot	Immun- präzipitation	FACS	Immun- zytochemie
Tub-6	IgG2b/ κ	++	++	++	++
Tub-45	IgG2a/ κ	++	++	++	++
Tub-63	IgG2b/ κ	–	±	+	n.d.
Tub-42	IgG2b/ κ	–	–	–	n.d.

Tab. 4.2 Charakterisierung der US28-spezifischen monoklonalen Antikörper. Symbole: ++: sehr starke Reaktion, +: starke Reaktion, ±: schwache Reaktion, –: keine Reaktion, n.d.: nicht durchgeführt

Tub-63 ist in eingeschränkter Weise in FACS-Analysen verwendbar. Tub-42, der aus dem differentiellen GST-US28¹⁻⁵¹-ELISA als positiv hervorging, war nicht in der Lage das zellulär exprimierte US28-Wildtyprotein zu erkennen. Die zusammenfassende Charakterisierung der US28-spezifischen monoklonalen Antikörper ist in Tab. 4.2 dargestellt.

4.3 Zelluläre Lokalisation des HCMV-kodierten Chemokinrezeptors US28

Ein Teil der US28-Funktionen, wie die Auslösung der Zellmigration und die Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase 2, ist ligandenabhängig reguliert (Streblow, 1999, Billstrom, 1998). Auf der anderen Seite wurden für US28 ligandenunabhängige Funktionen beschrieben, die unter humanen Chemokinrezeptoren ungewöhnlich sind. Hierzu zählt beispielsweise die ligandenunabhängige Aktivierung der Phospholipase C durch US28 (Casarosa, 2001). Mit Hilfe der hergestellten monoklonalen Antikörper gegen US28 konnte die Untersuchung weiterer funktioneller und zellbiologischer Eigenschaften durchgeführt werden. Darüber hinaus konnten nun aber auch molekulare Grundlagen für die zelluläre Expression und Signalleitung des US28-Rezeptors untersucht werden.

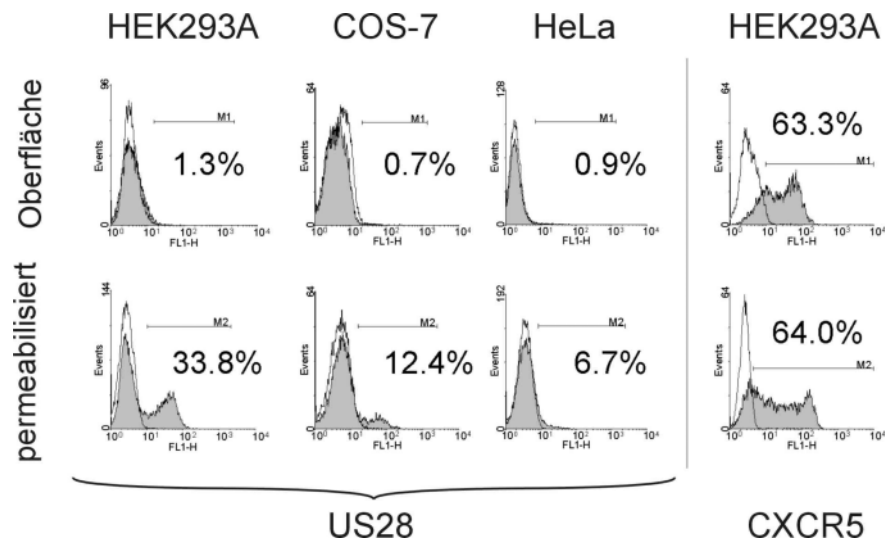


Abb. 4.7 Intrazelluläre Expression von US28 in verschiedenen humanen Zelllinien. HEK293A, COS-7 und HeLa Zellen wurden mit US28 oder CXCR5 transfiziert wie angegeben. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die Rezeptorexpression an der Zelloberfläche von intakten Zellen (Oberfläche) und die gesamte zelluläre Expression nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen bestimmt (permeabilisiert). Nach der Anfärbung von US28 mit dem mAk Tub-45 und CXCR5 mit dem mAk 8B2 wurde die Rezeptorexpression in einem Durchflußzytometer analysiert. Die Rezeptorexpression ist in grau, die Kontrollzellen in weiß dargestellt. Als Kontrolle der US28-Färbung dienten CXCR5 transfizierte Zellen, als Kontrolle der CXCR5-Färbung US28 transfizierte Zellen. Angegeben ist der relative Anteil der Rezeptor exprimierenden Zellen (M1, M2) gemessen an allen Zellen eines Transfektionsansatzes in Prozent. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

4.3.1 US28 wird überwiegend intrazellulär exprimiert

In vorangegangenen FACS-Analysen der US28-Expression wurde nur eine sehr geringe Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche von transient transfizierten HEK293A Zellen beobachtet. Um zu untersuchen, ob dies auf zelltypabhängige Faktoren oder auf rezeptorspezifische Besonderheiten zurückzuführen war, wurde die Expression von US28 in verschiedenen Zelllinien untersucht. Hierzu wurden die Zellen transient mit US28 oder dem humanen Chemokinrezeptor CXCR5 als Kontrolle transfiziert. Zwei Tage später wurde die Rezeptorexpression in lebenden Zellen (Oberflächenexpression) oder in fixierten und permeabilisierten Zellen (Zugang zu intrazellulären Molekülen) in einer FACS-Messung analysiert. Bei der Bestimmung der Oberflächenexpression wurden alle Zellen, die sich mit Propidiumjodid anfärben ließen, also eine für diesen Farbstoff und damit teilweise auch für Nachweisantikörper durchlässige Plasmamembran hatten, von der Analyse ausgeschlossen (Kap. 3.21). In allen drei Zelllinien HEK293A, COS-7 und HeLa, zeigte mit 1,3 %, 0,7 % oder 0,9 % nur ein sehr

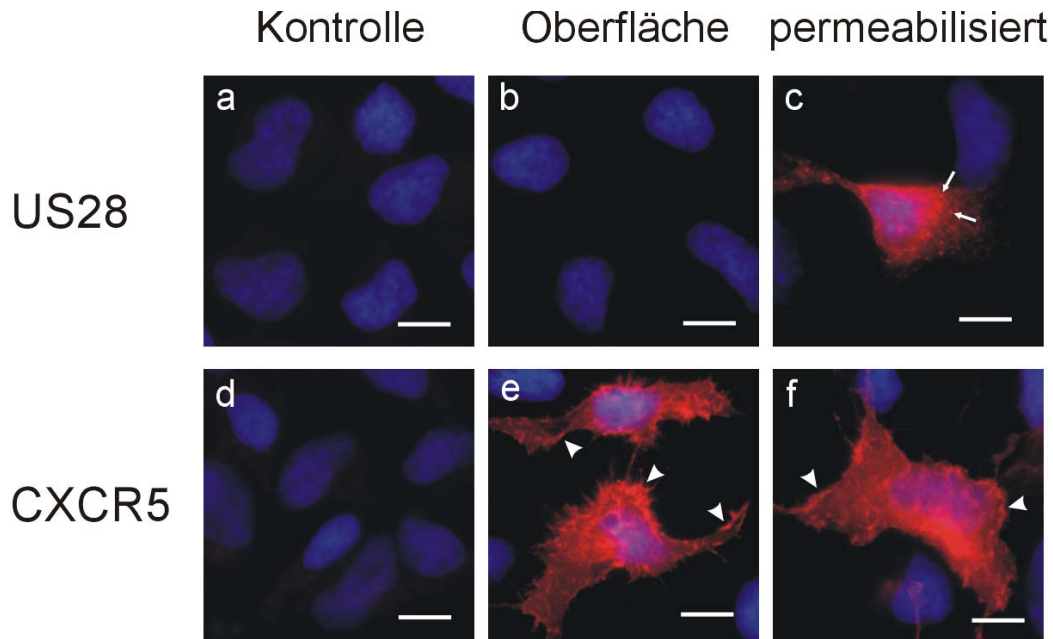


Abb. 4.8 Subzelluläre Lokalisation von US28 in transient transfizierten HEK293A Zellen. Immunfluoreszenzmikroskopie von HEK293A Zellen 48 Stunden nach einer Transfektion mit US28 (b, c, d) oder CXCR5 (a, e, f). Die Expression an der Zelloberfläche wurde in intakten Zellen (Oberfläche), die gesamte zelluläre Expression nach Fixierung und Permeabilisierung (permeabilisiert und Kontrolle) nachgewiesen. Die Immunfärbung (rot) von US28 erfolgte mit dem mAk Tub-45, CXCR5 wurde mit dem mAk 8B2 und Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Das abgebildete Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Der Maßstab entspricht $10\ \mu\text{m}$, Pfeilspitzen deuten auf eine Lokalisation in der Plasmamembran, Pfeile weisen auf intrazelluläre Vesikel hin.

geringer Anteil der Zellen eine Expression des US28-Rezeptors an der Oberfläche (Abb. 4.7). Die parallel durchgeführte Färbung von permeabilisierten Zellen konnte jedoch die intrazelluläre Expression von US28 bei 33,8 % der HEK293A, 12,4 % der COS-7 und 6,7 % der HeLa Zellen bestätigen. Demgegenüber zeigte der humane CXCR5-Rezeptor in HEK293A Zellen mit 63,3 % eine starke Oberflächenexpression, die mit dessen gesamtzellulärer Expression von 64 % vergleichbar war. Somit konnte vermutet werden, daß die geringe Zelloberflächenexpression von US28 auf Besonderheiten des Rezeptors, aber nicht auf solche der transfizierten Zelllinie zurückzuführen ist.

4.3.2 Subzelluläre Lokalisation von US28

Um die subzelluläre Lokalisation von US28 genauer untersuchen zu können, wurden einzelne Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. In intakten, transient transfizierten

zierten HEK293A Zellen war ebenso wie in der FACS-Analyse (Kap. 4.3.1) keine Zelloberflächenexpression des US28-Rezeptors nachzuweisen (Abb. 4.8). Demgegenüber zeigten mit CXCR5 transfizierte Kontrollen eine deutliche Rezeptorexpression an der Zelloberfläche. Der überwiegende Anteil des US28-Moleküls war hingegen in intrazellulären Strukturen nahe des Zellkerns und in vesikulären Strukturen des Zytoplasmas lokalisiert. Diese in permeabilisierten Zellen beobachtete Verteilung läßt eine vorwiegende Lokalisation in Kompartimenten des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Retikulums (ER) vermuten. Eine Anfärbung von Zelloberflächenstrukturen fehlte dagegen auch in den permeabilisierten Zellen vollständig. Bei der Überexpression des CXCR5-Rezeptors ist nach Permeabilisierung der Zellen ähnlich wie bei US28 eine intensive Färbung kernnaher Strukturen zu beobachten. Die starke Präsenz beider Rezeptoren in derartigen Zellbereichen (ER, Golgi) kann daher auch auf Eigenheiten der transienten Überexpression hinweisen. Daneben ist in CXCR5 transfizierten Zellen nach Permeabilisierung eine deutlich homogenere Anfärbung des gesamten Zytoplasmas und zusätzlich eine Konzentration des Rezeptors an der Zelloberfläche zu erkennen.

4.4 Posttranslationale Modifikationen des US28-Rezeptors

4.4.1 Untersuchung der Glykosylierung von US28

Für eine Reihe von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) ist eine *N*-Glykosylierung beschrieben. Hierzu zählen viele Hormonrezeptoren, aber auch der Chemokinrezeptor CCR2B (Wheatley und Hawtin, 1999, Preobrazhensky *et al.*, 2000). Bei manchen der Rezeptoren spielt die Glykosylierung für den intrazellulären Transport und die Expression an der Zelloberfläche eine wichtige Rolle. So könnte eine mögliche Glykosylierung im Zusammenhang mit der Regulation der US28-Oberflächenexpression stehen. Bei der *N*-Glykosylierung ist ein Oligosaccharid über eine *N*-glykosidische Bindung an den Asparaginrest (N) eines N-X-S/T Konsensus-Motivs gebunden. Da das US28-Protein an Aminosäureposition 30 einen Asparaginrest in einer N-Q-S-Sequenz besitzt, wurde eine mögliche *N*-Glykosylierung untersucht.

Zunächst wurde getestet, ob durch eine glykosidische Spaltung Oligosaccharidseitenketten von dem Rezeptor entfernt werden können. Verwendet wurde die Endoglykosidase H (EndoH_β). Sie hydrolysiert die β-1,4-glykosidische Bindung der beiden *N*-Acetylglucosamin-

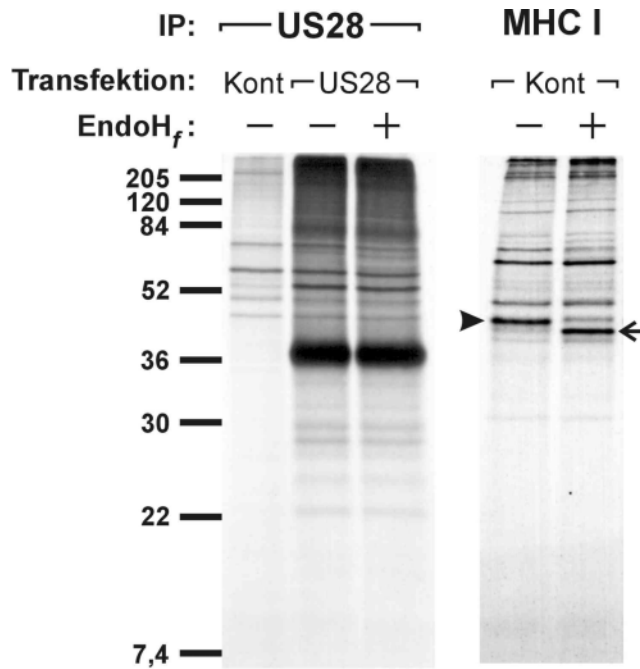


Abb. 4.9 Glykosidische Spaltung mit EndoH_f. HEK293A Zellen wurden mit US28 oder pcDNA3.1 (Kontrolle) wie angegeben transfiziert, 48 Stunden später metabolisch mit [³⁵S]Methionin/Cystein markiert und lysiert. US28 wurde mit dem mAk Tub-45 und die schwere Kette von MHC I Molekülen mit dem dHC70 Antikörperserum aus den Solubilisaten immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden nach der Hydrolyse von *N*-Glykosylierungen durch Endoglykosidase H_f (EndoH_f) in einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und in einer Autoradiographie analysiert. Pfeilspitzen deuten die Lage glykosylierter Proteine und Pfeile die Position deglykosylierter Formen im Gel an.

Reste in der sogenannten Kerneinheit (*Core*), die bei allen *N*-glykosidisch gebundenen Zuckerkern gleich ist:



Hierzu wurde US28 aus Zellsolubilisaten transfizierter und mit [³⁵S]Methionin/Cystein markierten HEK293A Zellen immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden mit der EndoH_f behandelt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle diente die schwere Kette von MHC Klasse I Molekülen, die endogen in den Zellen vorkommt. Wie in Abb. 4.9 deutlich zu erkennen ist, wandert die MHC Klasse I schwere Kette nach der EndoH_f-Behandlung weiter in das Gel ein (Pfeil) als die unbehandelte, glykosylierte Probe (Pfeilspitze). Die Abspaltung der Oligosaccharidketten vom MHC Klasse I Molekül hat dessen molekulare Größe und seine Nettoladung verändert und dadurch eine Veränderung des Wanderungsverhaltens des Glykoproteins verursacht. Im Gegensatz zur MHC Klasse I schweren Kette ist jedoch bei US28

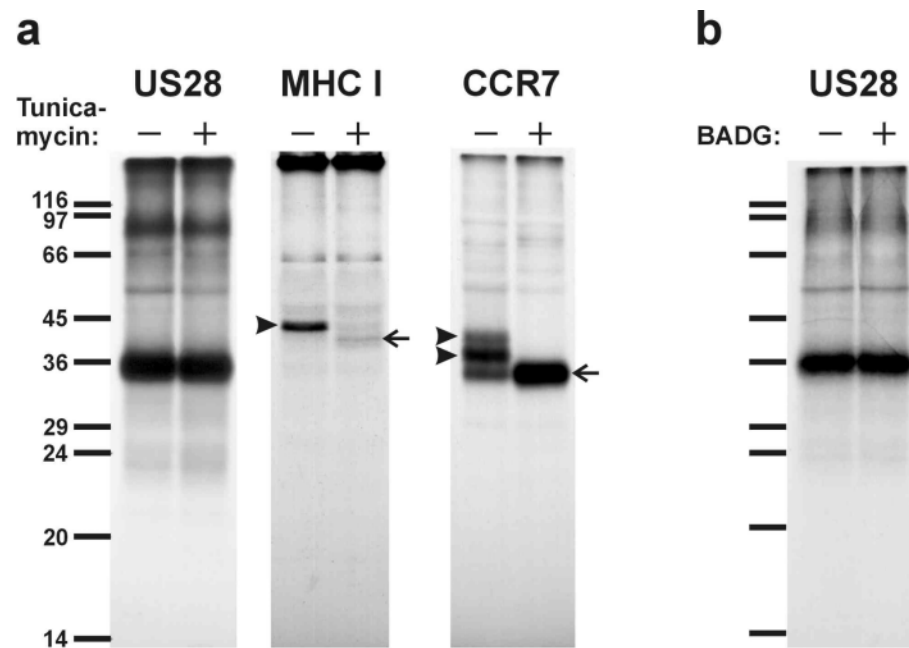


Abb. 4.10 Hemmung der Glykosylierung durch Tunicamycin und BADG. (a) Hemmung der *N*-Glykosylierung durch Tunicamycin. 24 Stunden nach einer Transfektion mit US28 (US28, MHC I) oder CCR7 wurden die Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit von Tunicamycin (10 $\mu\text{g/ml}$) metabolisch mit [^{35}S]Methionin/Cystein markiert. US28 wurde mit dem mAk Tub-45, CCR7 mit dem mAk 3D12 und MHC I schwere Kette mit dHC70 Serum aus den Zellsolubilisaten immunpräzipitiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und in einer Autoradiographie analysiert. Pfeilspitzen deuten die Lage glykosylierter Proteine und Pfeile die Position deglykosylierter Formen im Gel an. (b) Hemmung der *O*-Glykosylierung durch BADG. Autoradiographie einer US28 Immunpräzipitation mit dem mAk Tub-45 aus Zellsolubilisaten transfizierter HEK293A Zellen nach einer 24 stündigen Inkubation mit BADG (4 mM) und anschließender metabolischer Markierung mit [^{35}S]Methionin/Cystein. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

keine veränderte Lage der Proteinbande im Gel zu erkennen. US28 weist demnach keine EndoH_f-spaltbare *N*-Glykosylierung auf.

Es werden drei Typen von *N*-Glykosylierungen nach ihrem Gehalt an Mannose und Sialinsäure unterschieden, der Typ mit hohem Mannose-Anteil, der komplexe Typ und der Hybrid-Typ. Die EndoH_f ist in der Lage, Zuckerketten des Typs mit hohem Mannose-Anteil und des Hybrid-Typs zu spalten, aber nicht den komplexen Typ (Wheatley und Hawtin, 1999). Daher wurde eine mögliche *N*-Glykosylierung noch in einem zweiten Ansatz untersucht, bei dem die Ausbildung einer Glykosylierung durch Tunicamycin verhindert wird. Tunicamycin hemmt die Übertragung von *N*-Acetylglucosamin auf Dolicholphosphat, den ersten Schritt zur Bildung einer obligatorischen Kerneinheit von *N*-glykosydisch gebundenen Zuckern. Mit

US28 oder CCR7 transfizierte HEK293A Zellen wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin metabolisch mit [^{35}S]Met/Cys markiert und die Rezeptoren anschließend aus den Zellsolubilisaten immunpräzipitiert (Kap. 3.16.1). Für den Chemokinrezeptor CCR7 konnten zwei *N*-glykosylierte Varianten (Abb. 4.10a, Pfeilspitzen) und eine unglykosylierte Vorstufe nachgewiesen werden. Die beiden glykosylierten Varianten lassen sich möglicherweise auf die Präsenz von zwei *N*-Glykosylierungs-Konsensusmotiven (N-X-T) in der Aminosäuresequenz des CCR7-Rezeptors zurückführen. Eine befindet sich im aminoterminalen Abschnitt, die andere in der dritten extrazellulären Domäne des Rezeptors. Unter Einfluß von Tunicamycin waren die glykosylierten Formen nicht nachweisbar zugunsten einer verstärkten unglykosylierten Form (Pfeil). Auch bei der MHC Klasse I schweren Kette wurde die Glykosylierung in Gegenwart von Tunicamycin verhindert. Im Gegensatz zu CCR7 und MHC Klasse I schweren Ketten ließ sich für US28 kein Einfluß durch Tunicamycin, das heißt keine *N*-Glykosylierung nachweisen. Da auch keine Deglykosylierung durch EndoH_f bei US28 feststellbar war, kann eine *N*-Glykosylierung des US28-Rezeptors ausgeschlossen werden.

Gleichwohl weisen vorläufige Untersuchungen von HEK293A Zellen, die metabolisch mit [^3H]Glucosamin markiert wurden auf eine Glykosylierung des US28-Moleküls hin (Daten nicht gezeigt). Da eine *N*-glykosidische Modifikation ausgeschlossen werden kann, besteht die Möglichkeit einer *O*-Glykosylierung des US28-Rezeptors. *O*-Glykosylierungen sind von GPCRs bisher wesentlich seltener beschrieben worden, kommen aber unter anderem bei dem humanen RANTES-Rezeptor CCR5 vor (Farzan *et al.*, 1999). Für *O*-Glykosylierungen existiert kein Konsensus-Sequenz-Motiv, wie es für die *N*-Glykosylierungen besteht. Daher wurde die US28-Sequenz, basierend auf der *O*-Glykosylierungs-Datenbank „O-GlycBase“ (v6.00) (Gupta *et al.*, 1999), auf mögliche *O*-Glykosylierungs-Stellen mit Hilfe des „NetO-Glyc 2.0 Prediction Server“ analysiert. Glykosylierte Threonine treten häufig gruppiert und in Nachbarschaft von Prolinresten auf. So wurden die fünf Threoninreste an Position 4, 5, 6, 7 und 12 (vergl. Abb. 1.1) im N-Terminus des US28-Moleküls als potentielle *O*-Glykosylierungs-Stellen identifiziert. BADG ist ein Substratanalogon für die *N*-Acetyl- β -D-Glucosaminyltransferase und hemmt die Aktivität der 2,3(O)-Sialyltransferase. In Zellkulturexperimenten verhinderte BADG die *O*-Glykosylierung von Mucin-Molekülen (Kuan *et al.*, 1989). Um zu prüfen, ob US28 Mucin-artig glykosyliert ist, wurden transfizierte HEK293A Zellen mit oder ohne 4 mM BADG kultiviert. Nach einer metabolischen Markierung mit [^{35}S]Methionin/Cystein wurde US28 aus Zellsolubilisaten immunpräzipitiert und in

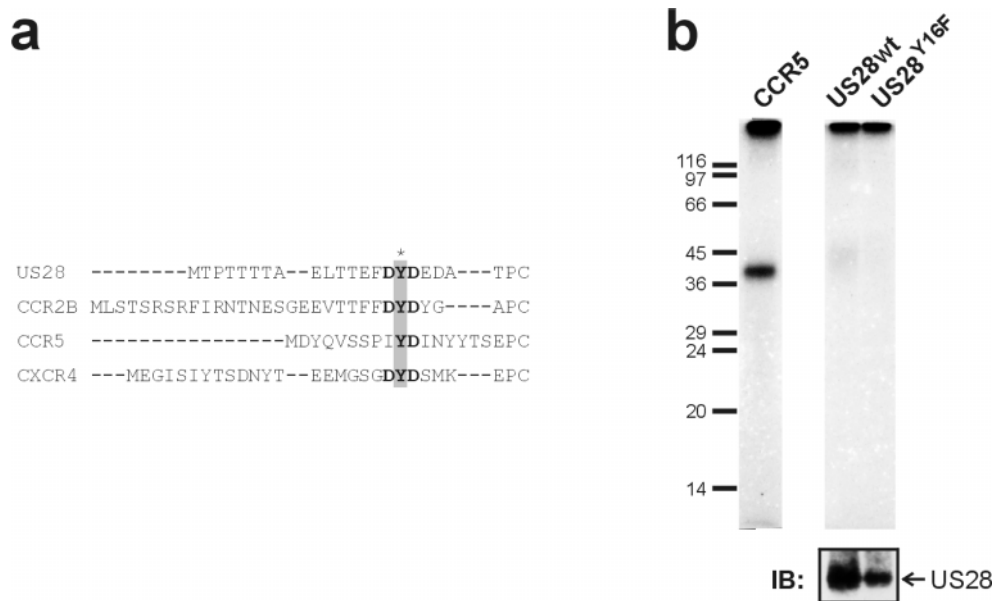


Abb. 4.11 US28 ist nicht durch Tyrosin-Sulfatierung modifiziert. HEK293A Zellen wurden mit FLAG-CCR5, US28wt oder US28^{Y12F} transfiziert und metabolisch mit [³⁵S]Natriumsulfat markiert. US28 wurde aus den Zellsolubilisaten markierter Zellen mit Tub-45 und FLAG-CCR5 mit dem FLAG-spezifischen mAk M2 immunpräzipitiert, und in einer SDS-PAGE analysiert. Die Autoradiographie zeigt eines von zwei Experimenten mit gleichem Ergebnis. Die geladene Rezeptormenge wurde in einem Immunblot (IB) kontrolliert.

einer SDS-PAGE aufgetrennt. Das US28-Molekül aus BADG-behandelten Zellen zeigt im Vergleich zu unbehandelten Zellen die gleiche Lage im SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 4.10b). Daher schien bei US28 keine Mucin-artige *O*-Glykosylierung vorzuliegen. Durch das Fehlen einer geeigneten Positivkontrolle konnte die Frage einer möglichen Mucin-artigen *O*-Glykosylierung jedoch nicht abschließend geklärt werden. Aufgrund des beobachteten [³H]Glucosamin-Einbaus kann jedoch vermutet werden, daß der Rezeptor durch eine nicht näher charakterisierte *O*-Glykosylierung modifiziert war.

4.4.2 Untersuchung der Tyrosin-Sulfatierung von US28

Eine weitere posttranslationale Modifikation mit Bedeutung für die Funktion von Chemokinrezeptoren ist die Sulfatierung an Tyrosinresten. Bei CCR2B, CCR5 und CXCR4 wurde eine Sulfatierung von Tyrosinresten in ihrem extrazellulären N-Terminus beschrieben, die sich als wichtig für die Ligandenbindung herausstellte (Preobrazhensky *et al.*, 2000, Farzan *et al.*, 1999, Farzan *et al.*, 2002). Interessanterweise kann US28, ebenso wie CXCR4 und CCR5, im Zusammenwirken mit CD4 als Corezeptor für den Eintritt des Humanen Immun-

defizienzvirus (HIV) in Zellen dienen. Diese HIV-Corezeptor-Funktion war besonders bei CCR5, der wie US28 ein RANTES-Rezeptor ist, von dessen Tyrosin-Sulfatierung abhängig. Das Tyrosin an Position 16 von US28 liegt in einem Bereich mit hoher Sequenzhomologie zu den sulfatierten Tyrosinen der anderen drei Chemokinrezeptoren (Abb. 4.11). Daher wurde eine mögliche Tyrosin-Sulfatierung von US28 in einem vergleichenden Mutagenese-Ansatz untersucht. Zu diesem Zweck wurde zunächst mittels einer PCR-Mutagenese der N-terminale Tyrosinrest an Position 16 (Y¹⁶) durch einen Phenylalaninrest ersetzt (Kap. 3.5). Die daraus hervorgegangene US28^{Y16F}-Variante, der US28-Wildtyp (US28wt) und CCR5 als Positivkontrolle wurden in HEK293A Zellen transfiziert. Die Rezeptoren wurden nach einer metabolischen Zellmarkierung mit [³⁵S]Natriumsulfat aus den Zellsolubilisaten immunpräzipitiert und in einer SDS-PAGE autoradiographisch analysiert. Zur Kontrolle der Rezeptorexpression wurde von einem Teil der immunpräzipitierten Proben ein Immunblot angefertigt. Im Gegensatz zu dem CCR5-Rezeptor konnte bei US28 kein Einbau von [³⁵S]Sulfat beobachtet werden. Somit kann geschlossen werden, daß bei US28 weder eine Tyrosin-Sulfatierung vorlag, noch eine Sulfatierung von Zuckermodifikationen des Rezeptors vorhanden war, wie sie für den CXCR4-Rezeptor beschrieben wurde (Farzan *et al.*, 2002).

4.5 Phosphorylierung des US28-Rezeptors

4.5.1 US28 besitzt ein hohes basales Phosphorylierungsniveau

Die Rezeptorphosphorylierung stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus der Signalleitung und der intrazellulären Verteilung von GPCR dar (Ferguson, 2001, Carman und Benovic, 1998). Da US28 eine ungewöhnlich geringe Zelloberflächenexpression aufwies, wurde die Rezeptorphosphorylierung in transient transfizierten HEK293A Zellen untersucht. Die Zellen wurden metabolisch mit [³²P]Orthophosphat (³²P_i) markiert und für 10 Minuten mit Chemokin-Liganden oder dem Proteinkinase C-Aktivator PMA stimuliert. Anschließend wurden die immunpräzipitierten Rezeptoren in einer SDS-PAGE analysiert. US28 zeigte eine sehr hohe basale Phosphorylierung, die nicht durch eine Stimulierung mit den Liganden RANTES oder MIP-1 α oder unspezifisch durch PMA erhöht wurde (Abb. 4.12). Auch die RANTES-Stimulierung in einer Zeitkinetik (1, 5, 10, 30, 60, 90 120 Minuten), bewirkte zu keinem Zeitpunkt eine Modulation der US28-Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt). Eine

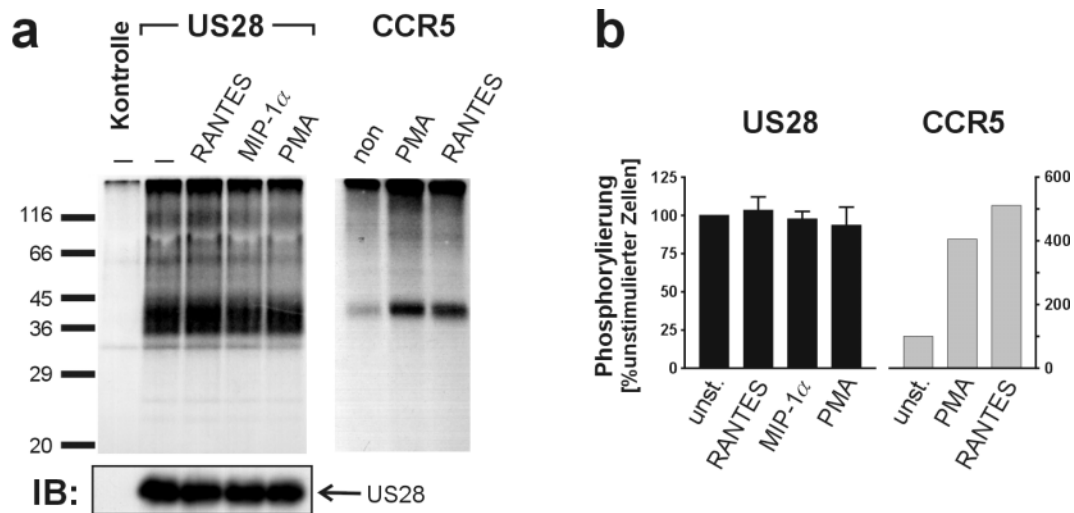


Abb. 4.12 Konstitutive Phosphorylierung von US28 in HEK293A Zellen. (a) HEK293A Zellen wurden mit US28, FLAG-CCR5 oder pcDNA3.1(-) (Kontrolle) transfiziert, 48 Stunden später mit $^{32}\text{P}_i$ markiert und 10 Minuten mit RANTES (10 nM), MIP-1 α (20 nM) oder PMA (30ng/ml) bei 37 °C stimuliert. US28 wurde aus den Solubilisaten markierter Zellen mit Tub-45 und FLAG-CCR5 mit M2 mAk immunpräzipitiert, in einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und in einer Autoradiographie analysiert. Ein Teil der Immunpräzipitate diente in einem Immunblot (IB) zur Kontrolle der geladenen Rezeptormengen. (b) Die Rezeptorphosphorylierung wurde mit einem BAS 2000 *image analyzer* quantifiziert. Angegeben ist die prozentuale Veränderung des $^{32}\text{P}_i$ -Einbaus bezogen auf den unstimulierten (unst.) Rezeptor. Die Phosphorylierungsintensität wurde auf die im Gel geladene Rezeptormenge, die mit Hilfe des Immunblots (IB) densitometrisch bestimmt wurde normalisiert. Für US28 sind Mittelwerte \pm S.D. von fünf unabhängigen Experimenten für RANTES- oder unstimulierte Zellen und drei Experimente bei der MIP-1 α oder PMA Stimulation dargestellt. Für CCR5 ist die Auswertung eines repräsentativen Ergebnisses gezeigt.

derartige Liganden-unabhängige, konstitutive Phosphorylierung ist unter den Chemokinrezeptoren bislang noch nicht beschrieben worden. Zum Vergleich ist hier die geringe basale Phosphorylierung des endogenen Rezeptors für RANTES und MIP-1 α (CCR5) gezeigt, die nach Liganden-Bindung oder PKC-Aktivierung um das vier- bis fünffache verstärkt wird.

4.5.2 Fractalkine hemmt die basale US28-Phosphorylierung

Das Chemokin Fractalkine (FKN oder CX₃CL1) wurde als ein sogenannter „inverser Agonist“ für US28 beschrieben (Casarosa *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, daß die US28-Expression zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung von Phospholipase C führt, und daß Fractalkine in der Lage war diese konstitutive Aktivierung teilweise zu hemmen. Um zu prüfen, ob Fractalkine auch die beobachtete hohe basale US28-Phosphorylierung moduliert, wurden transfizierte HEK293A Zellen in Gegenwart von Fractalkine mit $^{32}\text{P}_i$ -markiert und der

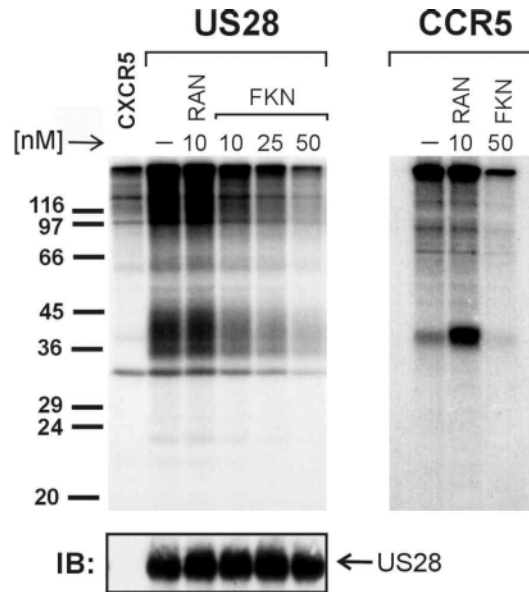


Abb. 4.13 Fractalkine hemmt die basale US28- und CCR5-Phosphorylierung. US28, FLAG-CCR5 oder zur Kontrolle mit CXCR5 transfizierte HEK293A Zellen wurden in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen Fractalkine (FKN) metabolisch mit $^{32}\text{P}_i$ markiert. Die Rezeptoren wurden aus Zellsolubilisaten immunpräzipitiert und in einer SDS-PAGE analysiert. Ein Teil der Immunpräzipitate diente in einem Immunblot (IB) zur Kontrolle der geladenen Rezeptormengen. Die gezeigte Autoradiographie ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

immunpräzipitierte Rezeptor in einer Autoradiographie analysiert. Das Ergebnis der Untersuchung war, daß Fractalkine die basale US28-Phosphorylierung partiell und in einer konzentrationsabhängigen Weise hemmte (Abb. 4.13). Gleichermäßen konnte eine Hemmung der basalen Phosphorylierung von CCR5 durch Fractalkine festgestellt werden. Da Fractalkine zwar ein beschriebener Ligand für US28, nicht aber für CCR5 ist, kann eine indirekte oder unspezifische Wirkungsweise von Fractalkine auf die Rezeptorphosphorylierung nicht ausgeschlossen werden.

4.5.3 Modulation der basalen US28-Phosphorylierung durch sekundäre Botenstoff-abhängige Kinasen

Generell kann die Phosphorylierung von GPCRs durch zwei Mechanismen geschehen, entweder Liganden-abhängig durch G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinasen (GRK) oder durch sekundäre Botenstoff-abhängige Kinasen. Eine Analyse der US28 Aminosäuresequenz

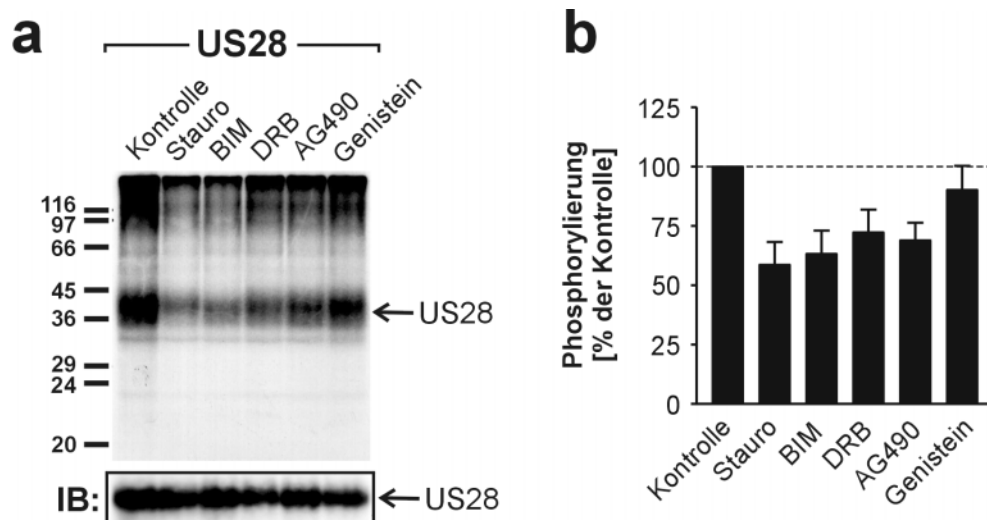


Abb. 4.14 Inhibitoren von sekundären Botenstoff-abhängigen Kinasen hemmen die basale US28-Phosphorylierung. (a) Mit US28 transfizierte HEK293A Zellen wurden mit $^{32}\text{P}_i$ in Gegenwart von Staurosporin (Stauro, 150 nM), Bisindolylmaleimid (BIM, 5 μM), 5,6-Dichloro-1- β -D-Ribofuranosylbenzimidazol (DRB, 30 μM), AG490 (25 μM), Genistein (50 μM) oder ohne Hemmstoff (Kontrolle) metabolisch markiert. US28 wurde mit dem mAk Tub-45 aus den Zellsolubilisaten immunpräzipitiert und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Rezeptorphosphorylierung wurde in einer Autoradiographie (oben) und die geladene Rezeptormenge in einem Immunblot (IB) analysiert. (b) Quantifizierung der US28-Phosphorylierung in Gegenwart von Hemmstoffen sekundärer Botenstoff-abhängiger Kinasen. Die densitometrische Quantifizierung der Rezeptorphosphorylierung erfolgte, wie in Abb. 4.12b beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.D. von drei unabhängigen Experimenten.

mit dem HUSAR Programm identifizierte mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für Serin/Threonin Kinasen in der intrazellulären C-terminalen Domäne (s. Abb 1.2). Die Serine an Position 327 und 333 sind mögliche Substrate für PKC, während Serin-331 und Threonin-337 potentielle Phosphorylierungsstellen von cAMP/cGMP-abhängigen Kinasen darstellen. Die Threonine 337 und 341 und Serin-333 liegen in Konsensus-Sequenzen für die Caseinkinase 2 (CK2). Um zu prüfen, ob die genannten sekundäre Botenstoff-abhängigen Proteinkinasen einen Einfluß bei der Regulation der basalen US28-Phosphorylierung haben, wurden verschiedene spezifische Kinasen-Inhibitoren in Phosphorylierungs-Experimenten eingesetzt. Hierzu wurden transfizierte HEK293A Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit der Inhibitoren mit $^{32}\text{P}_i$ markiert. Wie in Abb. 4.14 dargestellt, nimmt die US28-Phosphorylierung nach Hemmung mit dem Breitspektrum-Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin, dem PKC-spezifischen Inhibitor Bisindolylmaleimid (BIM) oder dem CK2-Inhibitor 5,6-Dichloro-1- β -D-Ribofuranosylbenzimidazol (DRB) auf 59 %, 63 % beziehungsweise 68 % des Basalwertes ab. Im Gegensatz dazu war Genistein, ein Inhibitor von EGF-Rezeptor-artigen Protein-

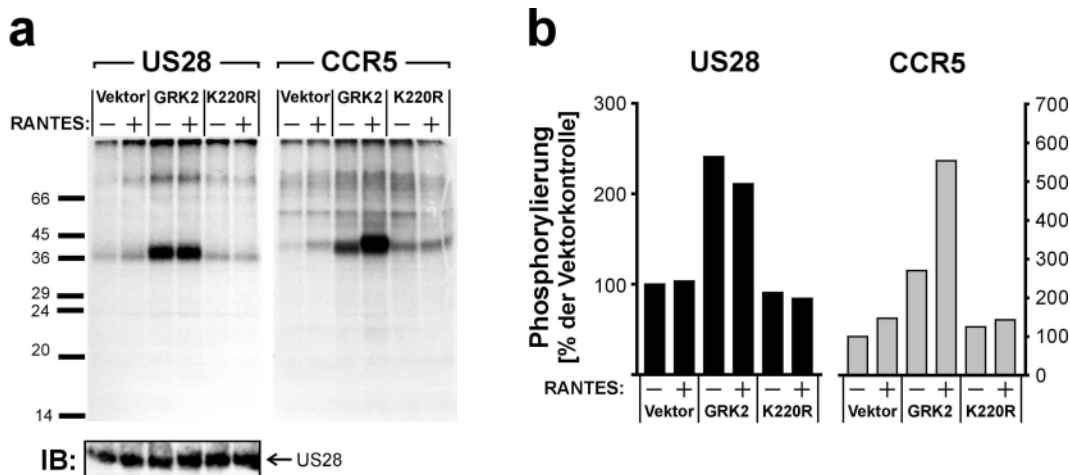


Abb. 4.15 Die Überexpression von GRK2 verstärkt die basale US28-Phosphorylierung. (a) US28 und FLAG-CCR5 wurden wie angegeben entweder zusammen mit GRK2, GRK2^{K220R} oder pcDNA3.1(-) (Vektor) in HEK293A Zellen transfiziert. Die Zellen wurden metabolisch mit ³²P_i markiert und anschließend 10 Minuten mit oder ohne RANTES (10 nM) inkubiert. Gezeigt ist die Autoradiographie einer SDS-PAGE nach Immunpräzipitation von US28 und FLAG-CCR5 mit den mAk Tub-6 beziehungsweise M2 und ein Immunblot (IB) zur Kontrolle der aufgetragenen Rezeptormengen. (b) Quantitative Auswertung der Rezeptorphosphorylierung. Die densitometrische Bestimmung der Rezeptorphosphorylierung erfolgte, wie in Abb. 4.12b beschrieben. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Tyrosinkinasen, ohne Effekt. Es kann geschlossen werden, daß zumindest die Proteinkinasen PKC und CK2 einen direkten oder indirekten Einfluß auf die Regulation der basalen US28-Phosphorylierung haben. Da keiner der verwendeten Inhibitoren in der Lage war die Phosphorylierung vollständig zu hemmen, sind vermutlich weitere Kinasen oder Aktivierungswege an der Phosphorylierung beteiligt. Der hemmende Effekt von AG490, einem Inhibitor von Protein-Tyrosinkinasen, weist auf eine mögliche Verbindung zur Familie der Jak Kinasen hin.

4.5.4 Überexpression von GRK2 verstärkt die US28-Phosphorylierung

Unter den G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) kommt der GRK2 eine besondere Rolle bei der Regulation von Chemokinrezeptoren zu (Aragay *et al.*, 1998b). Die GRK-abhängige GPCR Phosphorylierung kann direkt als Phosphorylierung des Ligandenbindenden Rezeptors oder indirekt durch PKC-aktivierte GRKs stattfinden (Chuang *et al.*, 1995, Winstel *et al.*, 1996, Pronin *et al.*, 1997). Da die basale US28-Phosphorylierung partiell PKC-abhängig war (Kap. 4.6.3) wurde untersucht, ob GRK2 US28-Phosphorylieren konnte. Wenn GRK2, die endogen in HEK293 Zellen exprimiert wird (Menard *et al.*, 1997), für die

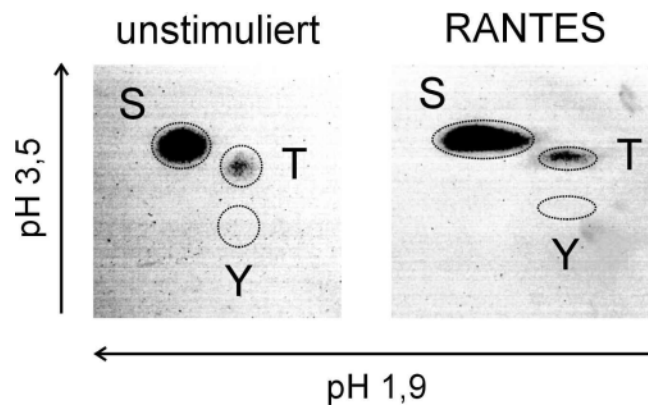


Abb. 4.16 Analyse der Phosphoaminosäuren von US28 in einer zweidimensionalen Dünnschicht-Elektrophorese. HEK293A Zellen wurden mit US28 transfiziert, mit ^{32}P metabolisch markiert und 10 Minuten mit 10 nM RANTES oder ohne RANTES (unstimuliert) inkubiert. Der Rezeptor wurde mit dem mAk Tub-45 immunpräzipitiert, nach einer SDS-PAGE aus dem Gel eluiert und in 6 M HCl hydrolysiert. Das Aminosäurehydrolysat wurde in einer zweidimensionalen Dünnschichtelektrophorese aufgetrennt. Die Lage des Phosphoserins (S), Phosphothreonins (T) und Phosphotyrosins (Y) wurde durch eine Ninhydrinfärbung von Referenz- Phosphoaminosäuren bestimmt und mit der Autoradiographie der Dünnschichtelektrophorese verglichen.

US28-Phosphorylierung verantwortlich ist, kann von einer GRK2-Überexpression eine verstärkte US28-Phosphorylierung erwartet werden. Die gemeinsame Überexpression von US28 zusammen mit GRK2 führte zu einem zwei bis dreifachen Anstieg der US28-Phosphorylierung (Abb. 4.15). In dem Kontrollansatz mit der GRK2-Variante K220R, welche keine Kinasefunktion besitzt, blieb eine Veränderung der Rezeptorphosphorylierung aus. Ebenso führte die Stimulation mit RANTES (10 nM) nicht zu einer Erhöhung der US28-Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu erreichte CCR5 zusammen mit GRK2 überexprimiert erst nach RANTES-Stimulation eine fünf bis sechsfache Phosphorylierung.

4.5.5 Bestimmung der phosphorylierten Aminosäuren

Die Phosphorylierung von GPCRs durch sekundäre Botenstoff-abhängige Kinasen oder durch GRKs findet an Serin- und Threoninresten statt, die sich in den intrazellulären Schleifen beziehungsweise dem C-Terminus der GPCRs befinden (Ferguson, 2001). Ferner konnte eine mögliche Tyrosinphosphorylierung aufgrund der teilweisen Hemmung der US28-Phosphorylierung durch den Tyrosinkinase-Inhibitor AG490 (Kap. 4.6.3) nicht ausgeschlossen werden. In einem ersten Schritt zur Identifizierung der US28-Phosphorylierungsstellen

wurden daher zunächst die phosphorylierten Aminosäurereste bestimmt. Aus US28 transfizierten, $^{32}\text{P}_i$ markierten HEK293A Zellen wurde US28 nach RANTES-Stimulierung oder ohne Stimulierung immunpräzipitiert und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Phospho-US28-Proteine wurden aus dem Gel isoliert, durch Hydrolyse in einzelne Aminosäuren aufgespalten und diese in einer zweidimensionalen Dünnschicht-Elektrophorese aufgetrennt. Wie die Autoradiographie ergab, wird US28 an Serinresten und zu einem wesentlich geringeren Umfang auch an Threoninresten phosphoryliert (Abb. 4.16). Tyrosinreste des US28-Rezeptors wurden nicht phosphoryliert. Es blieb dabei ohne Auswirkung auf die Art der Phosphorylierung, ob der Rezeptor RANTES-stimuliert wurde oder unstimuliert war.

4.5.6 Identifizierung der US28-Phosphorylierungsstellen

Nachdem keine Tyrosinphosphorylierung des US28-Rezeptors nachgewiesen werden konnte, wurde sich bei der Untersuchung der Phosphorylierungsstellen auf Serin- und Threoninreste konzentriert. Die C-terminale Domäne von US28 enthält 12 Serin und 2 Threoninreste, die potentielle Akzeptoren von Phosphatresten sind (Abb 4.17a). Mit Hilfe einer Mutagenesestudie sollte geprüft werden, welche der Aminosäuren phosphoryliert werden. Hierzu wurden von Frau Jana Droese im Rahmen ihrer Dissertation hergestellte Vektorkonstrukte verwendet (s. Kap. 2.3). Die Vektoren kodierten für US28-Varianten, deren C-terminale Serine in verschiedenen Kombinationen gegen Alaninreste ausgetauscht waren (Abb 4.17a). Ferner wurde eine US28-Variante (US28^{ST/A}) hergestellt, bei der zusätzlich zu den 12 Serinresten die zwei C-terminalen Threonine (AS-Positionen 337 und 341) gegen Alaninreste ausgetauscht wurden (Kap. 3.5). Die US28-Varianten wurden in HEK293A Zellen überexprimiert, metabolisch $^{32}\text{P}_i$ markiert und ihre Phosphorylierung in der SDS-PAGE analysiert. Der Austausch der C-terminalen Serinreste 3-5 (AS-Position 323, 325, 327), 6-8 (330, 331, 333) und 9-12 (338, 339, 343, 350) führte zu einer Verringerung der basalen Phosphorylierung von US28 (Abb. 4.17). Die stärkste Abnahme war bei der S9-12A-Variante zu beobachten. Daher kann angenommen werden, daß sich die Mehrzahl der Phosphorylierungsstellen unter den Serinen 9-12 befindet. Ein Austausch der Serine 1 und 2 (AS-Position 315 und 319) gegen Alanin bewirkte keine Veränderung der US28-Phosphorylierung, so daß diese beiden Serinreste keine Funktion als Phosphoakzeptor besitzen. Diese Vermutung wird auch dadurch gestärkt, daß die Phosphorylierung der S3-12A-Variante nicht signifikant von der S1-12A-Variante abweicht und sich die beiden Varianten lediglich durch die Anwesenheit der Serine

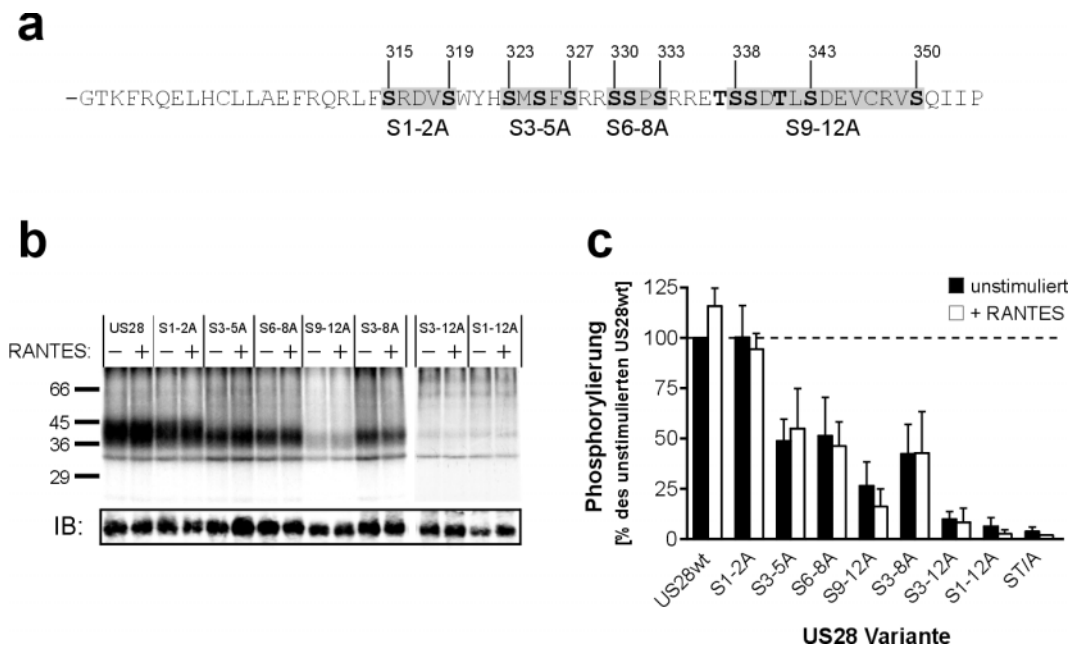


Abb. 4.17 Der Austausch der C-terminalen Serin- und Threoninreste verhindert die US28-Phosphorylierung. (a) Schematische Darstellung der C-terminalen Aminosäuresequenz des US28-Rezeptors. Die zwölf Serinreste wurden aufeinanderfolgend von 1-12 nummeriert. Die Serinreste und die zwei Threoninreste wurden in verschiedenen Gruppen (grau unterlegt) gegen Alaninreste ausgetauscht. (b) HEK293A Zellen wurden mit US28 und den verschiedenen Ser/Thr→Ala Austauschvarianten transfiziert. Die Zellen wurden mit $^{32}\text{P}_i$ metabolisch markiert und 10 Minuten mit oder ohne RANTES (10 nM) inkubiert. Die US28-Rezeptoren wurden mit dem mAk Tub-45 aus den Zellsolubilisaten immunpräzipitiert und in einer SDS-PAGE analysiert. Gezeigt ist die Autoradiographie einer SDS-PAGE und ein Immunblot (IB) zur Kontrolle der aufgetragenen Rezeptormengen. (c) Quantitative Auswertung der Phosphorylierung der verschiedenen Ser/Thr→Ala Austauschvarianten. Die densitometrische Bestimmung der Rezeptorphosphorylierung erfolgte, wie in Abb. 4.12b beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.D. von drei (S1-12A und ST/A) oder fünf (übrige Varianten) unabhängigen Experimenten.

1 und 2 unterscheiden. Bei der Bestimmung der phosphorylierten Aminosäure (Kap. 4.6.5) war neben der starken Serinphosphorylierung auch ein schwächeres Phosphothreonin-Signal festgestellt worden. Daher könnte die verbleibende geringe US28-Phosphorylierung bei US28^{S3-12A} und US28^{S1-12A} auf eine Phosphorylierung der Threoninreste an Position 337 beziehungsweise 341 zurückzuführen sein. Deren zusätzliche Alanin-Substitution in der US28^{ST/A}-Variante führte jedoch nicht zu einer weiteren, signifikanten Verminderung der gesamtzellulären US28-Phosphorylierung (Abb. 4.17c). Wie die quantitative Analyse ferner ergab, führte die RANTES-Stimulierung bei keiner Variante zu einer signifikanten Veränderung der Rezeptorphosphorylierung (Student *t*-Test). Zusammenfassend kann geschlossen werden, daß C-terminale Serinreste zwischen Position 323 und 350 für die basale US28-

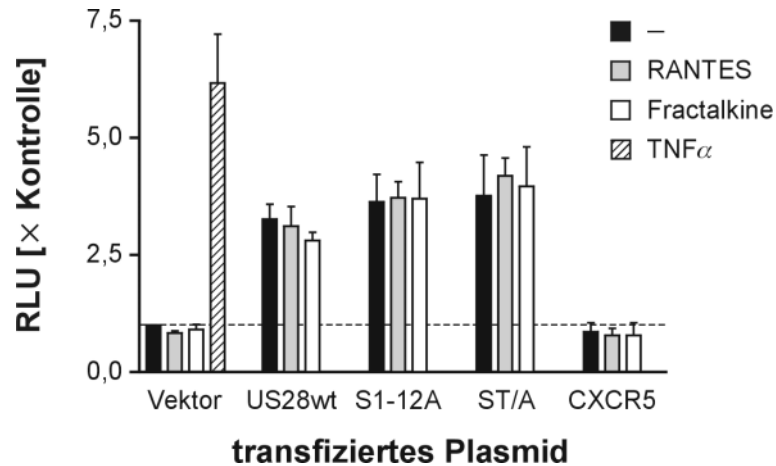


Abb. 4.18 Die konstitutive NF- κ B-Aktivierung ist bei nicht phosphorylierten US28-Varianten erhalten. Bestimmung der US28-abhängigen NF- κ B-Aktivität in einem Luziferase *reporter assay*. HEK293A Zellen wurden transient mit δ NF- κ Btkluc, pRL-TK und entweder US28, US28^{S1-12A}, US28^{ST/A}, CXCR5 oder pcDNA3.1(-) (Vektor) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit oder ohne TNF α (10 ng/ml), RANTES (10 nM) oder Fractalkine (100 nM) inkubiert. Nach sechs Stunden wurde die Luziferaseaktivität (RLU) als Maß für die NF- κ B-abhängige Luziferaseexpression in den Zellsolubilisaten bestimmt. Die Werte entsprechen der relativen Luziferaseaktivität bezogen auf unstimulierte, Vektor-transfizierte Zellen (Kontrolle). Angegeben sind Mittelwerte \pm S.D. von drei (Vektor, CXCR5) oder vier (US28 Varianten) unabhängigen Experimenten.

Phosphorylierung verantwortlich sind. Darüber hinaus wurde die gesamtzelluläre US28-Phosphorylierung bei keiner der getesteten US28-Varianten durch eine RANTES-Bindung verstärkt.

4.6 Bedeutung der US28-Phosphorylierung für die Signalleitung

4.6.1 NF- κ B wird unabhängig von der US28-Phosphorylierung aktiviert

Die transiente Expression von US28 in COS-7 Zellen führte zu einer konstitutiven, das heißt Liganden-unabhängigen Aktivierung von Phospholipase C und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B (Casarosa *et al.*, 2001). Dieser Effekt wurde teilweise durch das Chemokin Fractalkine (CX₃CL1) gehemmt. Um zu prüfen, ob die US28-induzierte NF- κ B-Aktivierung auf der Liganden-unabhängigen US28-Phosphorylierung beruht, wurde ein Luziferase-Reporter-Assay durchgeführt. Das Prinzip der Methode beruht auf dem Nachweis der Luziferase-

Aktivität als Reporter gen. Dabei steht die Expression der Luziferase auf dem Reporterplasmid (6NF- κ Btkluc.neo) unter der Kontrolle von sechs NF- κ B-Bindungsstellen (Bergmann *et al.*, 1998). Die Aktivierung von NF- κ B führt zur Bindung an den synthetischen Promotor auf dem Reporterplasmid, wodurch die Luziferase-Transkription und Translation ausgelöst wird. Die Höhe der Luziferaseaktivität dient dann als Maß für den Grad der NF- κ B-Aktivierung.

Das Reporterplasmid 6NF- κ Btkluc.neo wurde jeweils mit Plasmiden der US28-Wildtypsequenz oder der Phosphorylierungs-defizienten Varianten US28^{S1-12A} und US28^{ST/A} kotransfiziert. Als Negativkontrollen dienten entweder pcDNA3.1(-) sowie CXCR5. Verglichen mit den Negativkontrollen war in den US28wt exprimierenden Zellen eine etwa dreifach höhere NF- κ B-Aktivität feststellbar (Abb. 4.18), welche bei den Varianten US28^{S1-12A} und US28^{ST/A} ebenfalls nachzuweisen war. Weder bei dem US28wt, noch bei einer der Varianten wurde die NF- κ B-Aktivierung durch eine RANTES- oder Fractalkine-Stimulation statistisch signifikant verändert (Student *t*-Test). Die Beobachtungen zeigen, daß die US28-induzierte, konstitutive NF- κ B-Aktivierung nicht von der Rezeptorphosphorylierung abhängig ist.

4.6.2 US28 vermittelt die Aktivierung von ERK1, ERK2 und der p38-MAPK

US28 transfizierte Zellen binden spezifisch verschiedene CC-Chemokine, wie RANTES, MIP-1 α und MCP-1 (Gao und Murphy, 1994). Darüber hinaus führt die Stimulation des Rezeptors mit RANTES zu einer Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) 2 (Billstrom *et al.*, 1998). ERK2 gehört zu den Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Die MAPK-Familie umfasst neben ERK2 und ERK1 die p38-MAPK und die Stress aktivierten Proteinkinasen (SAPK), auch c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) genannt. Um zu prüfen, ob die US28-Phosphorylierung einen Einfluß auf die Liganden-abhängige Signalleitung hat, wurde zunächst detaillierter untersucht welche MAPK durch US28 aktiviert werden. Als Positivkontrolle für die RANTES-Stimulation diente der humane RANTES-Rezeptor CCR5, für den eine Aktivierung von MAPK bekannt war. Die Aktivierung von MAP-Kinasen verläuft über eine Phosphorylierung der Kinasen, die zu einer Translokation vom Cytoplasma in den Zellkern führt. Für die Untersuchung der MAPK-Aktivierung wurden daher Antikörper verwendet, die spezifisch für die phosphorylierten Formen der MAPK sind (Kap. 3.18.3).

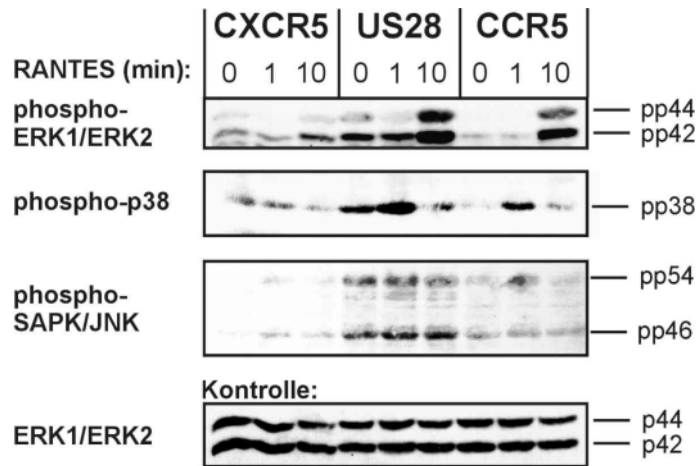


Abb. 4.19 US28 vermittelt die RANTES-abhängige Aktivierung von MAPK. Mit US28, CXCR5 oder CCR5 transfizierte HEK293A Zellen wurden 0, 1 und 10 Minuten mit RANTES (10 nM) stimuliert. Die Zellen wurden in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen, die Gesamtzellysate in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Phosphorylierung von ERK1, ERK2, p38 und SAPK/JNK in Immunblots analysiert. Anschließend wurden die phosphorylierungsspezifischen Nachweisantikörper von dem phospho-ERK1/ERK2 Immunblot entfernt und die Menge an ERK-Proteinen mit gesamt-ERK1/ERK2-spezifischen Antikörpern kontrolliert (Kontrolle). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

HEK293A Zellen wurden transient mit US28, CCR5 (Positivkontrolle) oder als Negativkontrolle mit CXCR5 transfiziert. Die Stimulation US28-exprimierender Zellen mit 10 nM RANTES induzierte nach 10 Minuten eine starke Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 (Abb. 4.19). Der Grad der Aktivierung und ihr zeitlicher Verlauf ist mit der CCR5 vermittelten ERK1/-2 Aktivierung, also der des humanen RANTES-Rezeptors, vergleichbar. Auch die p38-MAPK wird US28-vermittelt aktiviert. Sie wird jedoch sowohl durch US28, als auch durch CCR5 bereits nach 1 Minuten aktiviert und ist nach 10 Minuten wieder dephosphoryliert. Bei den SAPK konnte keine Liganden-induzierte Aktivierung festgestellt werden. Auffällig ist jedoch bei einem Vergleich der 0 Minuten-Werte aller Rezeptoren ein höheres basales Phosphorylierungsniveau der SAPK in US28 exprimierenden Zellen, was auch für die ERK1,-2 und p38-Kinasen zutrifft. Zur Kontrolle für die gleichmäßige Beladung aller Gelbahnen wurden die Nachweisantikörper von dem phospho-ERK1/ERK2 Immunblot entfernt und anschließend mit Antikörpern gefärbt, die alle ERK1/-2 Moleküle (phosphorylierte und dephosphorylierte) erkennen (Kap. 3.18.3). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß der US28-Rezeptor trotz seiner geringen Zelloberflächenexpression in der Lage ist, extrazelluläre Signale in die Aktivierung intrazellulärer Signalwege umzusetzen. Ferner konnte neben der RANTES-induzierten ERK2-Aktivierung auch die bisher nicht bekannte Aktivierung der

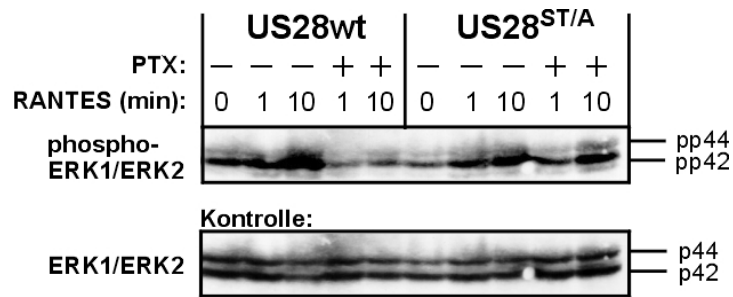


Abb. 4.20 Aktivierung von ERK1 und ERK2 durch US28wt und US28^{ST/A}. HEK293A Zellen wurden mit US28wt oder US28^{ST/A} transfiziert für 16 Stunden mit oder ohne Pertussistoxin (PTX, 100 ng/ml) inkubiert und für 0, 1 oder 10 Minuten mit RANTES (10 nM) stimuliert wie angegeben. Die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 wurde in Immunblots der Gesamtzelllysate mit phospho-ERK1/ERK2-spezifischen Antikörpern analysiert. Nach Entfernung der phospho-ERK1/ERK2-spezifischen Antikörper wurde die Menge an ERK-Proteinen mit gesamt-ERK-spezifischen Antikörpern kontrolliert (Kontrolle). Der gezeigte Immunblot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

MAP-Kinasen ERK1 und p38 gezeigt werden. Dabei wiesen US28 und humanes CCR5 vergleichbare Aktivierungs-Kinetiken auf.

4.6.3 Unterschiedliche Mechanismen der ERK-Aktivierung durch US28 und US28^{ST/A}

Wie gezeigt wurde, war die MAPK-Aktivierung im Gegensatz zur konstitutiven NF- κ B-Aktivierung von einer Liganden-Stimulation abhängig (Kap. 4.6.2 und Billstrom *et al.*, 1998). Die Aktivierung von MAPK durch GPCRs wird allgemein durch G-Proteine des $G\alpha_i$ - oder des $G\alpha_q$ -Typs vermittelt. Nur der $G\alpha_i$ -abhängige Weg kann durch Pertussistoxin gehemmt werden, wodurch zwischen einer $G\alpha_i$ - und $G\alpha_q$ -Kopplung der betreffenden GPCRs unterschieden werden kann. Für US28 wurde die Aktivierung von ERK2 über die Kopplung an $G\alpha_i$ - und $G\alpha_{16}$ -Proteine beschrieben (Billstrom *et al.*, 1998). Daneben erfolgte die Liganden-unabhängige Aktivierung von Phospholipase C über die Kopplung von US28 an $G\alpha_{q/11}$ -Proteine (Casarosa *et al.*, 2001).

Mit Hilfe des Nachweises der MAPK-Phosphorylierung in Immunblots wurde getestet, ob die Aktivierung von ERK1 und ERK2 von der US28-Phosphorylierung abhängig ist. Dazu wurden HEK293A Zellen entweder mit der US28-Wildtypsequenz oder mit der nicht phosphorylierten US28^{ST/A}-Variante transfiziert. Eine Stimulation mit 10 nM RANTES führte bei der US28^{ST/A}-Variante in gleichem Maße wie bei dem US28wt zu einer Aktivierung von

ERK1/2 (Abb. 4.20). Deshalb kann angenommen werden, daß die C-terminale Phosphorylierung von US28 keine notwendige Voraussetzung für eine RANTES-induzierte ERK1/2-Aktivierung ist. Die ERK1/2-Aktivierung durch den US28wt-Rezeptor war durch Pertussistoxin (PTX) hemmbar. Pertussistoxin von *Bordetella pertussis* ist für die ADP-Ribosylierung eines konservierten C-terminalen Cysteinrestes der $G\alpha_i$ -Familienmitglieder (außer $G\alpha_z$) verantwortlich. Diese irreversible Modifikation entkoppelt die $G\alpha_i$ -Proteine von ihren aktivierenden Rezeptoren und hemmt somit spezifisch die $G\alpha_i$ -abhängige Signalleitung (Ui und Katada, 1990, Morris und Malbon, 1999). Die Hemmbarkeit der US28wt-vermittelten ERK1/2-Aktivierung durch PTX deutet somit eine Kopplung des Rezeptors an $G\alpha_i$ -Proteine an. Diese Beobachtung stimmt mit bereits publizierten Daten bezüglich einer US28-abhängigen ERK2-Aktivierung in HEK293 Zellen überein (Billstrom *et al.*, 1998). Interessanterweise war die ERK1/2-Aktivierung durch die US28^{ST/A}-Variante unempfindlich gegenüber einer PTX-Hemmung, so daß für den nicht phosphorylierten US28-Rezeptor ein alternativer Weg der MAPK-Aktivierung, möglicherweise über die Kopplung an $G\alpha_{q/11}$ -Proteine gegeben zu sein scheint.

4.7 Die konstitutive US28-Phosphorylierung reguliert die Zelloberflächenexpression

Der native US28-Rezeptor war in transient transfizierten HEK293A Zellen kaum an der Zelloberfläche exprimiert, aber gehäuft in intrazellulären Organellen in der Peripherie des Zellkerns lokalisierbar (Kap. 4.3). Vergleichbare Beobachtungen wurden kürzlich für Fusionsproteine aus US28 und dem grün fluoreszierenden Protein oder der CD4-Ektodomäne in HeLa Zellen gemacht (Fraile-Ramos *et al.*, 2001). Eine Abnahme oder sogar der Verlust der Zelloberflächenexpression ist für eine große Anzahl von GPCRs nach einer Stimulation mit ihrem Liganden beschrieben worden. Diese Umverteilung von der Plasmamembran in intrazelluläre Vesikel ist die Folge einer Endozytose des Rezeptor-Liganden-Komplexes, der häufig durch eine GRK-abhängige Rezeptorphosphorylierung vermittelt wird (Ferguson, 2001). Da GRK2 in der Lage war den US28-Rezeptor zu phosphorylieren (Kap. 4.6.4), konnte vermutet werden, daß die hohe basale Phosphorylierung von US28 für die geringe Zelloberflächenexpression des Rezeptors verantwortlich ist.

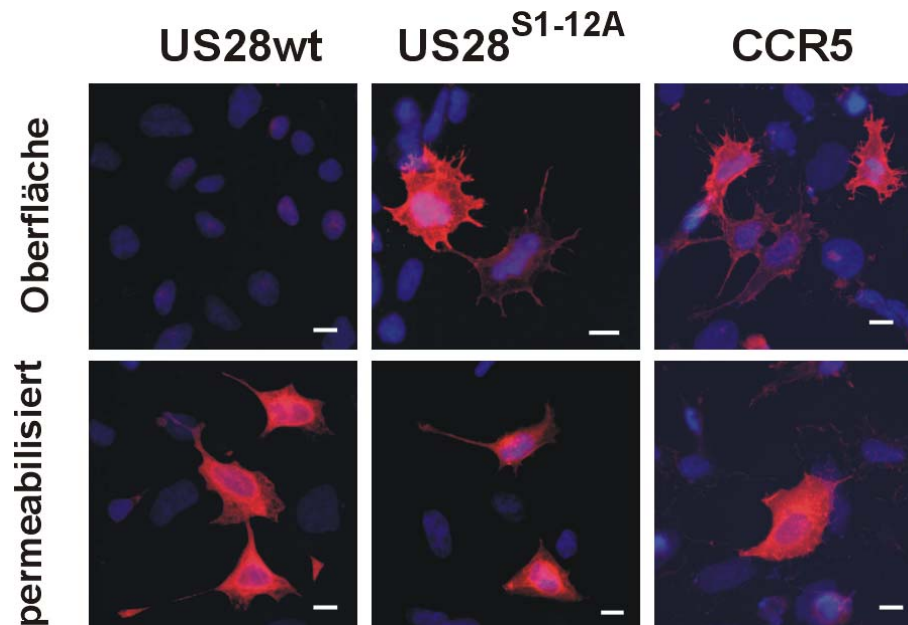


Abb. 4.21 Der nicht phosphorylierte US28^{S1-12A}-Rezeptor wird an der Zelloberfläche exprimiert. Immunfluoreszenzmikroskopie von US28, US28^{S1-12A} und FLAG-CCR5 transfizierter HEK293A Zellen. Die Immunfärbung von US28-Rezeptoren erfolgte 48 Stunden nach Transfektion mit dem mAk Tub-45, FLAG-CCR5 wurde mit dem mAk M2 und Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Expression an der Zelloberfläche wurde in intakten Zellen (Oberfläche), die gesamte zelluläre Expression nach Fixierung und Permeabilisierung (permeabilisiert) analysiert. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

HEK293A Zellen wurden mit der US28-Wildtypsequenz, der US28^{S1-12A}-Variante oder mit CCR5 transfiziert und anschließend in einer Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (Kap. 3.22). Im Gegensatz zu dem US28wt zeigte die US28^{S1-12A}-Variante in intakten Zellen eine charakteristische Zelloberflächenverteilung. Die Oberflächenexpression war der von CCR5 vergleichbar (Abb. 4.21). Nach einer Fixierung und Permeabilisierung der Zellen war die Überexpression aller Rezeptoren in intrazellulären Organellen nachweisbar. Somit konnte gezeigt werden, daß die hohe basale Phosphorylierung von US28 von wesentlicher Bedeutung für die geringe Zelloberflächenexpression in US28 überexprimierenden HEK293A Zellen war.

Um den Einfluß der unterschiedlichen C-terminalen Phosphorylierungsstellen auf die Oberflächenexpression von US28 detaillierter zu untersuchen, wurden durchflußzytometrische (FACS-) Analysen (Kap. 3.21) von allen Serin→Alanin Austauschvarianten durchgeführt. Hierzu wurden HEK293A Zellen mit den verschiedenen Plasmiden transfiziert und 48 Stunden später die Oberflächenexpression in lebenden Zellen und die gesamtzelluläre Expres-

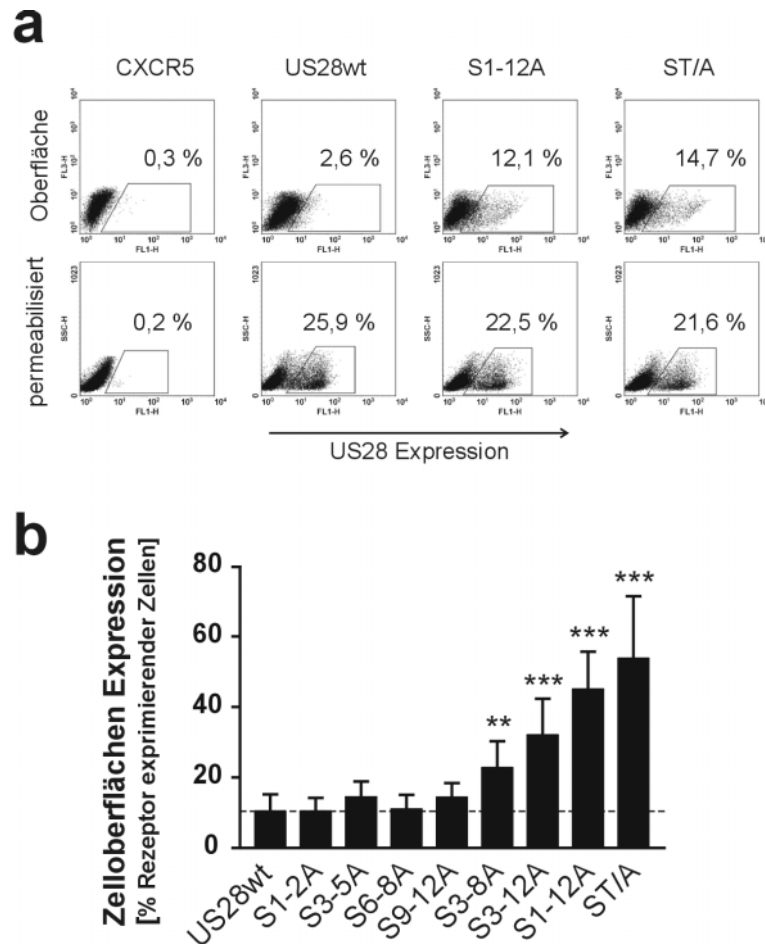


Abb. 4.22 Der Austausch aller C-terminaler Phosphorylierungsstellen bewirkt die Zelloberflächenexpression von US28. (a) HEK293A Zellen wurden mit US28, US28^{S1-12A}, US28^{ST/A} oder als Kontrolle mit CXCR5 transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die Rezeptorexpression an der Zelloberfläche von intakten Zellen (Oberfläche) und die gesamte zelluläre Rezeptorexpression nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen (permeabilisiert) bestimmt. Nach der Anfärbung von US28 mit dem mAk Tub-45 wurde die Rezeptorexpression in einem Durchflußzytometer analysiert. (b) Expressionsraten aller US28 Ser/Thr→Ala-Varianten an der Oberfläche transfizierter HEK293A Zellen. Die Expression der US28-Varianten an der Zelloberfläche und die gesamte zelluläre Expression wurden wie in (a) beschrieben mit einem Durchflußzytometer analysiert. Es ist angegeben bei wievielen der Rezeptor exprimierenden Zellen (permeabilisiert) eine Lokalisation an der Zelloberfläche (Oberfläche) nachgewiesen wurde (in %). Die Daten sind Mittelwerte ± S.D. von fünf unabhängigen Experimenten (drei bei US28^{ST/A}). ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001 verglichen mit dem US28wt.

sion in fixierten und permeabilisierten Zellen gemessen. Als Negativkontrolle dienten CXCR5 transfizierte Zellen. Wie Abb. 4.22a deutlich zeigt, war nur bei einem kleinen Anteil der US28wt transfizierten Zellen (2,6 %) eine Oberflächenexpression nachweisbar. Zudem gaben die positiven Zellen nur ein schwaches US28-Signal auf dem Fluoreszenzkanal 1 (FL1-H). Bei den US28-Varianten US28^{S1-12A} (12,1 %) und US28^{ST/A} (14,7 %) war demgegen-

über bei einem wesentlich größeren Anteil der Zellen eine US28 Oberflächenexpression zu beobachten. Ferner war die Intensität der Färbung stärker als bei dem US28wt, wodurch sich die positiven Zellpopulationen deutlicher in der Fluoreszenz 1 absetzten. Für die Vergleichbarkeit verschiedener Transfektionen wurde der Anteil der Zellen mit US28-Oberflächenexpression (Oberfläche) an allen US28-exprimierenden Zellen (permeabilisiert) in Prozenten angegeben. Die quantitative Auswertung von fünf unabhängigen Experimenten (drei bei US28^{ST/A}) ergab, daß die Eliminierung aller C-terminaler Phosphorylierungsstellen für eine maximale US28-Oberflächenexpression notwendig war (Abb. 4.22b). Der Austausch einzelner Phosphorylierungsstellen oder verschiedener Kombinationen bei US28^{S3-5A}, US28^{S6-8A} oder US28^{S9-12A} führte nicht zu einer statistisch signifikanten Veränderung der Oberflächenexpression (Student *t*-Test). Lediglich die US28^{S3-8A}-Variante hatte eine gegenüber dem US28wt erhöhte Zelloberflächenexpression, obwohl sie deutlich stärker phosphoryliert war (50 % des US28wt), als die US28^{S9-12A}-Variante (25 % des US28wt, s. Kap.4.6.6). Dies deutet an, daß bestimmten Phosphoserinresten eine besondere Rolle bei der Regulation der Oberflächenexpression zukommen könnte.

4.8 Biologische Halbwertszeit von US28 und US28-Varianten

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) können durch verschiedene Mechanismen einem proteolytischen Abbau unterliegen. Für einige GPCRs ist eine lysosomale Degradation nach erfolgter Endozytose beschrieben. Andere Rezeptoren können ohne Endozytose in nicht-lysosomalen Prozessen abgebaut werden, bevor sie oder nachdem sie die Zelloberfläche erreicht haben (Tsao *et al.*, 2001). Somit bestand die Möglichkeit, daß der US28wt-Rezeptor einer proteolytischen Degradation unterlag und deshalb nur in geringen Mengen an der Zelloberfläche nachweisbar war. Die Entfernung der carboxyterminalen Phosphorylierungsstellen von US28 konnte die Eigenschaften des Rezeptors in einer Weise verändert haben, die einen proteolytischen Abbau verhinderten oder verlangsamten, so daß es bei den Varianten zu einer Anreicherung des Rezeptors an der Zelloberfläche kommt. In diesem Fall wäre für die Phosphorylierungs-defizienten US28-Varianten verglichen mit dem US28wt eine längere Lebensdauer zu erwarten gewesen.

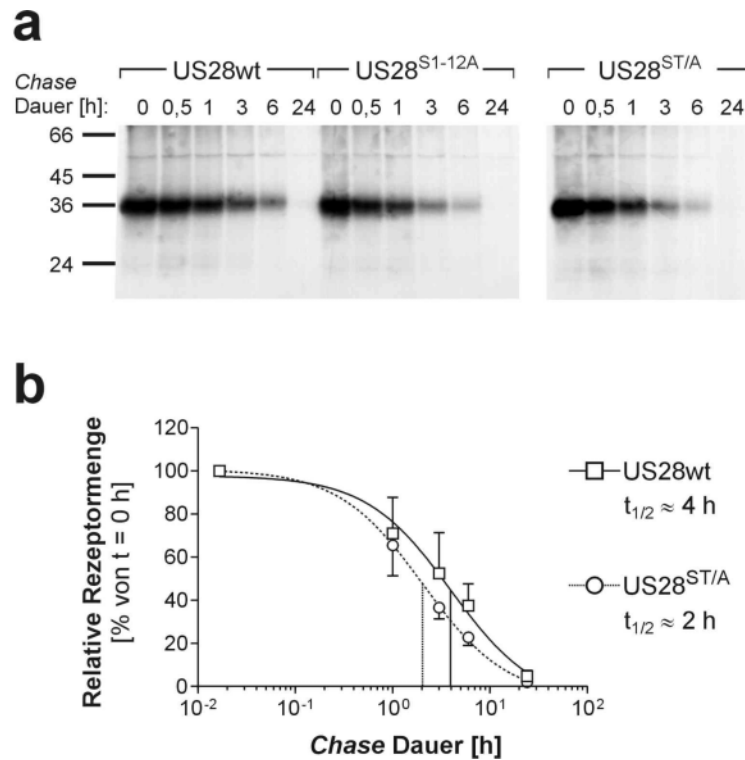


Abb. 4.23 Biologische Lebensdauer von US28, US28^{S1-12A} und US28^{ST/A} in transfizierten HEK293A Zellen. (a) 48 Stunden nach der Transfektion wurden 5×10^6 Zellen für 10 Minuten mit [³⁵S]Methionin/Cystein markiert und danach ohne [³⁵S]Methionin/Cystein bei 37 °C kultiviert. Nach den angegebenen Zeitintervallen (*Chase* Dauer) wurden die Rezeptoren aus den Zellsolubilisaten mit dem mAk Tub-45 immunpräzipitiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und in einer Autoradiographie analysiert. Die in der SDS-PAGE eingesetzten Probenmengen wurden entsprechend der zellulären Einbauraten von [³⁵S]Methionin/Cystein normalisiert. (b) Bestimmung der biologischen Halbwertszeit von US28 und US28^{ST/A}. Die Menge des [³⁵S]-markierten Rezeptors (aus 4.21a) wurde mit einem BAS 2000 *image analyzer* densitometrisch quantifiziert. Die Meßpunkte geben die prozentuale Abnahme der Rezeptormenge bezogen auf den Zeitpunkt $t=0$ (*Chase* Dauer) an. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm S.D. von zwei Experimenten. Die biologische Halbwertszeit entspricht dem „*Chase*-Zeitpunkt“ zu dem noch 50 % des zu Beginn (Zeitpunkt $t=0$) markierten Rezeptors nachweisbar sind.

Die Lebensdauer des US28wt und der Varianten US28^{S1-12A} und US28^{ST/A} wurde in sogenannten „*Pulse-Chase*“ Experimenten untersucht (Kap. 3.12.2). Mit US28wt, US28^{S1-12A} oder US28^{ST/A} transfizierte HEK293A Zellen wurden für zehn Minuten mit [³⁵S]Methionin/Cystein markiert (*pulse*). Anschließend wurden die Zellen für 0,5 bis 24 Stunden ohne radioaktive Aminosäuren weiterkultiviert (*chase*), die Rezeptoren wurden immunpräzipitiert und in einer Autoradiographie analysiert. In der Autoradiographie wurde nur der Rezeptor abgebildet, der zum Zeitpunkt der Pulsmarkierung synthetisiert wurde („*Chase*-

Zeitpunkt“ Null) und bis zum Zeitpunkt der Probennahme überdauerte („Chase-Dauer“). Daher konnte aus der Intensität der Proteinbanden die Lebensdauer der Rezeptoren bestimmt werden. Wie Abb. 4.23a zeigt, ist die Lebensdauer von US28^{S1-12A} oder US28^{ST/A} in transient transfizierten HEK293A Zellen nicht länger als die Lebensspanne des US28wt Rezeptors. Eine quantitative Analyse ergab für den Wildtyprezeptor eine biologische Halbwertszeit von $t_{1/2} \cong 4$ h und für die US28^{ST/A}-Variante von $t_{1/2} \cong 2$ h (Abb. 4.23b). Somit konnte ausgeschlossen werden, daß die erhöhte Oberflächenexpression der US28^{ST/A}-Variante durch eine Akkumulation des Rezeptors in der Zelle aufgrund einer längeren Lebensdauer verursacht wurde.

4.9 Die RANTES-Internalisierung wird durch die US28-Phosphorylierung reguliert

Für Fusionsproteine aus US28 und der CD4-Ektodomäne wurden kürzlich sowohl Liganden-abhängige, als auch konstitutive Endozytose und Rezyklisierung beschrieben (Fraile-Ramos *et al.*, 2001). Um zu überprüfen, welchen Einfluß die Rezeptorphosphorylierung auf die US28-Endozytose hat, wurden Internalisierungsexperimente mit dem US28wt und der Phosphorylierungs-defizienten Variante US28^{ST/A} durchgeführt. HEK293A Zellen wurden mit US28wt, US28^{ST/A} oder als Kontrolle für die unspezifische Ligandenaufnahme mit pcDNA3.1(-) transfiziert. Die Zellen wurden mit dem Radioliganden [¹²⁵I]RANTES inkubiert und anschließend wurde die Internalisierung des gebundenen Liganden für 0, 10 oder 60 Minuten bei 37 °C ermöglicht. Die Internalisierungsrate wurde schließlich aus dem prozentualen Anteil des aufgenommenen (intrazellulären) an dem insgesamt gebundenen Radioliganden bestimmt (Kap. 3.24). Bei dem US28wt Rezeptor konnte eine schnelle Internalisierung von [¹²⁵I]RANTES beobachtet werden. Bereits nach 10 Minuten waren 64 % des ursprünglich an der Zelloberfläche gebundenen [¹²⁵I]RANTES von den Zellen aufgenommen worden. Die maximale Internalisierung wurde nach 60 Minuten mit 80 % erreicht (Abb. 4.24). Im Gegensatz zum US28wt ist die US28^{ST/A}-vermittelte [¹²⁵I]RANTES-Internalisierung stark vermindert und verlangsamt. Bei US28^{ST/A} waren nach 10 Minuten lediglich 23 % des ursprünglich gebundenen Radioliganden aufgenommen und die Internalisierung erreichte nach 60 Minuten maximal 47 %. Demnach hängt die Endozytosekapazität des US28-Rezeptors wesentlich von

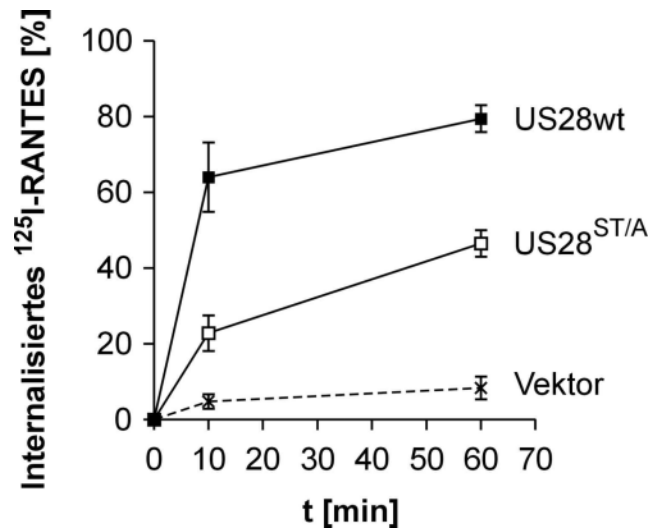


Abb. 4.24 Die US28-Phosphorylierung reguliert die US28-vermittelte Internalisierung von [¹²⁵I]RANTES. HEK293A Zellen wurden transient mit US28wt, US28^{ST/A} oder pcDNA3.1(-) (Vektor) transfiziert und 2 Stunden mit [¹²⁵I]RANTES (125 pM) bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und für 0, 10 und 60 Minuten auf 37 °C erwärmt. Die Hälfte der Ansätze wurde lysiert und die Aktivität bestimmt (gesamte zellassoziierte Aktivität). Bei der anderen Hälfte wurde das an der Zelloberfläche gebundene [¹²⁵I]RANTES durch Waschen mit saurem Medium entfernt, die Zellen lysiert und die Aktivität bestimmt (Säure-resistente Aktivität). Die Internalisierung wurde aus dem prozentualen Anteil der Säure-resistenten Aktivität (internalisiert) an der gesamten zellassoziierten Aktivität berechnet. Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert ± S.D. aus vier unabhängigen Experimenten.

der Rezeptorphosphorylierung ab. Die vorliegenden Daten zeigen, daß die geringe Zelloberflächenpräsenz von US28 (Kap. 4.8) und die schnelle Endozytose auf der hohen basalen Phosphorylierung des US28-Rezeptors (Kap. 4.5) beruhen.