

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität
Direktor: Prof. Dr. Detlef Schröder

Bindung von rekombinantem humanem RANTES
und NH₂-terminaler Modifikationen
an den Chemokinrezeptor CCR5
und an Zelloberflächen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jochen Pfirstinger
aus
München
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. D. Schlöndorff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Rupp
Priv. Doz. Dr. U. Wintergast

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Dr. M. Mack

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juni 2003

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....iv

1. Einleitung	1
1.1. Chemokine	1
1.2. Chemokinrezeptoren.....	2
1.3. RANTES	2
1.4. CCR5-Antagonisten.....	3
1.5. HIV-Infektion	3
1.6. Chemokine und Rekrutierung von Leukozyten.....	4
1.7. Immobilisierung von Chemokinen auf Zelloberflächen.....	4
1.8. Periplasmatische Expression	5
1.9. Zielsetzung der Arbeit	7
2. Material	8
2.1. Chemikalien.....	8
2.2. Medien, Lösungen und Puffer; Rezepte	10
2.2.1. Allgemeine Rezepte.....	10
2.2.2. Puffer für Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	10
2.2.3. Kultur- und Einfriermedien für Bakterien	11
2.2.4. Kultur- und Einfriermedien für eukaryontische Zellen	11
2.2.5. Lösungen und Puffer für funktionelle Tests.....	12
2.3. Einwegartikel.....	14
2.4. Enzyme und Reagenzienkits.....	14
2.5. Antikörper und Enzymkonjugate.....	14
2.6. Chemokine	15
2.7. Geräte.....	15
2.8. Sonstiges	15
2.9. Oligonukleotidprimer	16
3. Methoden.....	17
3.1. Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	17
3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
3.1.2. Auftrennung von Nukleinsäuren	17
3.1.3. Extraktion der Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen	18
3.1.4. Reinigung von Nukleinsäuren (Phenolextraktion)	18
3.1.5. Fällung von Nukleinsäuren.....	18
3.1.6. Spezifische Spaltung von doppelsträngiger DNA mit Restriktionsenzymen	18
3.1.7. Verknüpfung von DNA-Ketten durch T4-Ligase.....	19
3.1.8. Plasmidgewinnung aus E. coli (Midipräparation)	19
3.1.9. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	20
3.1.10. Sequenzierung	20

3.2. Herstellung, Reinigung und Quantifizierung von Proteinen	21
3.2.1. Herstellung kompetenter Bakterien.....	21
3.2.2. Transformation durch Elektroporation.....	21
3.2.3. Screening positiver Klone (PCR)	21
3.2.4. Periplasmatische Expression und Periplasma-Lyse	22
3.2.5. Reinigung mit Affinitätschromatographie	22
3.2.6. Konzentrationsbestimmung durch Enzyme-linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)	23
3.2.7. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
3.2.8. Western Blot Analyse.....	24
3.3. Funktionelle Tests	24
3.3.1. Zellkultur mit stabil transfizierten CHO-Zellen.....	24
3.3.2. Ficoll-Präparation von mononukleären Zellen (PBMCs)	25
3.3.3. Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	25
3.3.4. Auswertung der FACS-Daten	26
3.3.5. Protokolle für FACS-Analysen	28
3.3.6. Rezeptorinternalisierung	29
3.3.7. Rezeptorreycling.....	29
3.3.8. Chemokinrezeptorunabhängige Bindung auf Zelloberflächen	30
3.3.9. Messung der intrazellulären Calcium-Mobilisation	30
3.3.10. Radioaktive Markierung von Proteinen mit ^{125}I	34
3.3.11. Bindungs-Assay	36
3.3.12. Reinigung und Aktivierung von Thrombozyten	37
4. Ergebnisse	38
4.1. Entwicklung und Herstellung von NH ₂ -terminalen RANTES-Modifikationen.....	38
4.1.1. Primer-Design	39
4.1.2. Subklonierung der RANTES-Modifikationen	40
4.1.3. Periplasmatische Expression und Periplasmalyse.....	41
4.1.4. Reinigung mittels Affinitätschromatographie	41
4.1.5. Konzentrationsbestimmung mittels ELISA	42
4.1.6. Nachweis des rekombinanten Proteins in SDS-PAGE und Western Blot ..	44
4.2. Periplasmatisches RANTES-6His zeigt die gleiche Funktion wie RANTES ohne C-terminalen His-Tag aus anderen Expressionssystemen.....	45
4.2.1. Periplasmatisches RANTES mit und ohne C-terminalen His-Tag	45
4.2.2. CCR5 Internalisierung durch RANTES aus verschiedenen Expressionssystemen.....	46
4.2.3. CCR5 Recycling durch RANTES aus verschiedenen Expressionssystemen.....	47
4.2.4. Intrazelluläre Calcium-Mobilisation durch RANTES aus verschiedenen Expressionssystemen.....	48
4.2.5. Vergleich der Bindung an den Chemokinrezeptor CCR5 durch RANTES aus verschiedenen Expressionssystemen	50
4.2.6. Chemokinrezeptorunabhängige Bindung auf Zelloberflächen durch RANTES aus verschiedenen Expressionssystemen	52
4.3. Spezifische Bindung und Aktivierung von Chemokinrezeptoren durch RANTES und seine Modifikationen	54
4.3.1. Internalisierung und Recycling des Chemokinrezeptors CCR5 auf CCR5-überexprimierenden CHO Zellen.....	54
4.3.2. Internalisierung der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 auf PBMC.....	55

4.3.3.	Bindung der RANTES Modifikationen an den Chemokinrezeptor CCR5 auf überexprimierenden CHO Zellen	58
4.4.	CCR5 unabhängige RANTES Bindung an Zelloberflächen	61
4.4.1.	RANTES Bindung an die Oberfläche von Endothelzellen, PBMCs und CHO Zellen	61
4.4.2.	Humanes Serum verhindert die RANTES Bindung an Zelloberflächen.....	62
4.4.3.	Chondroitinsulfat A aus Thrombozyten bindet an RANTES	64
4.4.4.	Chondroitinsulfat A verhindert die RANTES Immobilisation an Zelloberflächen und blockiert die funktionelle Antwort auf RANTES	67
5.	Diskussion.....	70
6.	Zusammenfassung	77
7.	Literaturverzeichnis	79

Abkürzungsverzeichnis

α	anti-
A	Adenin
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulfonsäure-(6)]-diammoniumsalz
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Anzahl der Basenpaare einer DNA-Sequenz
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Cytosin
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CHO Zellen	Chinese hamster ovary cells
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxinukleotide
EDTA	Ethyldendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat
EGTA	Ethylenglycol-bis(b-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
μ F	mikro Farad (Kondensatorkapazität des BioRad E. coli Pulser)
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS (d)	Fetales Kälberserum (dialysiert)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat, FACS-Farbstoff
FSC	Forward scatter, Vorwärtsstreulicht bei der FACS-Analyse
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
G	Guanin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Horse reddish peroxidase = Rettichperoxidase
HT	Hybridisierungstemperatur von Oligonukleotidprimern
HWZ = T _½	Halbwertszeit
IC ₅₀	inhibitory concentration 50%; Maß für die Rezeptor Bindungs Affinität
IE = IU	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactoside
kb	kilo Basen einer DNA-Sequenz
kD	kilo Dalton, Molekulargewicht
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar (Mol/l)
MC1-5	monoklonale Maus anti hCCR5 Antikörper
OD	Optische Dichte
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	R-Phycoerythrin, FACS-Farbstoff
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumlaurylsulfat

SSC	Side scatter, Seitwärtsstreulicht bei der FACS-Analyse
STR	seven-transmembrane-receptor, Rezeptor mit sieben transmembranalen Domänen
T	Thymin
$T_{\frac{1}{2}} = HWZ$	Halbwertszeit
TBS	Tris buffered saline
TC	Tricolor, FACS-Farbstoff
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VL1-4	monoklonale Maus anti hRANTES Antikörper

1. Einleitung

1.1. Chemokine

Chemokine bilden eine große Familie kleiner chemotaktischer Zytokine [5]. Anhand der Position der ersten beiden Cysteine, die entweder durch eine Aminosäure voneinander getrennt sind oder direkt benachbart liegen, unterscheidet man zwei Unterfamilien, CXC- und CC-Chemokine (Tab. 1). Darüber hinaus gibt es ein Chemokin ohne benachbarte Cysteine (Lymphotaktin) [45] und ein CX₃C-Chemokin (Fractalkine) [8,77], bei dem drei Aminosäuren zwischen den Cysteinen liegen. Heute sind mehr als 50 Chemokine bekannt. Die meisten Chemokinsequenzen wurden aus cDNA abgeleitet, die Proteine mit einer Länge von 92 bis 125 Aminosäuren kodieren und dabei eine Startsequenz von 20 bis 25 Aminosäuren enthalten. Ihre molare Masse reicht meist von 7 bis 10 kD. Beim Menschen befinden sich die Gene der CXC-Chemokine auf Chromosom 4 und zeigen auf Aminosäurenebene eine Homologie von 20 bis 50 %, die der CC-Chemokine liegen auf Chromosom 17 mit einer Homologie von 28 bis 45 %. Mehrere Strukturanalysen haben gezeigt, daß die meisten Chemokine Dimere [19,52,81,94] bilden, die bei hoher Verdünnung dissoziieren.

Die für die Rezeptorbindung und Zellaktivierung verantwortlichen Domänen der Chemokine befinden sich in der Nähe des NH₂-Terminus [6,19,30,71]. Durch Austausch von Aminosäuren oder Verkürzen dieser Region erhält man Antagonisten, die weiter an den Rezeptor binden, aber den Rezeptor nicht mehr aktivieren.

Chemokine werden von vielen verschiedenen Zellen exprimiert, z.B. Monozyten, Alveolarmakrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Thrombozyten, Mastzellen, T-Lymphozyten, NK-Zellen, Keratozyten, Mesangialzellen, Epithelzellen, Hepatozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Mesothelzellen und Endothelzellen. Diese Zellen produzieren Chemokine als Antwort auf eine Vielzahl von Faktoren, wie z.B. Viren, bakterielle Produkte, IL-1, TNF, C5a, LTB4 und Interferone [83].

Rezeptor	Neue	Alte Nomenklatur	Liganden
α-Chemokine	CXCR1	IL-8R1 (Typ A)	IL-8
	CXCR2	IL-8R2 (Typ B)	IL-8, GRO α,β,γ , NAP-2, ENA78, GCP-2
	CXCR3	IP10/MigR	IP10, Mig
	CXCR4	LESTR, HUMSTR	SDF-1
β-Chemokine	CCR1	RANTES/MIP-1 α R	RANTES, MIP-1 α , MCP-2, MCP-3
	CCR2a/b	MCP-1R A/B	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4
	CCR3	EotaxinR, CC CKR3	Eotaxin, RANTES, MCP-3, MCP-4
	CCR4	CC CKR4	RANTES, MIP-1, MCP-1
	CCR5	CC CKR5	RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β

Tab. 1: Auswahl von Chemokinen und ihrer Rezeptoren (K_d von 0,1 bis 10 nM oder Calcium-Mobilisation bei < 10 nM) [5].

1.2. Chemokinrezeptoren

Chemokine vermitteln ihre Wirkung über Rezeptoren mit sieben transmembranalen Domänen (STR, seven-transmembrane-receptors) [63]. Der NH₂-Terminus dieser Rezeptoren befindet sich extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär. Die sieben Transmembran-Domänen enthalten vorwiegend hydrophobe Aminosäuren in α -Helix Struktur. Diese Domänen sind durch drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen verbunden, die aus hydrophilen Aminosäuren bestehen. Die erste und die zweite extrazelluläre Schleife sind laut Strukturmodell wahrscheinlich durch eine Disulfidbrücke verbunden.

Die Signaltransduktion der STR wird durch G-Proteine vermittelt. Wenn ein Ligand an den Rezeptor bindet und diesen aktiviert, wird in der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins ein GDP durch ein GTP ersetzt, was zur Aufspaltung des Trimmers in die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheit führt. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit ihrerseits aktiviert die Phospholipase C (PLC), woraus eine Akkumulation von IP₃ (Inositol-Triphosphat) und Diacylglycerol im Zytosol resultiert. Diese messenger induzieren eine intrazelluläre Calcium-Mobilisation und die Aktivierung der Proteinkinase C sowie der Phospholipase D (PLD). Die frühe PLC- und die späte PLD-Aktivierung werden für die sehr sensitive Migrationsantwort der Zellen entlang eines Chemokingradienten verantwortlich gemacht [63].

Die biologischen Effekte der Chemokine können gemessen werden mit Hilfe von Chemotaxis-Assays, Bestimmung der intrazellulären Calcium-Mobilisation und der Rezeptor-Internalisierung. Durch radioaktiv markiertes Chemokin kann mit Bindungs-Assays die Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche oder aber auch die Affinität von Chemokin-Modifikationen zum Rezeptor bestimmt werden.

1.3. RANTES

RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted), nach neuer Nomenklatur auch CCL5 genannt, ist ein stark basisches β -Chemokin mit einer Länge von 68 Aminosäuren und einem Gewicht von 8 kD. RANTES wirkt chemotaktisch auf Monozyten, auf eine Subpopulation der T-Lymphozyten, NK-Zellen, basophile und eosinophile Granulozyten und dendritische Zellen, die alle bei Entzündungsreaktionen eine Rolle

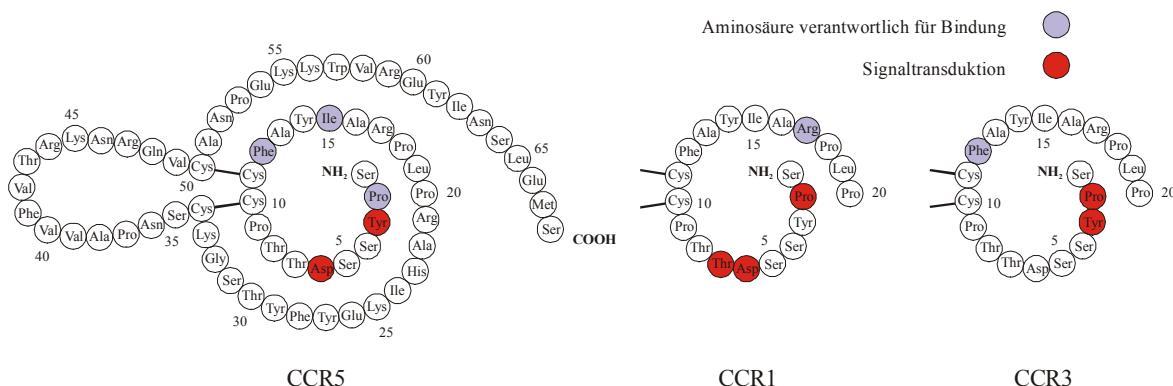


Abb. 1.1: Durch Ersetzen einzelner Aminosäuren von RANTES durch Alanin wurde gezeigt, welche Aminosäuren für die Bindung und für die Signaltransduktion über die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 verantwortlich sind [68].

spielen können [38]. Es bindet wie die anderen β -Chemokine an mehr als einen Rezeptor (Tab. 1). Die für die Bindung und Zellaktivierung wichtigen Gruppen der Aminosäuren liegen in der Nähe des NH₂-Terminus und im sogenannten N-Loop (Aminosäuren 12–20). Durch Ersetzen einzelner Aminosäuren durch Alanin wurde gezeigt, daß P2, F12 und I15 für die Bindung an CCR5 und Y3 und D6 für die Signaltransduktion über CCR5 verantwortlich sind [68]. R17 wird für die CCR1-Bindung, P2, D6 und T7 für die CCR1-Aktivierung benötigt. Die CCR3-Bindung erfolgt über F12, die CCR3-Aktivierung über P2 und Y3.

1.4. CCR5-Antagonisten

Bei den Chemokinen befinden sich die für die Bindung und Signaltransduktion wichtigen Aminosäuren in der Nähe des NH₂-Terminus [6,17,36]. Sowohl durch Verkürzen dieser Region um einige Aminosäuren als auch durch eine zusätzliche Aminosäure bzw. Pentan-Gruppe sind bereits Antagonisten gegen den Chemokinrezeptor CCR5 erzeugt worden.

Das um acht Aminosäuren verkürzte RANTES (9-68) bindet an THP-1 Promonozyten mit dem 4–6-fachen der Dissoziationskonstante von natürlichem RANTES, führt aber nicht zu meßbarer Chemotaxis oder Enzym-Freisetzung (N-Acetyl- β -D-glucosaminidase) aus Monozyten [30]. In genügend hoher Konzentration verhindert es die Bindung und Zellaktivierung durch RANTES. Allerdings wird die Rezeptorspezifität durch die Aminosäuren in der Nähe des NH₂-Terminus verändert, so daß eine Verkürzung dieser Region zusätzlich die Bindung an den Chemokinrezeptor CCR2 erlaubt.

Ein großer Teil des im bakteriellen Zytoplasma in „inclusion bodies“ exprimierten RANTES hat am NH₂-Terminus ein zusätzliches Methionin. Dieses Met-RANTES besitzt im Chemotaxis-Assay und bei der intrazellulären Calcium-Mobilisation keine agonistischen Fähigkeiten, ist aber ein äquipotenter Antagonist gegenüber der durch RANTES oder MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) ausgelösten Chemotaxis in der Promonozyten Zelllinie THP-1 und in T-Zellen. Bei der intrazellulären Calcium-Mobilisation sind die antagonistischen Effekte jedoch deutlich schwächer und abhängig vom Liganden RANTES oder MCP-1 [71].

Durch chemische Modifikation des NH₂-Terminus von RANTES wurde mit Aminoxy-pentan (AOP)-RANTES ein sehr wirkungsvoller Antagonist gegen die CCR5-Funktion und gegen die HIV-Infektion durch M-trope HIV-1 Virenstämme geschaffen [80]. Eine besondere Bedeutung bei der Verhinderung der HIV-Infektion erhält AOP-RANTES dadurch, daß es nach stärkerer Internalisierung im Vergleich zu RANTES vor allem zu einem wesentlich verzögerten Recycling von CCR5 kommt [58]. Der Zugang der HI-Viren ist also nicht wie bei anderen Antagonisten durch die sterische Behinderung der gp120-Bindung blockiert sondern durch Rezeptorinternalisierung, so daß CCR5 überhaupt nicht mehr auf der Zelloberfläche vorhanden ist.

1.5. HIV-Infektion

Die Infektion menschlicher Zellen mit HIV-1 erfordert über CD4 hinaus das Vorhandensein von Korezeptoren. Dabei hat sich gezeigt, daß die Makrophagen-tropen NSI (non syncytium inducing) Virenstämme den Chemokinrezeptor CCR5 [2,22,23,97] verwenden, während die Infektion durch T-Zell-trope SI (syncytium inducing) Virenstämme vor allem über CXCR4 und außerdem zum Teil auch über CCR5 erfolgen kann [27,79,97]. Zusätzlich können zumindest in vitro eine ganze Reihe von Chemokinrezeptoren, wie

beispielsweise CCR2 und CCR3, zu einem geringen Grad als Korezeptoren einiger Virenstämme dienen. Die zentrale Bedeutung von CCR5 für die HIV-Infektion ist auch daraus ersichtlich, daß für die Übertragung vorwiegend Makrophagen-trope NSI-Virenstämme verantwortlich zu sein scheinen, während die SI-Stämme erst im Verlauf der Erkrankung an Bedeutung gewinnen. Homozygote Träger eines defekten, auf der Zelloberfläche nicht mehr nachweisbaren Allels von CCR5 mit einer Deletion von 32 Nukleotiden ($\Delta 32$) sind offensichtlich vor der HIV-Infektion geschützt [26].

Die Virus-Replikation der NSI Viren wird durch die β -Chemokine RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , und MCP-2 abhängig von der Chemokinkonzentration um mehr als 90 % verringert [21,66]. Die Replikationshemmung erfordert dabei nur die Bindung von RANTES an die Zielzelle und nicht die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion und Aktivierung der Protein-Tyrosin-Kinase [66]. Allerdings ist zu erwarten, daß die chemotaktischen und zellaktivierenden Effekte dieser starken Entzündungsmediatoren Schwierigkeiten bereiten bei einer Therapie, die auf Überexpression oder Verabreichung von Chemokinen beruht.

Die Blockade des Chemokinrezeptors CCR5 durch Peptide, Antikörper oder kleinmolekulare Substanzen könnte die Bindung der Makrophagen-tropen HIV-1 Viren an ihren Korezeptor ohne signifikante Toxizität unterbinden [3]. Dies wird vor allem daraus ersichtlich, daß CCR5-defiziente Personen keinen offensichtlichen Phänotyp besitzen.

1.6. Chemokine und Rekrutierung von Leukozyten

Chemokine spielen eine bedeutende Rolle bei der spezifischen gerichteten Rekrutierung von Leukozyten. Der Prozeß der Leukozytenmigration kann in eine Reihe verschiedener Schritte aufgegliedert werden: Rollen der Leukozyten auf dem Endothel, feste Anhaftung, Spreading, Diapedese und Migration innerhalb des Gewebes [16]. Chemokine sind dabei auf verschiedenen Stufen entscheidend beteiligt. Als erstes induzieren sie die feste Adhäsion an das Endothel durch Aktivierung von Integrinen auf rollenden Leukozyten [15]. Als zweites vermittelt ein Chemokingradient die Diapedese und Extravasation von Leukozyten und lenkt deren Migration innerhalb des Gewebes. Es wurde diskutiert, daß mehr als ein Chemokin und/oder Chemokinrezeptor an diesen Schritten beteiligt ist. Zum Beispiel ist die Interaktion von RANTES mit CCR1 verantwortlich für die Chemokin-induzierte feste Adhäsion von Monozyten, während CCR5 zum Spreading von Leukozyten beiträgt [93].

1.7. Immobilisierung von Chemokinen auf Zelloberflächen

Die Chemokin-induzierte feste Adhäsion von rollenden Leukozyten setzt die Sequenzierung von Chemokinen und deren Präsentation auf der Oberfläche des Gefäßlumens von Blutgefäßen voraus [39,61,84]. Ungebundene Chemokine würden sofort im Blutstrom verdünnt werden. Chemokine werden auf der Zelloberfläche durch membrangebundene Glykosaminoglykane präsentiert [37,56,75,84]. Die Expression der Glykosaminoglykane auf Endothelzellen wird durch proinflammatorische Zytokine reguliert. CD44, ein Anker für Hyaluronat [64], wird durch IL-15, TNF- α und IL-1 β hochreguliert [25,62].

In Patienten mit rheumatoider Arthritis ist das Proteoglykan Heparansulfat auf dem Endothel stark exprimiert [85]. Abgesehen von Zelloberflächen [47] sind Glykosaminoglykane auch reichlich in der extrazellulären Matrix vorhanden [42]. Dadurch könnten Glykosaminoglykane die Ausbildung von haptotaktischen Gradienten immobilisierter Chemokine ermöglichen, die die gerichtete Migration von Leukozyten innerhalb des Gewebes steuern.

Die Immobilisierung von Chemokinen spielt auch eine Rolle bei der HIV Inhibierung durch RANTES, da die enzymatische Entfernung der Oberflächen-Glykosaminoglykane die Fähigkeit von RANTES reduziert, HIV zu unterdrücken [67]. Oberflächengebundenes Heparinsulfat ist der Bindungspartner von RANTES auf PM1 Zellen, einer humanen T Zell Linie. Im Gegensatz dazu bindet Chondroitinsulfat RANTES auf Monozyten. Man geht davon aus, daß die Immobilisierung von Chemokinen durch oberflächliche Glykosaminoglykane die lokale Konzentration der Chemokine erhöht und damit deren Interaktion mit ihren spezifischen Chemokinrezeptoren verstärkt [1,12,37].

Die Bindung von RANTES und anderen Chemokinen an der Zelloberfläche kann verhindert werden durch Präinkubation mit löslichen Glykosaminoglykanen. Lösliche Glykosaminoglykane scheinen also mit zellgebundenen Glykosaminoglykanen um die Bindung an Chemokine zu konkurrieren [48,51,56,84,92]. Im Fall von RANTES war die Reihenfolge der Bindungsstärke Heparin > Heparinsulfat > Chondroitinsulfat > Dermatansulfat [51]. Durch Mutagenese einzelner Aminosäuren und durch NH₂-terminale Verkürzung von RANTES und von MIP-1 β wurden die Bindungsstellen mit Glykosaminoglykanen erfasst [53,60,72]. Zusätzlich können lösliche Glykosaminoglykane auch die Interaktion von Chemokinen mit ihren spezifischen Rezeptoren beeinflussen. Lösliche Glykosaminoglykane inhibieren die Bindung von IL-8 (CXCL8) an CXCR1 und CXCR2 und die Bindung von MIP-1 α (CCL3) an CCR1 [51]. Interessanterweise blockiert Heparin den Calcium-Einstrom in CCR5 positive Zellen, die mit RANTES stimuliert wurden, blockiert aber nicht die Bindung von RANTES an CCR5 [13]. Überdies verhindern Komplexe aus RANTES und Heparansulfat die HIV-Infektion effektiver als RANTES alleine [13,90]. Zusätzlich zu den Glykosaminoglykanen unterbindet das virale Chemokin-bindende Protein M-T1 die Bindung von CC-Chemokinen an die dazugehörigen Chemokinrezeptoren und beeinflusst auch die Interaktion der Chemokine mit Glykosaminoglykanen [78].

1.8. Periplasmatische Expression

Zur Erzeugung von korrekt gefalteten Proteinen können verschiedene Expressionssysteme eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression im periplasmatischen Raum von *E. coli* verwendet [10,41,57]. Dort können sich Disulfidbrücken ausbilden und kleine Proteine in ihrer korrekten Faltung mit einer Ausbeute von einigen 100 µg aus einer Liter-Kultur gewonnen werden.

Andere üblicherweise für die Chemokinexpression verwendete Systeme haben mehrere Nachteile. Durch bakterielle Expression im Zytoplasma von *E. coli* [9,70] lassen sich große Proteinmengen in der Größenordnung von Gramm aus einer Liter-Kultur erzeugen. Allerdings entsteht dabei ein Protein mit einem zusätzlichen Methionin am NH₂-Terminus [71], das außerdem durch ein aufwendiges „Faltungs-Protokoll“ in die korrekte Konformation übergeführt werden muß, da im bakteriellen Zytoplasma die benötigten Enzyme zur Ausbildung von Disulfidbrücken fehlen. Diese Faltung wird auch für chemisch synthetisierte Chemokine benötigt [17]. Bei eukaryontischer Expression entstehen korrekt gefaltete Proteine, aber mit einer nur sehr geringen Ausbeute. Außerdem unterliegen diese sezernierten Chemokine der Proteolyse. Im Fall von RANTES, das in CHO-Zellen exprimiert wurde, fehlten einem großen Anteil der Proteine die ersten zwei oder drei NH₂-terminalen Aminosäuren.

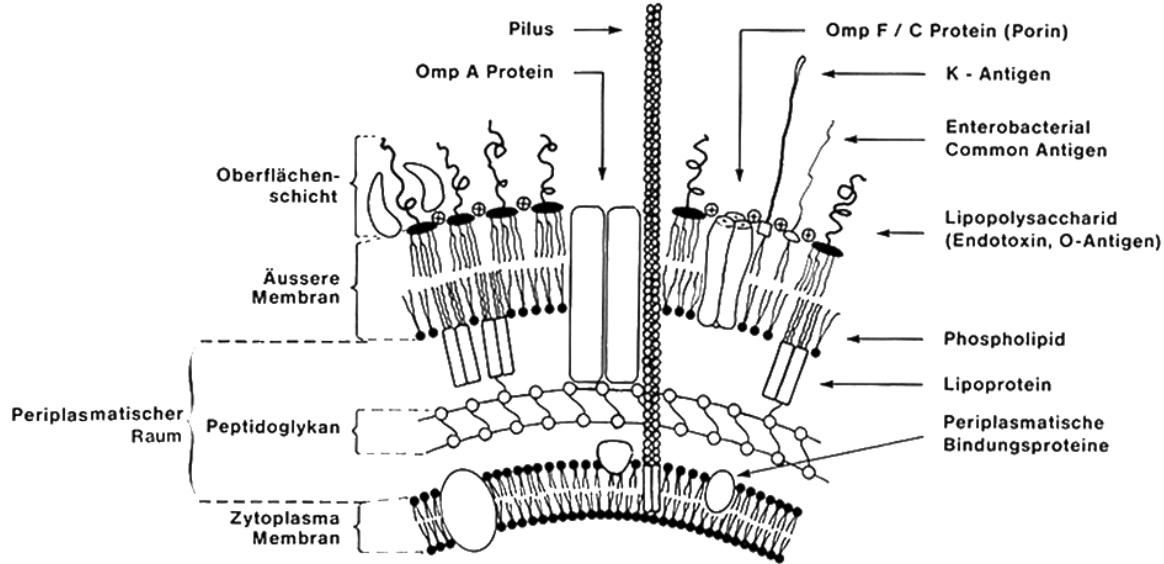


Abb. 1.2: Darstellung der inneren und äußenen Membran und des periplasmatischen Spalts von gramnegativen Bakterien [35]. Die Signalsequenz des OmpA Proteins wird bei der periplasmatischen Expression dazu benutzt, das exprimierte Protein durch die innere Bakterienmembran hindurch in den periplasmatischen Spalt zu schleusen.

Der Vektor für die Protein-Expression im periplasmatischen Spalt von *E. coli* [57] enthält einen lac Promotor, der durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside) induziert werden kann. Die Translation beginnt mit der OmpA Signalsequenz des "outer membrane protein A" von *E. coli*, gefolgt von der Chemokin cDNA. Die Signalsequenz führt zur Sekretion des Proteins in das Periplasma. Dort wird sie von bakteriellen Enzymen entfernt, übrig bleibt die gewünschte Aminosäuresequenz des Chemokins. Das oxidierende Milieu im periplasmatischen Spalt ermöglicht die Ausbildung von Disulfidbrücken, unterstützt durch Chaperone, nur im Periplasma vorhandener bakterieller Enzyme, die die Aggregation unterdrücken und die korrekte Faltung der Proteine unterstützen [7].



*Abb. 1.3: Vektor für die Protein Expression im periplasmatischen Spalt von *E. coli*. Die Expression wird über einen durch IPTG induzierbaren lac Promotor gesteuert. SD ist die Shine-Dalgarno Sequenz, OmpA ist die Signalsequenz des "outer membrane protein A" von *E. coli*, gefolgt von der RANTES cDNA.*

Durch selektive Zerstörung der äußenen Bakterienmembran werden die Proteine des periplasmatischen Raumes freigesetzt, während ein großer Teil der bakteriellen Enzyme im Zytoplasma eingeschlossen bleibt und durch Abzentrifugieren leicht entfernt werden kann. Da die gewonnenen Chemokine durch Proteaseaktivität in kurzer Zeit degradiert würden, muß der Periplasmaüberstand gereinigt werden. In der vorliegenden Arbeit enthielten die Chemokine einen zusätzlichen C-terminalen 6xHis-Tag. Die Reinigung kann dann in einem einzigen Schritt über Affinitätschromatographie mit einem Ni-NTA Agarose Gel (QIAGEN GmbH, Deutschland) durchgeführt werden. Die Elution erfolgt mit Hilfe eines pH Stufengradienten.

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wechselwirkung von RANTES mit dem Chemokinrezeptor CCR5 und mit der RANTES-Präsentation auf Zelloberflächen. Dazu wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Kann funktionsfähiges Chemokin im periplasmatischen Raum von E.coli exprimiert werden?
2. Kann mittels NH₂-terminaler RANTES Modifikationen der Chemokinrezeptor CCR5 blockiert werden? Gibt es insbesondere eine Modifikation, die
 - a) bei ungestörter CCR5-Internalisierung das CCR5-Recycling blockiert (Abb. 1.4 A - und ✗) und damit die Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche deutlich reduziert?
 - b) an CCR5 bindet, ohne eine Rezeptorinternalisierung und Zellaktivierung zu bewirken (Abb. 1.4 A +)?
3. Gibt es geeignete Linker-Strukturen (Abb. 1.4 A †), um in einer folgenden Arbeit ein Fusionsprotein aus einem CD4-Antagonisten und RANTES als C-terminalem Partner zu erzeugen, um die beiden für die HIV-Infektion verantwortlichen Rezeptoren CD4 und CCR5 simultan zu blockieren?
4. Gibt es im Serum RANTES-bindende Moleküle, die unter physiologischen Bedingungen freigesetzt werden und die Chemokin-Präsentation (Abb. 1.4 B ●) auf Zelloberflächen kontrollieren, um eine ungewollte Rekrutierung von Leukozyten zu verhindern?

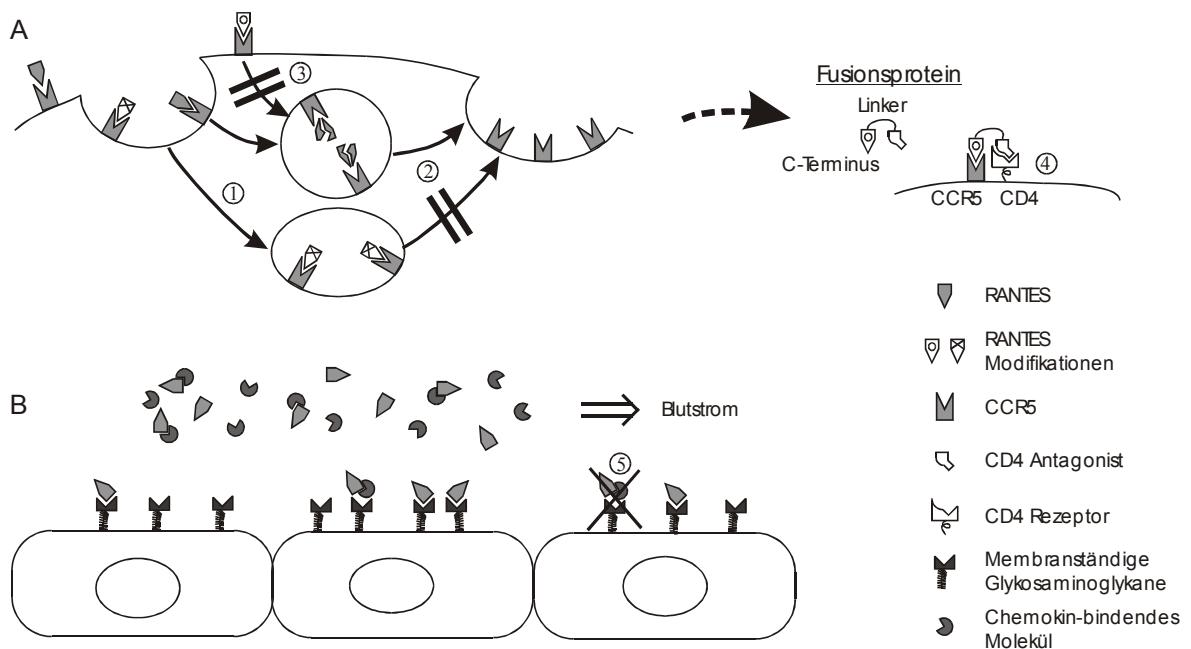


Abb. 1.4: Zielsetzung der Arbeit (siehe Text).

Alle zu untersuchenden Fragestellungen dienen dabei dem Gesamtziel der Generierung von Reagenzien, um das System aus RANTES und dem Chemokinrezeptor CCR5 genauer zu charakterisieren und zu beeinflussen.

2. Material

2.1. Chemikalien

Material	Firma
ABTS	Boehringer Mannheim GmbH
Aceton	Merck, Darmstadt
APS (Ammoniumpersulfat)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Agarose, ultra pure	Life Technologies, Paisley, Scotland
Agarose (low melting)	FMC BioProducts, Rockland, ME
Ampicillin	Boehringer Mannheim GmbH
Apuryrase	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
Aspirin	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
Azid (Sodium Azide)	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
Bacto TM Agar	Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA
Borsäure	Fluka Chemika, Buchs, CH
Bromphenolblau Na-Salz	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
BSA (Bovine Serum Albumine Fraction V)	Boehringer Mannheim GmbH
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloramin T Trihydrat	Merck, Darmstadt
Chondroitinsulfat A	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
Coomassie Brilliant Blue R 250	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
DMSO Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
1 kb DNA Ladder	Life Technologies, Paisley, Scotland
Ultrapure dNTP Set	Pharmacia Biotech
ECL TM Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
EDTA Tittriplex III	Merck, Darmstadt
Ethylenedinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat	Merck, Darmstadt
EGTA	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(b-aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraessigsäure	Merck, Darmstadt
Eisessig (Essigsäure 100%)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
FCS (fetal calf serum)	Bio Whittaker
FCS dialysiert	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Fibronectin (pure)	Boehringer Mannheim GmbH
Ficoll Separating Solution	Biochrom KG, Berlin
FURA PE3 (AM)	MoBiTec GmbH, Göttingen
Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamat	Merck, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Glycogen	Merck, Darmstadt
HCl rauchend 37%	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium 25000 IE/ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Imidazol	Merck, Darmstadt

¹²⁵ Iod	Amersham International plc, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
Ionomycin	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactoside)	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kollagen	Nycomed, Ismaning
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mangan(II)-chlorid Dihydrat	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Methotrexat	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
Mid-range Protein Molecular Weight Markers, 14,4-97,4 kD	Promega Corporation, Madison, WI
Natriumacetat Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdisulfit	Merck, Darmstadt
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Na-Nitroprussid (Sodium Pentacyanonitrosylferrate (III))	J.T.Baker B.V., Deventer, Holland
Natriumpyruvat MEM 100 MM	Life Technologies, Paisley, Scotland
Ni-NTA Agarose	QIAGEN GmbH, Hilden
o-Dianisidin	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml – 10000 mg/ml)	Life Technologies, Paisley, Scotland
Phenol	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Phenol/Chloroform	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Pluronic F-127	Calbiochem, La Jolla, CA
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Thrombin	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
Tryptone Peptone	Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA
Tween 20	Fluka Chemika, Buchs, CH
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
Xylencyanol	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Yeast Extract	Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.2. Medien, Lösungen und Puffer; Rezepte

FACS Flow	Becton Dickinson
FACS Rinse	Becton Dickinson
FACS Safe	Becton Dickinson
HBSS Hanks' Balanced Salts	Life Technologies, Paisley, Scotland
HEPES Buffer Solution 1 M	Life Technologies, Paisley, Scotland
MEM Alpha Medium with Glutamax I	Life Technologies, Paisley, Scotland
NaCl 0,9 Infusionslösung	Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen
PBS Dulbecco's	Life Technologies, Paisley, Scotland
RPMI 1640 Medium with Glutamax I	Life Technologies, Paisley, Scotland

2.2.1. Allgemeine Rezepte

10x PBS	80 g NaCl 2,0 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O 2,0 g KH ₂ PO ₄ add 1 l H ₂ O dest. pH 7,4 HCl
PBS Tween	500 ml PBS 250 µl Tween 20

2.2.2. Puffer für Arbeiten mit Nukleinsäuren

50x TAE	242 g TRIS 57,5 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 add 1 l H ₂ O dest.
10x TBE	540 g TRIS 275 g Borsäure 200 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 add 5 l H ₂ O dest.
10x DNA Auftragspuffer	2 ml Ficoll 400 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 10 mg Bromphenolblau 10 mg Xylencyanol add 10 ml H ₂ O dest.
TE Puffer	10 mM Tris pH8,0 2 mM EDTA

2.2.3. Kultur- und Einfriermedien für Bakterien

LB Medium	10 g NaCl 10 g Tryptone Peptone 5 g Yeast Extract add 1 l H ₂ O dest. pH 7,2 NaOH
LB Agar Platten	250 ml 2x LB Medium 250 ml 3% Bacto Agar
10x Einfriermedium für Bakterien	18 g KH ₂ PO ₄ (wasserfrei) 4,5 g Na-Citrat 0,9 g MgSO ₄ *7H ₂ O 9 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 80 g K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O 440 g Glycerin add 1 l H ₂ O
SOC Medium	20 g Tryptone Peptone 5 g Yeast Extract 0,5 g NaCl 10 ml 250 mM KCl 5 ml 2 M MgCl ₂ 20 ml 1 M Glukose add 1 l H ₂ O dest. pH 7,0 5 N NaOH

2.2.4. Kultur- und Einfriermedien für eukaryontische Zellen

CHO Kulturmedium	500 ml MEM Alpha 50 ml FCS dialysiert, hitzeinaktiviert 5,5 ml Penicillin / Streptomycin (10000 IU/ml – 10000 UG/ml)
PBMC Kulturmedium	500 ml RPMI 50 ml FCS hitzeinaktiviert 5,5 ml Penicillin / Streptomycin
2x Einfriermedium für eukaryontische Zellen	40 ml MEM Alpha 40 ml FCS hitzeinaktiviert 20 ml DMSO
Ablösen adhärenter Zellen	500 ml PBS 1,5 mM EDTA

2.2.5. Lösungen und Puffer für funktionelle Tests

Puffer für die Proteinreinigung mit Affinitätschromatographie

Sonication Buffer	17,5	g	NaCl
	4,5	g	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O
	3,5	g	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O
	add 1	l	H ₂ O dest.
	pH 8,1		NaOH
Elution Buffer A	17,5	g	NaCl
	4,5	g	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O
	3,5	g	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O
	add 1	l	H ₂ O dest.
	pH 7,0		HCl
Elution Buffer B	17,5	g	NaCl
	4,5	g	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O
	3,5	g	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O
	add 1	l	H ₂ O dest.
	pH 3,5		HCl
BBS	0,2	M	Natriumborat
	0,16	M	NaCl
	pH 8,0		HCl

SDS-PAGE und Western Blot

5x Protein Auftragspuffer reduzierend	10,4	ml	1,5 M TRIS / HCl pH 6,8
	12,5	ml	25% SDS
	12,5	ml	Glycerin
	15	ml	β-Mercaptoethanol
	add 100	ml	H ₂ O dest.
5x Protein Auftragspuffer nicht reduzierend	10,4	ml	1,5 M TRIS / HCl pH 6,8
	12,5	ml	25% SDS
	12,5	ml	Glycerin
	add 100	ml	H ₂ O dest.
	Spatelspitze		Bromphenolblau
SDS PAGE Separating Gel	15%	12,5%	10%
	10	8,5	6,7 ml Rotiphorese Gel 30
	5,0	5,0	5,0 ml 1,5M TRIS pH 8,8
	200	200	200 µl 10% SDS
			add 20 ml H ₂ O dest.
	120	120	120 µl Ammoniumpersulfat 10%
	30	30	30 µl TEMED

SDS PAGE Stacking Gel	4%
	1,35 ml Rotiphorese Gel 30
	2,5 ml 0,5M TRIS pH 6,8
	100 µl 10% SDS
	add 10 ml H ₂ O dest.
	50 µl Ammoniumpersulfat 10%
	12 µl TEMED
SDS PAGE Laufpuffer	6 g TRIS
	28,8 g Glycin
	20 ml 10% SDS
	add 2 l H ₂ O dest.
	pH 8,8
Western Blot Blotting Buffer	15,2 g TRIS
	14,4 g Glycin
	1000 ml Methanol
	add 5 l H ₂ O dest.
	pH 8
Coomassie Färbelösung	450 ml Methanol
	100 ml Eisessig
	2,5 g Coomassie Brilliant Blue R 250
	add 1 l H ₂ O dest.
Entfärbelösung	450 ml Methanol
	100 ml Eisessig
	add 1 l H ₂ O dest.
TBS	30,3 g TRIS (0,05 M)
	44,0 g NaCl (0,15 M)
	add 5 l H ₂ O dest.
TBS Tween	500 ml TBS
	250 µl Tween 20

Puffer zur Messung der intrazellulären Calcium-Mobilisation

Inkubationspuffer Ca-Fluß	500 ml RPMI 10mM tissue culture grade HEPES 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin 50 µM β-Mercaptoethanol 5 ml FCS pH 6,8
Wasch- und Meß-Puffer Ca-Fluß	500 ml HBSS 10mM tissue culture grade HEPES 2 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂

2.3. Einwegartikel

Cryotube 1,8 ml für Zellkultur	Nalge Nunc International, USA
Elektroporationsküvetten, 4 mm	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Eppendorf Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Greiner Labortechnik
Falcon-(PP) Röhrchen 15/50 ml	Greiner Labortechnik
Flow-Count Fluorospheres	Coulter Corporation, Miami
Gewebekulturflaschen mit Filter 250ml	Greiner Labortechnik
600ml	Nalge Nunc International, USA
Gewebekulturschalen, steril	Greiner Labortechnik
Immobilon™-P (pore size 0,45µm)	Millipore Corporation, Bedford, MA
Plastibrand Einmal-Küvetten	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
PS-Tube, conical, 4,5 ml, 12,0/75 mm	Greiner Labortechnik
Sephadex G25 M	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
96 well NUNC Maxisorp Immuno Plates	Nunc Immunotech, USA
96 well plates Rundboden für Zellkultur	Greiner Labortechnik (Costar Corning, NY)
Whatmann 3-MM Papier	Schleicher & Schuell, Dassel

2.4. Enzyme und Reagenzienkits

Chondroitinase ABC	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
DNA Sequencing Kit	PE Applied Biosystems, Foster City, CA
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction	
Heparinase	Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK
QIAfilter Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Restriktionsenzym Sal I	Boehringer Mannheim
Boehringer Buffer H	
Restriktionsenzym Fsp I	New England Biolabs, USA
Neb 4 Buffer	
Polymerase Ampli Taq 5 IU/µl	Perkin Elmer
10x PCR-Buffer	
Polymerase Pfu 2,5 IU/µl	New England Biolabs, USA
cloned Pfu-Buffer 10x	
T4 DNA Ligase 400000 IU/µl	New England Biolabs, USA
T4 DNA Ligase Buffer	

2.5. Antikörper und Enzymkonjugate

Kaninchen α Maus F(ab) ₂ – HRP	DAKO Nr. P0260
Kaninchen α Maus F(ab) ₂ – FITC	DAKO Nr. F0313
Kaninchen α Maus F(ab) ₂ – PE	DAKO Nr. R0439
Maus α hRANTES	VL1-4, PD Dr. P. Nelson, Med. Poliklinik
Maus α hCCR5	MC1-5, Dr. K. Wagner, Med. Poliklinik
Maus α hCCR1	R&D Systems, Minneapolis
Maus α hCCR2	R&D Systems, Minneapolis
His-Tag	Dianova GmbH, Hamburg
Maus IgG Isotypen	Sigma-Aldrich Co. Ltd., Irvine, UK

2.6. Chemokine

synth. RANTES
AOP-RANTES
Met-RANTES
eukaryontisches RANTES
IL-1 β
Serono Pharmaceutical Research Inst., Genf
Serono Pharmaceutical Research Inst., Genf
Serono Pharmaceutical Research Inst., Genf
PD Dr. M. Mack, Med. Poliklinik
PeproTech Ltd., London, UK

2.7. Geräte

2.8. Sonstiges

E. coli Stamm JM83 PD Dr. M. Mack, Med. Poliklinik
CHO Zellen untransfiziert, PD Dr. M. Mack, Med. Poliklinik
bzw. transfiziert mit hCCR2, hCCR5, hCXCR4
MonoMac 6 Zellen
OA-Vektor PD Dr. M. Mack, Med. Poliklinik

2.9. Oligonukleotidprimer

5' Primer

1 Leu-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	CTT TCC CCA TAT TCC TCG GAC ACC
2 Ile-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	ATA TCC CCA TAT TCC TCG GAC ACC
3 Lys-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	AAG TCC CCA TAT TCC TCG GAC ACC
4 Glu-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	GAA TCC CCA TAT TCC TCG GAC ACC
5 Gln-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	CAA TCC CCA TAT TCC TCG GAC ACC
6 Ile-Gly-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	ATA GGA TCC CCA TAT TCC TCG GAC ACC
7 RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	TCC CCA TAT TCC TCG GAC ACC
8 Δ2-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	TAT TCC TCG GAC ACC ACA CC
9 Δ3-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	TCC TCG GAC ACC ACA CC
10 Ile-Ile-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	ATA ATA TCC CCA TAT TCC TCG GAC AC
11 Ile-Pro-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	ATA CCG TCC CCA TAT TCC TCG GAC AC
12 Phe-Gly-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	TTC GGA TCC CCA TAT TCC TCG GAC AC
13 Met-Gly-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	ATG GGA TCC CCA TAT TCC TCG GAC AC
14 Ile-Gly-Gly-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	ATA GGA GGA TCC CCA TAT TCC TCG GAC AC
15 Ile-Gly-Δ2-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	ATA GGA TAT TCC TCG GAC ACC ACA CC
16 Phe-Gly-Δ2-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	TTC GGA TAT TCC TCG GAC ACC ACA CC
17 Met-Gly-Δ2-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	ATG GGA TAT TCC TCG GAC ACC
18 Tyr-Ser-Ser-Δ2-RANTES	AAA TGC GCA GGCC.....	TAC ACT TCA TAT TCC TCG GAC ACC ACA CC
19 Tyr-Ser-Ser-Asp-Gly-GlyΔ2-RANTES	AAA TGC GCA GGCC	TAC ACT TCA GAT GGT GGC TAT TCC TCG GAC ACC ACA CC

3' Primer

A RANTES-6His-Sal	GCC GTC GAC TAG TGA TGG TGA TGG CTC ATC TCC AAA GAG TTG ATG
B RANTES-Sal	GCC GTC GAC TAG CTC ATC TCC AAA GAG TTG ATG
C RANTES-6His-1Cys-Sal	GCC GTC GAC TAA CAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG C
D RANTES-6His-3Cys-Sal	GCC GTC GAC TAA CAA CAA CAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG C

3. Methoden

3.1. Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in der vorliegenden Arbeit zur Subklonierung von modifizierter RANTES-DNA und deren Amplifikation eingesetzt. Als Template für jeden Zyklus diente dabei eine cDNA-Vorlage von unmodifiziertem RANTES. Außerdem erfolgte das Screening positiver Bakterienklone nach Transformation mittels PCR.

Ein Zyklus besteht aus der Template-Denaturierung bei 95°C, wodurch es zur Einzelstrangbildung kommt, dem Primer-Annealing bei einer von der Primer-Länge abhängigen Temperatur und der Kettenverlängerung bei der optimalen Enzymtemperatur der entsprechenden Polymerase (72°C für Taq und 75°C für Pfu). Die Oligonukleotidprimer (siehe 2.9.) wurden so gewählt, daß sich jeweils eine errechnete Hybridisierungstemperatur $HT = (\text{Anzahl von C und G}) * 4^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von A und T}) * 2^\circ\text{C} - 5^\circ\text{C} = 52^\circ\text{C}$ ergab.

Zur Herstellung neuer RANTES-Modifikationen wurde wegen der inhärenten Fehlerkorrekturfunktion und damit einer erheblich niedrigeren Fehlerrate die Pfu-Polymerase verwendet. Zum Screening von Bakterienklonen wurde die Taq-Polymerase eingesetzt. Ebenso kam sie bei der Herstellung von Modifikationen mit langen überhängenden Primern erfolgreich zum Einsatz, bei denen mit der Pfu-Polymerase keine adäquate Amplifizierung möglich war.

Ein Reaktionsansatz von üblicherweise 20 µl enthielt je 200 µM Deoxynukleotide (dNTPs), eine Primerkonzentration von 0,3 – 1,0 µM des jeweiligen 3'-, bzw. 5'-Primers, 0,5 – 1 µg Template und eine Polymeraseaktivität von etwa 0,5 IU in dem zur Polymerase vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer.

Für präparative PCR-Ansätze erfolgte eine Amplifizierung über 20 Zyklen, bei analytischen Ansätzen über 30 Zyklen, flankiert von 5 Minuten bei 95°C am Beginn und 10 Minuten bei 72°C am Ende.

3.1.2 Auf trennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden nach dem Molekulargewicht mittels horizontaler Gelelektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt. Die Gelkonzentration lag je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuremoleküle zwischen 2% für kleine Fragmentlängen ab 100 Basenpaare und 0,8% für Fragmentlängen bis 10000 Basenpaare. Als Puffer zum Ansetzen der Gele sowie für den Elektrophoreselauf wurden für analytische Gele 1-fach TBE-Puffer und für präparative Gele 1-fach TAE-Puffer verwendet. Für präparative Gele wurde die normale Agarose durch low melting Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt ersetzt, um die Nukleinsäuren rückgewinnen zu können. Um die Nukleinsäuren sichtbar zu machen, wurde beim Ansetzen der Gele 0,1 mg/ml Ethidiumbromid zugefügt. Dieses interkaliert mit den Nukleinsäuren und zeigt bei Anregung mit UV-Licht von 260 nm Wellenlänge Fluoreszenz, wodurch die Fragmente als Banden erscheinen und das Elektrophoreseergebnis mit einer Sofortbildkamera dokumentiert werden kann. Die Auf trennung erfolgt bei einer Feldstärke von 2-8 V/cm. Die Größe der Fragmente kann durch den Vergleich mit einem geeigneten Größenstandard (1 kb DNA ladder) abgeschätzt werden.

3.1.3. Extraktion der Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen

Aus präparativen Agarosegelen mit niedrigem Schmelzpunkt werden Nukleinsäurebanden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Anschließend wird ein Zehntel des Bandengewichts 3 M Natrium-Acetat pH 9 zugefügt und das Gel für 5 – 10 Minuten bei 67°C geschmolzen. Zu dem flüssigen Gel wird die gleiche Gewichtsmenge Phenol zugefügt und sofort mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers gemischt. Diese Mischung wird für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert (ca. 2000 g; Heraeus Biofuge) und die wässrige Phase sofort in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dazu wird wiederum die gleiche Gewichtsmenge Phenol/Chloroform pipettiert und mit einem Vortex-Schüttler gemischt. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 rpm wird der Überstand in ein weiteres Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wird die 2-3-fache Menge 100% Ethanol pipettiert, wieder gut gemischt und für 15 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation sollte ein winziges Pellet aus Nukleinsäuren und dem gefällten Acetat-Salz am Boden des Reaktionsgefäßes erkennbar sein. Dieses Pellet wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich getrocknet. Anschließend kann es in autoklaviertem destilliertem Wasser oder einem geeigneten Puffer aufgenommen werden.

3.1.4. Reinigung von Nukleinsäuren (Phenolextraktion)

Mittels der Phenolextraktion können Proteine aus wässrigen Nukleinsäurepräparationen denaturiert und entfernt werden. Dazu wird die Lösung mit dem gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches versetzt und mit einem Vortex-Schüttler gemischt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 2000 g bleiben die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase, während die denaturierten Proteine zusammen mit der phenolischen Phase verworfen werden. Durch mehrmalige Wiederholung dieser Schritte kann die Reinheit der DNA noch erhöht werden.

3.1.5. Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können durch Alkohole in Anwesenheit hoher Konzentrationen monovalenter Kationen gefällt werden. Dabei verbleiben niedermolekulare Verbindungen wie Aminosäuren und Nukleotide in Lösung. Zu einer wässrigen Nukleinsäurelösung wird etwa ein Zehntel des Volumens einer 3 M Natrium-Acetat-Lösung pH 5 und das zwei- bis dreifache Volumen 100% Ethanol zugegeben. Nach kräftigem Schütteln (Vortex) und anschließender Zentrifugation für 15 Minuten bei 13000 rpm erhält man ein winziges Pellet aus Nukleinsäuren und Acetat-Salz am Boden des Reaktionsgefäßes. Dieses Pellet wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich kurz an der Luft getrocknet. Anschließend kann es in autoklaviertem destilliertem Wasser oder einem geeigneten Puffer aufgenommen werden. Die Fällungsausbeute kann erhöht werden, wenn der Ansatz vor der Zentrifugation 20 min auf Trockeneis oder über Nacht bei –20°C inkubiert wird.

3.1.6. Spezifische Spaltung von doppelsträngiger DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen schneiden Doppelstrang-DNA sequenzspezifisch in je nach Lage und Häufigkeit der betreffenden Schnittstellen mehr oder weniger große DNA-Fragmente. Dabei haben die Erkennungssequenzen jeweils eine Länge von wenigen Basen und sind gewöhnlich in sich symmetrisch (Palindrome). Zur Erzeugung eines Kontraktes durch Einfügung eines gewünschten Fragmentes in einen Vektor müssen geeignete

Schnittstellen gewählt oder in Vektor oder Fragment eingefügt werden, so daß jedes Enzym nur einmal schneiden kann.

Dazu wurden in einem Ansatz von 100 µl 5 – 10 µg des zu verdauenden DNA-Fragments und 10 – 15 IU der jeweiligen Restriktionsenzyme für das 3'- und das 5'-Ende mit den vom Hersteller empfohlenen optimalen Puffern eingesetzt. Nur wenn für beide Enzyme derselbe Puffer ideal war, wurde ein gemeinsamer Restriktionsansatz gewählt. Die Enzymmenge wurde so gewählt, daß ein vollständiger Verdau des eingesetzten DNA-Fragments bei 37°C innerhalb einer Stunde erreicht war. Das Ergebnis wurde anschließend jeweils durch Gelelektrophorese überprüft.

3.1.7. Verknüpfung von DNA-Ketten durch T4-Ligase

Die verdauten DNA-Fragmente müssen nun erst in einen Vektor eingebaut werden, bevor Bakterien mit dem Konstrukt transformiert werden können. Dazu werden die einander komplementären Enden der Nukleinsäuremoleküle des Vektors und des gewünschten DNA-Fragments mit Hilfe einer T4 DNA-Ligase (isoliert aus E.coli, die mit dem Bakteriophage T4 infiziert wurden) verknüpft. Die zur Ligierung erforderliche Energie wird durch Spaltung von ATP bereitgestellt.

Dazu werden in einem Ansatz von 10 µl ein Überschuß von 0,1 – 0,5 µg des verdauten DNA-Fragments mit 10 – 100 ng verdauter Vektor-DNA und 1 IU T4 DNA-Ligase in dem mitgelieferten Puffer, der auch ATP enthält, über Nacht bei 15°C im Wasserbad inkubiert.

Bevor das nun fertige Plasmid zur Transformation von Bakterien eingesetzt werden kann, muß erst durch Phenolextraktion die Ligase und anschließend durch Fällung ein großer Teil der im Puffer vorhandenen Salze abgetrennt werden. Zur Lagerung wird das Plasmid schließlich in TE-Puffer aufgenommen, zur Transformation der Bakterien hingegen in destilliertem Wasser.

3.1.8. Plasmidgebung aus E. coli (Midipräparation)

Plasmide sind kleine doppelsträngige extrachromosomal DNA-Ringe, die nur wenige Gene enthalten und als unabhängige genetische Einheiten repliziert werden. Wegen ihrer geringen Größe und der Möglichkeit der Einschleusung in Zellen durch Transformation sind sie als Vektoren für die Klonierung von Genen gut geeignet. Die meisten Plasmide liegen in der Zelle als überspiralisierte Moleküle vor. Treten Brüche in den Nukleotidsträngen auf, kehrt die Doppelhelix in den entspannten Zustand zurück und wird als offerringförmig bezeichnet. Bei Verwendung von Vektoren mit Antibiotika-Resistenzgenen können transformierte Zellen gegenüber nichttransformierten selektioniert werden.

Zur Gewinnung von etwa 100 µg Plasmid-DNA werden die Bakterien mit Hilfe eines Kits der Firma Qiagen einer alkalischen Lyse unterworfen. Dabei soll die überspiralisierte Konformation der plasmidischen DNA von der offen-ringförmigen Konformation, der chromosomal DNA, der RNA und den Bakterien-Proteinen abgetrennt werden. Das Prinzip der alkalischen Lyse beruht darauf, daß in einem kleinen pH-Bereich offerringförmige DNA denaturiert wird, überspiralisierte Plasmide jedoch unversehrt bleiben. Stellt man den Zellextrakt mit NaOH auf einen pH ≥12 ein, lösen sich die Wasserstoffbrücken in offen-ringförmigen Molekülen, die denaturierten DNA-Stränge fallen aus und lassen sich - wie chromosomal DNA - durch Zentrifugation leicht entfernen. Das klare Zentrifugat wird mit SDS (Natriumlaurylsulfat) versetzt und anschließend mit Natriumacetat neutralisiert. Dadurch werden auch Proteine und RNA unlöslich, so daß man sie ebenfalls beim Zentrifugieren beseitigt und im Überstand das gewünschte Plasmid zurückbleibt.

Dazu wird ein gewünschter Bakterienklon einer frischen Agarplatte in 2-5 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium gelöst und für acht Stunden bei 37°C geschüttelt. Davon werden 20 µl in 50 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium gelöst unter heftigem Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Bakterienkultur 15 min. bei 6000 g zentrifugiert (6000 rpm in einem Sorvall GSA oder GS3 Rotor). Die geernteten Zellen werden auf Eis in 4 ml RNase-haltigem Puffer P1 resuspendiert und im folgenden Lyseschritt bei Raumtemperatur mit 4 ml Puffer P2 gemischt, der 0,2 M NaOH + 1% SDS enthält. Nach fünf Minuten Inkubation erfolgt die Zugabe von 4 ml eiskaltem Puffer P3, der einer 3 M Natriumacetat-Lösung mit pH 5,0 entspricht. Nach 10 Minuten Lagerung auf Eis wird die ausgeflockte Mischung durch einen mechanischen Filter gepresst und man erhält ein klares Lysat. Die darin enthaltene Plasmid-DNA wird nun mittels Affinitätschromatographie über eine zuvor äquilibrierte Kunstarzsaule gereinigt. Die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle binden an die positiv geladene Oberfläche der Harzpartikel. Nach zweimaligem Spülen mit einem Waschpuffer wird die DNA mit einem Elutionspuffer von der Säule freigesetzt. Das Eluat wird mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol versetzt, 45 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Anschließend wird das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, an Luft getrocknet und schließlich in 100 µl H₂O aufgenommen. Die so erhaltene DNA-Lösung besitzt in der Regel eine Konzentration von ca. 1 µg/µl.

3.1.9. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Dabei ist die Absorption dieser ultravioletten Strahlung in einer DNA-haltigen wäßrigen Lösung ihrem DNA-Gehalt proportional. Einer optischen Dichte (*OD*) von 1,0 entsprechen 50 µg/ml dsDNA [11]. Die Berechnung erfolgt nach untenstehender Formel, wobei für den Extinktionskoeffizienten ε = 20 gewählt wird und mit *V* der Verdünnungsfaktor der gemessenen Probe eingeht:

$$\frac{OD}{\epsilon} * V = \frac{\mu g}{\mu l}$$

Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung kann anhand des Verhältnisses der Absorptionen bei 260 und 280 nm abgeschätzt werden. Bei einer reinen DNA-Probe besitzt der Quotient der Absorptionen einen Wert von 1,8. Geringere Werte weisen auf eine Kontamination mit Proteinen oder Phenol hin.

3.1.10. Sequenzierung

Zur Kontrolle der Nukleotidsequenz der neuen Konstrukte wurde jeweils eine DNA-Sequenzierung mittels der basenspezifischen Kettenabbruchmethode nach Sanger [76] durchgeführt. Dabei erfolgt die enzymatische Elongation eines an einzelsträngige DNA gebundenen Oligonukleotidprimers bis zum zufälligen Einbau eines fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotids, der zur Termination der DNA-Polymerase-katalysierten Reaktion und damit zum Kettenabbruch führt, da wegen der fehlenden 3'-Hydroxylgruppen eine Fortsetzung der DNA-Synthese an einmal eingebauten 2',3'-Didesoxynukleosid-Resten nicht möglich ist. Für die Sequenzierreaktion wurde der Big Dye Terminator DNA Sequencing Kit von Perkin Elmer verwendet.

3.2. Herstellung, Reinigung und Quantifizierung von Proteinen

3.2.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Transformation von Zellen, insbesondere von Mikroorganismen, müssen diese vorher in einen für die Transformation kompetenten Zustand gebracht werden, um dann DNA-Fragmente nach Ligation mit Vektoren in die Zellen einschleusen und so klonieren zu können.

Dazu werden E.coli auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Davon werden wenige isolierte Klone in 5 ml LB Medium gegeben und 5-12 Stunden lang bei 37°C geschüttelt. Daraus werden 2,5 ml in 500 ml LB Medium überführt und bei 37°C unter heftigem Schütteln so lange inkubiert, bis die optische Dichte der Bakteriensuspension 0,5 – 0,7 beträgt. Die Zellen werden nun in Eiswasser auf 0°C abgekühlt und anschließend 20 Minuten bei 3000 rpm (Zentrifuge Sorvall RC 5B Plus mit Rotor GS-3) und 2°C zentrifugiert. Nach sorgfältigem Abgießen des Überstands werden die Zellen in 5 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und danach in 500 ml eiskaltem Wasser verdünnt. Nach einer weiteren 20-minütigen Zentrifugation bei 3000 rpm und 2°C, erneutem Abgießen des Überstands und Wiederholung des letzten Waschschrittes werden die Zellen in 40 ml eiskaltem 10%-igem Glycerol aufgenommen und 10 Minuten bei 3000 rpm und 2°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und das Pellet in ungefähr dem gleichen Volumen eiskalten 10 – 20%-igen Glycerols resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird nun in sterile Reaktionsgefäße mit je 50 – 300 µl Inhalt aliquotiert, sofort in einem Ethanol-Trockeneisbad gefroren und schließlich bei –80°C gelagert.

3.2.2. Transformation durch Elektroporation

Für jeden Transformationsansatz werden 50 µl eiskalter Bakteriensuspension kompetenter E.coli vorbereitet. Dann werden in 1 µl Volumen zwischen 5 pg und 0,5 µg Plasmid-DNA dazugegeben, mit der Bakteriensuspension gemischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation erfolgt in einem Biorad Gene Pulser bei 1,8 kV und 25 µF. Anschließend muß sofort 1 ml SOC Medium zugegeben werden. Darin werden die Bakterien 30 – 60 Minuten bei 37°C geschüttelt, bevor sie auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert werden und 16 Stunden bei 37°C inkubieren. Durch Screening der gewachsenen Kolonien müssen nun die Klone herausgefunden werden, die das richtige Konstrukt enthalten.

Eine erfolgreiche Transformation kann nur bei einer Entladungsdauer von mehr als 4,0 ms stattfinden. Wenn es hingegen zu einem Überschlag kommt werden die Bakterien zerstört. Ein möglicher Grund für eine zu kurze Entladungsdauer ist eine zu hohe Salzkonzentration in der DNA-haltigen Lösung. Diese kann durch Alkoholfällung der DNA und anschließender Resuspension des Pellets in destilliertem Wasser gesenkt werden.

3.2.3. Screening positiver Klone (PCR)

Viele der gewachsenen Bakterienkolonien sollten den Vektor mit dem neuen Konstrukt aufgenommen haben, da sie nur mit dem darin enthaltenen Ampicillin-Resistenzgen auf den Antibiotika-haltigen Agarplatten überleben können. Zum Screening der tatsächlich positiven Klone werden isoliert gewachsene Kolonien gepickt und jeweils in 100 µl Ampicillin-haltigem LB Medium aufgenommen. Davon wird je 1 µl mit geeigneten 3'- und 5'-Primern in einen PCR Ansatz gegeben, der in 20 µl je 10 mM dNTPs und 0,5 – 1 IU Taq-Polymerase im dazugehörigen Puffer enthält. Nach 30 Zyklen PCR

(siehe Kapitel 3.1.1.) wird der Ansatz in einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 3.1.2.). Durch Vergleich der Banden mit einem Größenstandard können positive Klone identifiziert werden. Zur sicheren Lagerung der neuen Konstrukte sollte nun eine Midi-Präparation der Plasmid-DNA erfolgen, da diese gereinigt stabiler gelagert werden kann als die Bakterien und man bei erneuter Transformation mit nun ausschließlich positiven Klonen des gewünschten Konstruktions rechnen kann. Außerdem sollte zur Sicherstellung einer fehlerfreien DNA-Sequenz eine Sequenzierung des entsprechenden Abschnitts erfolgen.

3.2.4. Periplasmatische Expression und Periplasma-Lyse

Die Expression im periplasmatischen Spalt von E.coli führt zur korrekten Faltung kleiner Proteine bei einer Ausbeute bis zu mehreren hundert Mikrogramm pro Literkultur. Dazu werden eine positive Kolonie von einer Agarplatte oder einige Mikroliter einer bei -20°C gelagerten Bakteriensuspension, die mit dem gewünschten Konstrukt transformiert ist, in 50 ml Ampicillin-haltiges LB Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Davon werden 25 ml in einen Liter Ampicillin-haltiges LB Medium gegeben und etwa drei Stunden bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 – 0,9 hochwachsen lassen. Durch Zugabe von 1 ml 1 M IPTG wird die Induktion des lac-Promotors und damit die Proteinexpression gestartet. Eine maximale Ausbeute erreicht man durch Schütteln bei Raumtemperatur für vier Stunden. Anschließend werden die Bakterien auf Eis abgekühlt und dann 20 Minuten bei 2000 g (3500 rpm in einem Sorvall GS3 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt, das Pellet in 20 ml eiskaltem Sonication Buffer resuspendiert und in COREX Glaskrüppelchen überführt. Zur Lyse des periplasmatischen Spaltes werden die Bakterien in vier Zyklen jeweils drei Minuten in einem Ethanol/Trockeneisbad schockgefroren und anschließend drei Minuten in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nach dem letzten Zyklus werden die Bakterien wieder auf Eis gekühlt und 10 Minuten bei 16000 g und 4°C zentrifugiert (10000 rpm in einem Sorvall HB-6 Rotor). Der Überstand, der nun die Periplasmabroteine enthält, wird abgenommen und sollte sofort gereinigt werden, da bakterielle Proteasen selbst eine kurzfristige Lagerung verbieten.

3.2.5. Reinigung mit Affinitätschromatographie

Die Reinigung kann wegen des Histidin-Tags der neuen Konstrukte mittels Affinitätschromatographie über eine mit Nickel beladene Agarosesäule erfolgen. Das Periplasmalysat aus dem vorangegangenen Schritt befindet sich bereits in einem geeigneten Puffer mit pH 8,1, in dem eine suffiziente Bindung der Histidine an das Nickel zustande kommen kann. Dazu wird das Periplasmalysat eine Stunde bei 4°C mit 1 ml Ni-NTA Agarosegel (Qiagen) geschüttelt und das nun beladene Gel in eine Pharmacia 10/10 Säule gefüllt. Über eine FPLC wird das Protein nach einem Waschschrift mit 40 ml Waschpuffer mittels eines pH-Stufengradienten eluiert. Der pH wird durch ein steigendes Verhältnis von Elutionspuffer B zu Elutionspuffer A gesenkt. So werden durch 20 ml mit 0% B, 20 ml mit 60% B und weitere 20 ml mit 80% B erst alle unspezifisch bindenden Proteine von der Säule eluiert. Die letzten 20 ml mit 100% B und einem pH 3,5 werden in 1 ml Fraktionen gesammelt und enthalten das gereinigte Chemokin. Anhand des Chromatogramms kann man erkennen, in welchen Fraktionen die höchsten Konzentrationen zu erwarten sind. Diese können nun mit Hilfe eines ELISA bestimmt werden. Der Erfolg der Reinigung wird mittels eines SDS-Proteingels überprüft. Durch einen Western Blot kann gezeigt werden, welche der Banden des Proteingels das gewünschte Protein enthalten.

3.2.6. Konzentrationsbestimmung durch Enzyme-linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)

Mit Hilfe der beiden Anti-Human-RANTES-Antikörper VL1 und VL3 kann die Konzentration der RANTES-Modifikationen einfach in einem ELISA bestimmt werden. Dazu wird gereinigter VL3 in PBS zu einer Konzentration von 5 – 10 µg/ml verdünnt und jeweils 100 µl pro Well in eine Nunc ImmunoSorp 96 Well Platte gegeben, die so beschichtet ist, daß Proteine an Boden und Wand des Wells haften bleiben. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur wird der Inhalt der Wells abgekippt und 200 µl PBS/1%BSA je Well eingefüllt. Dadurch wird die Oberfläche für weitere unspezifische Haftung an der Wand blockiert. Nach Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wird der Inhalt wieder abgekippt, die zu untersuchenden Proben und der RANTES-Standard werden in PBS/1%BSA zu einer Konzentration von 2 ng/ml verdünnt und je 100 µl pro Well aufgetragen. Dabei empfiehlt es sich, sowohl vom Standard als auch von den Proben eine Verdünnungsreihe mit acht Werten aufzutragen, um mit der Probenkonzentration in den Meßbereich zu kommen und genügend Werte für eine Mittelwertbildung zu erhalten. Nach Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur werden die Wells viermal mit je 200 µl PBS/0,05%Tween und zweimal mit PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper VL1-HRP ist an Peroxidase gekoppelt. Er wird in PBS/1%BSA zu einer Konzentration von 5 – 10 µg/ml verdünnt und je 100 µl pro Well aufgetragen. Nach einer letzten Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur werden die Wells viermal mit PBS/0,05%Tween und zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl einer ABTS-Lösung gefüllt. Je nach an VL3 gebundener RANTES-Menge befindet sich eine unterschiedliche Menge an VL1 gekoppelter Peroxidase in jedem Well. So färbt sich in Wells mit einer hohen RANTES-Konzentration das ABTS stärker grün als mit Wells einer niedrigeren Konzentration. Durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm und Vergleich mit dem Standard kann nun die Konzentration in jedem Well sehr genau bestimmt werden.

3.2.7. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können in Polyacrylamidgelen nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Monoacrylamid und Methylenbisacrylamid polymerisieren unter dem Einfluß von TEMED und Ammoniumpersulfat zu einem Netzwerk, in dem kleinere Proteine leichter beweglich sind als große. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine können verschiedene Gelkonzentrationen (üblicherweise zwischen 10% und 15%) gewählt werden. Zusätzlich bewirkt die Zugabe von Natriumlaurylsulfat (SDS), einem anionischen Detergens, das den größten Teil der nicht kovalenten Bindungen aufbricht und so die Proteine denaturiert und das sich Proteinen in einem konstanten Verhältnis zu deren Masse anlagert, eine negative Ladung der Proteine, die proportional zu ihrer Masse ist. Durch die Summe beider Effekte ist die elektrophoretische Mobilität vieler Proteine indirekt proportional zum Logarithmus ihrer Masse.

Das Gel wird zwischen zwei vertikale Glasplatten im Abstand von 0,75 mm gegossen und vorsichtig mit Wasser überschichtet, um eine glatte Gelgrenze zu erhalten. Nach Polymerisation wird das Wasser abgekippt und über dem Trenngel ein 4%iges Sammelgel gegossen, das mit Hilfe eines Kamms nach Polymerisation Aussparungen für die Proteinproben enthält. Die Proben werden vor dem Auftragen im Verhältnis 4:1 mit 5x DNA Auftragspuffer vermischt und zwei bis drei Minuten bei 95°C im Thermomixer erhitzt. β-Mercaptoethanol im reduzierenden Auftragspuffer bewirkt die Zerstörung von Disulfidbrücken, wodurch multimere Proteine in ihre Untereinheiten zerlegt werden.

Die Gelelektrophorese läuft bei 4°C in SDS PAGE Laufpuffer bei einer maximalen Stromstärke von 50 mA und einer Spannung kleiner 110 V etwa drei bis vier Stunden, bis die kleinsten Proteine den unteren Rand der Gelkammer erreichen und eine maximale Auf trennung erzielt wird. Die Proteinbanden können durch Anfärben mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden. Dazu wird das Gel aus der Gelkammer genommen und drei Stunden in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wird es in zwei Schritten erst für eine Stunde und dann über Nacht in Entfärbelösung geschwenkt. Dabei bleibt der Farbstoff an den Proteinbanden haften und es können Proteinmengen ab 0,5 µg detektiert werden. Die Proteingröße kann im Vergleich zu einem Größenmarker abgeschätzt werden, der parallel zu den Proben gelaufen ist. Schließlich wird das Ergebnis des Proteingels zur Dokumentation mit Hilfe eines Scanners gespeichert.

3.2.8. Western Blot Analyse

Wenn man einen Antikörper besitzt, der eine lineare Aminosäuresequenz eines Proteins selbst im denaturierten Zustand erkennt, kann man mit Hilfe eines Western Blots aus einer Vielzahl von Banden auf einem Proteingel das gesuchte Protein spezifisch anfärbten und Mengen ab 1 ng nachweisen.

Dazu werden die Proteinbanden nach einem SDS-Gelelektrophoreselauf auf eine zuvor in Methanol angefeuchtete Nitrozellulose-Membran übertragen. Dies geschieht in Blotting Buffer bei 4°C und einer Spannung von 100 V. Nach einer Stunde Laufzeit wird die Membran 15 Minuten bei 37°C in TBS mit 5% Magermilchpulver inkubiert, um die unspezifische Bindung weiterer Proteine an die Membran zu verhindern. Nach zwei Waschschritten in TBS wird die Membran mit einem His6-Antikörper inkubiert, der in TBS zu einer Konzentration von 4 µg/ml verdünnt wurde. Er bindet an den Histidin-Tag der neuen Konstrukte. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur folgen drei einminütige Waschschritte mit TBS/Tween. Anschließend wird die Membran 12 Stunden mit einem Peroxidase-markierten sekundären Antikörper gegen den His6-Antikörper bei einer Konzentration von 2 µg/ml inkubiert. Nach drei 15-minütigen Waschschritten in TBS/Tween und zwei weiteren in TBS können die spezifisch angefärbten Banden sichtbar gemacht werden. Dies geschieht entweder in 50 ml destilliertem Wasser mit 40 mg o-Dianisidin und 100 mg Natrium-Nitroprussid. Dabei wird die Anfärbung durch Zugabe von 17 µl H₂O₂ gestartet und durch Leitungswasser gestoppt. Es zeigen sich grüne Banden, die wieder mit Hilfe eines Scanners auf dem Computer gespeichert werden können. Eine weitere Möglichkeit der Anfärbung besteht mit den ECL™ Western Blotting Detection Reagents, wodurch die Protein-Banden durch Lumineszenz auf Filmpapier dargestellt werden können.

3.3. Funktionelle Tests

3.3.1. Zellkultur mit stabil transfizierten CHO-Zellen

Für die funktionellen Tests standen CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells) zur Verfügung, die mit verschiedenen humanen Chemokinrezeptoren stabil transfiziert waren. Diese adhärenten Zelllinien werden in Flaschen in CHO-Kulturmedium im 37°C-Brutschrank bei 5% CO₂ kultiviert. Sie werden mit Hilfe von PBS / 1,5 mM EDTA vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und nach Zentrifugation (1200 rpm in Heraeus Minifuge T) wird das Zellpellet in CHO-Kulturmedium resuspendiert. Aus einer mittleren Kulturflasche (250 ml) erhält man etwa 10⁷ Zellen. Um die Zelldichte genau zu bestimmen, werden 10 µl

Zellsuspension in 90 µl Trypan Blau verdünnt und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die dabei erhaltene Zellzahl aus einem 16fachen Feld muß mit einem Faktor 10^5 multipliziert werden, um die resultierende Zelldichte pro Milliliter zu errechnen. Zur langfristigen Lagerung werden die resuspendierten Zellen mit dem gleichen Volumen 2x Einfriermedium versetzt und pro Kryotube maximal $5 \cdot 10^6$ Zellen in einem Milliliter Volumen eingefroren. Um die Zellen möglichst wenig zu schädigen, soll das Einfrieren langsam und gleichmäßig erfolgen. Dazu werden die Kryotubes in einem mit Isopropanol gefüllten Gefäß erst in eine -80°C -Truhe gegeben, bevor sie endgültig in Flüssigkeitstickstoff gelagert werden. Eingefrorene Zellaliquots aus dem Stickstofftank werden in einem 37°C -Wasserbad aufgetaut und sofort in 20 ml Kulturmedium überführt, um das zytotoxische DMSO zu verdünnen. Nach zwei Minuten Zentrifugation (1200 rpm in Heraeus Minifuge T) wird der Überstand abgesaugt, das Zellpellet wird in CHO-Kulturmedium resuspendiert und wieder in einer Kulturflasche im Brutschrank inkubiert

3.3.2. Ficoll-Präparation von mononukleären Zellen (PBMCs)

Für die Gewinnung großer Mengen mononukleärer Zellen aus Blut wurden buffy coats verwendet. Die darin enthaltenen 100 Milliliter werden mit der gleichen Menge steriler 0,9%iger Kochsalzlösung vermischt. In acht 50 ml Falcon-Röhrchen werden je 15 ml Ficoll Separating Solution bei Raumtemperatur vorgelegt. Dann werden sehr vorsichtig je 25 ml Blut-Kochsalzlösung-Gemisch überschichtet. Die Falcon-Röhrchen werden für 25 Minuten bei 400 g (1500 rpm, in Heraeus Minifuge T) zentrifugiert. Dabei ist darauf zu achten, daß der Rotor am Ende ausläuft, ohne gebremst zu werden, da sonst der entstandene Dichtegradient wieder zerstört wird. Man erhält wegen der unterschiedlichen Dichte mehrere Schichten. Zuunterst befinden sich die Erythrozyten und Granulozyten. Darüber folgen erst die Ficoll Separating Solution und dann eine wässrige Schicht bestehend aus der Kochsalzlösung und dem restlichen Plasma. In der Interphase zwischen Ficoll und der wässrigen Schicht befinden sich die mononukleären Zellen. Diese werden vorsichtig abgesaugt und in derselben Menge RPMI / 10% FCS verdünnt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten mit 1500 rpm wird das Zellpellet in 15 – 20 ml RPMI / 10% FCS resuspendiert und nach einer weiteren Zentrifugation für 10 Minuten mit 100 g (760 rpm) in 2,5 ml RPMI / 10% FCS aufgenommen. Die resultierende Zelldichte wird mit Hilfe einer Neubauer-Kammer ausgezählt (s. bei CHO-Zellen). Anschließend werden die PBMCs bis zur weiteren Verwendung eingefroren (s. bei CHO-Zellen) und erst 24 Stunden vor dem Einsatz in einem funktionellen Test wieder in Kultur genommen.

3.3.3. Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie können viele Fragestellungen parallel, schnell und sehr gut reproduzierbar untersucht werden. In einer Glaskapillare werden aus einer Zellsuspension einzelne Zellen im Flüssigkeitsstrom fokussiert und mit einem Argonlaser als Lichtquelle bei einer Wellenlänge von 488 nm bestrahlt. Für jede Zelle wird dabei das Vorwärtsstreulicht ($0\text{--}10^\circ$, FSC), das einen Rückschluß auf die Größe der Zelle erlaubt, und das Seitwärtsstreulicht (90° , SSC), das von der Granularität der Zelle abhängt, gemessen. Gleichzeitig regt die Lichtquelle bei geeigneten Farbstoffen Fluoreszenz an, deren Signal ebenfalls gespeichert wird und die zur Charakterisierung der Zellen genutzt werden kann. Üblicherweise werden die Farbstoffe Fluorescein (FITC), R-Phycoerythrin (PE) und Tricolor (TC) verwendet, deren Exzitationsbereich um 488 nm und deren Fluoreszenzstrahlung um 520 nm (FITC), 575 nm (PE), bzw. 690 nm (TC) liegt (s. Abb. 3.1). Diese Fluoreszenzfarbstoffe sind meist an Antikörper gekoppelt, die direkt an spezifische

Oberflächenstrukturen der Zellen oder sekundär an primäre Antikörper binden. Dadurch können unter verschiedenen Bedingungen entweder die Häufigkeit von Zellsubpopulationen in einer heterogenen Suspension bestimmt werden oder innerhalb einer Zellpopulation die relative Expression einer bestimmten Oberflächenstruktur.

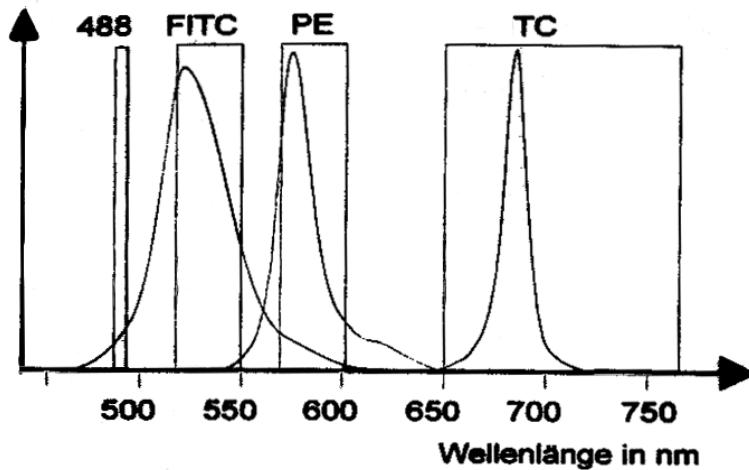


Abb. 3.1: Spektrale Überlappung der Emissionswellenlängen von FITC, PE und TC-Fluoreszenzfarbstoffen. Deswegen ist bei einigen Konjugaten vor der eigentlichen Messung eine Kompensation notwendig, bei der von jedem Signalpuls der durch die Fluoreszenzüberlappung verursachte Anteil subtrahiert wird.

3.3.4. Auswertung der FACS-Daten

Die Messungen erfolgten an einem Durchflußzytometer FACSCalibur von Becton Dickinson, die Datenauswertung an der dazugehörigen CellQuest Software. Die gemessenen Daten von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht und der drei Fluoreszenzstrahlungen können in der Auswertung unterschiedlich dargestellt werden. Die einfachste Darstellung der Meßergebnisse ist das Histogramm, in dem über der Stärke des jeweiligen Signals die Anzahl der gemessenen Zellen mit der entsprechenden Signalstärke aufgetragen ist. Damit kann in der Einfarbenimmunfluoreszenz die Verteilung eines Parameters in einer Zellpopulation beschrieben werden. Die Relation zweier verschiedener Zelleigenschaften zueinander wird als Zweiparameter-Punktediagramm bezeichnet (dot plot). Um die interessierende Zellpopulation von anderen Zellarten und Debris abzugrenzen, werden meist FSC und SSC gegeneinander aufgetragen und einzelne Populationen durch das Setzen von Fenstern (gates) definiert. Bei der statistischen Analyse werden dann nur Ereignisse berücksichtigt, die innerhalb eines solchen Fensters liegen. Abbildung 3.2 zeigt einen „dot plot“ des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes von einer Vollblut-Untersuchung mit „gates“ für die Lymphozyten- und die Monozyten-Subpopulationen. Die dritte große Subpopulation mit hohem SSC-Signal entsprechend starker Zellgranularität und niedrigem FSC-Signal entsprechend kleiner Größe wird durch die Granulozyten gebildet. Diese Subpopulation entfällt bei FACS-Untersuchungen mit PBMCs. Eine vierte Subpopulation mit niedrigem FSC- und niedrigem SSC-Signal sind die abgestorbenen Zellen, die dann deutlich an Größe und Granularität verlieren. Ein großer Teil des Zelldebris kann bereits durch geschickte Wahl eines Schwellenwertes für das Vorwärtsstreulicht (entsprechend der Partikelgröße) ausgeschlossen werden. In Abb. 3.2 liegt dieser Schwellenwert bei 100 relativen Einheiten.

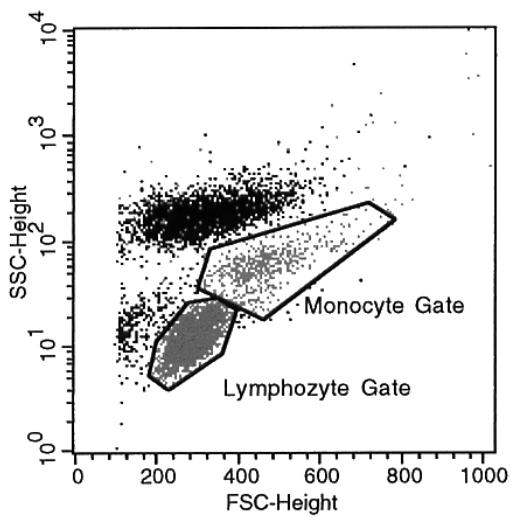


Abb. 3.2: Zweiparameter-Punktediagramm (dot plot) einer Vollblut-FACS-Untersuchung. Aufgetragen sind das Vorwärtsstreulicht FSC (entsprechend der Zellgröße) und das Seitwärtsstreulicht SSC (entsprechend der Zellgranularität). Zusätzlich zu den markierten Lymphozyten und Monozyten sind die Granulozyten (mit hohem SSC und niedrigem FSC) und die abgestorbenen Zellen (mit niedrigem SSC und niedrigem FSC) dargestellt. Durch den FSC-Schwellenwert bei 100 relativen Einheiten wird ein großer Teil des Zelldebris ausgeschlossen.

Durch geeignete Wahl des Fensters kann für die entsprechende Zellpopulation, z.B. Lymphozyten oder Monozyten oder alle intakten Zellen einer Zelllinie, das Vorhandensein einer bestimmten Oberflächenstruktur durch Anfärbung mit einem monoklonalen Antikörper relativ zu Kontrollbedingungen bestimmt werden. Das Ergebnis lässt sich am besten durch ein Histogramm darstellen, bei dem über dem Logarithmus des Fluoreszenzsignals die entsprechende Anzahl der Zellen aufgetragen ist. Für Monozyten und Zellen einer Zelllinie (siehe Abb. 3.3) ergibt sich dabei annähernd eine Normalverteilung, deren Mittelwert ohne weitere statistische Auswertung durch den Median aller Zellen des Fensters repräsentiert ist. Der Mittelwert „Mean“ kann bei gleichem Median durch eine Verunreinigung von wenigen Zellen mit einem hohen Fluoreszenzsignal deutlich verschoben sein.

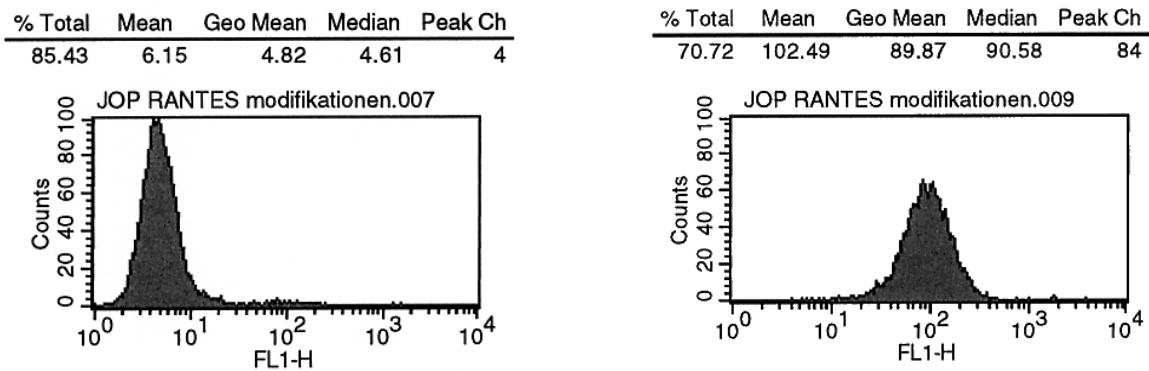


Abb. 3.3: Für ein „Gate“ ist die Anzahl der Zellen über dem Logarithmus ihrer entsprechenden Fluoreszenzintensität in einem Histogramm aufgetragen. Für Monozyten oder Zellen einer Zelllinie ergibt sich dabei annähernd eine Normalverteilung. Für die Auswertung wurde der Median herangezogen, da der Mittelwert „Mean“ insbesondere bei kleineren Zellzahlen durch Verunreinigungen mit hoher Fluoreszenzintensität deutlich verschoben sein kann.

Da nur ein Teil der Lymphozyten CCR5-positiv ist und die Rezeptorexpression sehr inhomogen ist, sind die gefärbten Zellen im Histogramm nicht als eigene Population abgrenzbar, sondern erscheinen rechts neben der CCR5-negativen Lymphozytenpopulation als Schulter, die weit bis zu hohen Fluoreszenzintensitäten reichen kann (siehe Abb. 3.4). In diesem Fall hat sich für die Auswertung die Verwendung des Mittelwertes „Mean“ als sehr gut reproduzierbar erwiesen, so daß auf aufwendige Doppelfärbungen verzichtet werden konnte.

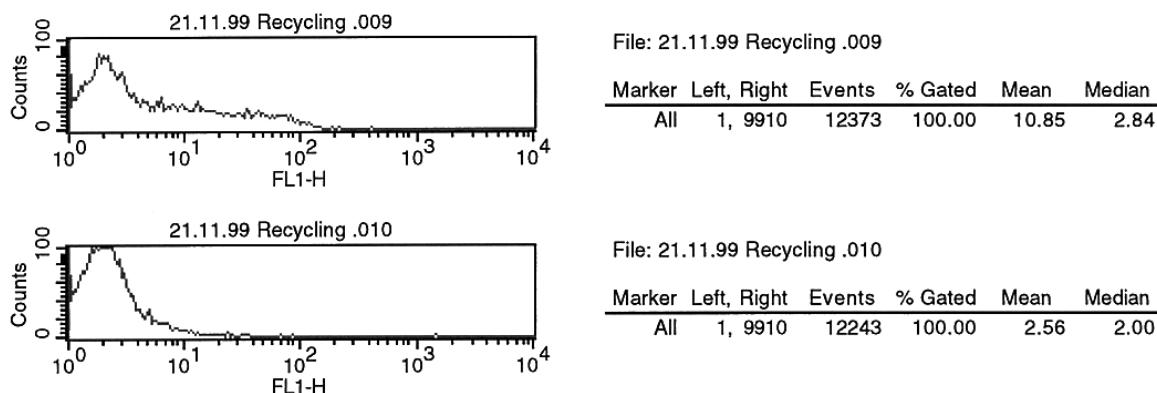


Abb. 3.4: Histogramm bei Färbung von CCR5 auf Lymphozyten. Obwohl ein großer Teil der Lymphozyten CCR5-negativ ist und die CCR5-positiven Zellen wegen sehr variabler Rezeptorexpression nur als Schulter und nicht als abgrenzbare Population erscheinen, ist der Mittelwert „Mean“ ein sehr gut reproduzierbarer Wert für die Stärke der Anfärbung der CCR5-positiven Zellen.

3.3.5. Protokolle für FACS-Analysen

Für jedes durchflußzytometrische Experiment werden mindestens 10^5 Zellen in einem Probenvolumen von 100-200 µl eingesetzt. Alle Schritte wie z.B. die Rezeptorinternalisierung durch Bindung des spezifischen Liganden, bei denen die Zellen ihre volle biologische Aktivität benötigen, werden im Brutschrank bei 37°C durchgeführt. Diese Reaktionen laufen so schnell ab, daß das Resultat bereits nach 20-30 Minuten erreicht ist. Die Färbungen, Waschschritte und Zentrifugationen werden bei 0°C durchgeführt, da die Zellen dann nicht in der Lage sind, ihre zuvor manipulierte Oberflächenstruktur wieder in den Ausgangszustand zurückzuversetzen. Auf die Fixierung der Zellen mit Formaldehyd kann verzichtet werden, da kein Infektionsrisiko besteht und die Zellen bei lichtgeschützter Inkubation auf Eis problemlos mehrere Stunden lang gelagert werden können ohne das FACS-Ergebnis zu beeinflussen. Wegen der hohen Affinität der Antigen-Antikörperbindung selbst bei 0°C wird bereits nach kurzen Färbezeiten von 20-30 Minuten die maximale Fluoreszenzintensität erreicht. Als sekundärer Antikörper werden jeweils 25 µl eines 1:200 in Medium verdünnten FITC- oder PE-konjugierten polyklonalen Kaninchensi-anti-mouse F(ab)₂ Fragments (F0313 oder P0260 von DAKO) verwendet, das gegen den Fc-Teil der murinen primären Antikörper gerichtet ist.

Bei allen FACS-Experimenten werden sämtliche Färbungs- und Waschschritte in 96-Well Rundbodenplatten durchgeführt und die Zellen erst im letzten Schritt in einzelne Meßrörchen pipettiert. Dadurch können häufig 8-fach Pipetten und Repetier-Pipetten verwendet werden und die Zentrifugationsschritte werden sehr einfach. Neben der bequemen Handhabung werden dadurch sehr große Versuchsansätze mit 200 und mehr

verschiedenen Bedingungen möglich, ohne daß die Qualität der Durchführung leidet, da z.B. keine Unterbrechung in der Kühlung auftreten kann.

Zwischen je zwei Inkubationen mit verschiedenen Liganden – z.B. zum Entfernen des restlichen ungebundenen primären Antikörper vor Inkubation mit dem markierten sekundären Antikörper – erfolgen jeweils drei Waschschrifte. Dazu werden die Rundbodenplatten 2 Minuten bei 0°C in der vorgekühlten Heraeus Megafuge mit Schwenkeinsätzen für 96-Well Microtiterplatten (Rotor 2705 und Einsätze 2205) mit 1800 rpm zentrifugiert, der Überstand abgekippt, die Zellen durch Schütteln in den verbliebenen wenigen Millilitern Flüssigkeit resuspendiert, jeweils mit 200 µl eiskaltem PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Die Zentrifugalkraft ist dabei so gewählt, daß ein Zellverlust beim Abkippen vermieden werden kann, ohne die Zellen durch zu starke Zentrifugation zu schädigen.

3.3.6. Rezeptorinternalisierung

Die Internalisierung der Chemokinrezeptoren durch RANTES und seine Modifikationen wird auf stabil transfizierten CHO Zellen oder auf PBMC gemessen. Dazu werden die Chemokine in Medium (MEM Alpha Medium für CHO Zellen und RPMI für PBMCs) auf die gewünschte Konzentration verdünnt und mit mindestens 10^5 Zellen 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach drei Waschschriften bei 0°C (siehe oben) folgt die 60-minütige Inkubation auf Eis mit dem primären, z.B. dem gegen CCR5 gerichteten monoklonalen Antikörper MC-1 (10 µg/ml) [58]. Nach drei weiteren Waschschriften werden die Zellen 60 Minuten auf Eis mit dem sekundären, FITC- oder PE-konjugierten Antikörper inkubiert. Nach erneuten Waschschriften werden die Microtiterplatten lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt, bis die Wells jeweils einzeln direkt vor der Messung in die geeigneten Reaktionsgefäß (PS-Tubes, konisch) umpipettiert werden.

3.3.7. Rezeptorrecycling

Für Recyclingexperimente werden mindestens 10^6 Zellen pro Well in 250 µl Gesamtvolumen mit einer einzigen, hohen Konzentration von RANTES (z.B. 0,5 µg/ml) und seinen Modifikationen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Diese werden alle 5 Minuten vorsichtig geschüttelt, um eine Sedimentierung zu verhindern. Nach 30 Minuten Rezeptorinternalisierung wird ein Fünftel des Well-Volumens auf eine andere Microtiterplatte überführt, zentrifugiert, drei mal bei 37°C gewaschen und anschließend in Medium aufgenommen und weiter ohne Chemokin bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Entsprechend werden nach weiteren 60, 90 und 105 Minuten wieder jeweils ein Fünftel des ursprünglichen Well-Volumens entnommen, gewaschen und anschließend ohne Chemokin bei 37°C weiter inkubiert. 150 Minuten nach Beginn des ganzen Experiments, bzw. 120 Minuten Entnahme des ersten Fünftels werden alle Zellen inklusive des verbliebenen Fünftels auf Eis überführt, drei mal bei 0°C gewaschen und anschließend wie zuvor beschrieben auf Eis mit dem primären und sekundären Antikörper inkubiert und gemessen. Auf diese Weise erhält man Bedingungen, bei denen die Zellen 0, 15, 30, 60 und 120 Minuten Inkubationszeit bei 37°C ohne Chemokin haben, in der ein Teil der internalisierten Rezeptoren wieder auf der Zelloberfläche erscheint.

Um sicherzustellen, daß die längere Inkubation mit dem Chemokin keinen Einfluß auf das Ergebnis hat, wurde in einem parallelen Ansatz ebenso jeweils ein Fünftel der Zellen zu denselben Zeitpunkten entnommen, aber auf Eis ohne Chemokin inkubiert, um ein Rezeptorrecycling zu verhindern. Dabei zeigte sich, daß eine längere Internalisierungsdauer von 90, 120, 135 und 150 Minuten keinen Unterschied ergibt im Vergleich zu den üblicherweise angewandten 30 Minuten für die Rezeptorinternalisierung.

Recyclingexperimente können am besten mit transfizierten CHO Zellen durchgeführt werden. Monozyten sind leider ungeeignet, da sie bei 37°C trotz regelmäßigen Schüttelns während der ganzen Inkubationsdauer zu schnell adhärent werden.

3.3.8. Chemokinrezeptorunabhängige Bindung auf Zelloberflächen

Die CCR5-unabhängige Bindung von RANTES wird auf CHO Zellen, humanen PBMC und primären humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMVEC) bestimmt, die in den entsprechend gekennzeichneten Experimenten zuvor 18 Stunden lang mit 5ng/ml IL-1 β aktiviert wurden. Die Zellen wurden eine Stunde auf Eis mit verschiedenen RANTES Konzentrationen (verdünnnt in RPMI Medium) inkubiert, anschließend drei mal mit PBS bei 0°C gewaschen und auf Eis gefärbt mit einem der monoklonalen Antikörper VL-1, VL-2, VL-3 und VL-4 (10 μ g/ml), die gegen humanes RANTES gerichtet sind [49]. Parallel dazu erfolgte eine Isotypkontrolle mit IgG-2b Antikörpern (Sigma). Zuletzt folgte eine 60-minütige Inkubation mit einem sekundären PE-konjugierten Kaninchen-anti-Maus F(ab)₂ Fragment (Dako), gerichtet gegen den Fc-Teil der murinen Antikörper VL-1 bis VL-4, und anschließend, wie zuvor beschrieben, die FACS-Analyse.

In den entsprechend bezeichneten Experimenten wurde RANTES vorinkubiert mit jeweils einer der folgenden Substanzen: mit den RANTES Antikörpern VL-1 bis VL-4, die in RPMI zu einer Konzentration von 10 μ g/ml verdünnt wurden, mit humanem Serum, humanem Plasma, das mit EDTA antikoaguliert war, Thrombozyten-reichem und Thrombozyten-freiem Plasma, die mit 5 mM CaCl₂ zum Gerinnen gebracht wurden, mit dem Überstand von gereinigten Thrombozyten und mit gereinigtem Chondroitinsulfat A (Sigma) verdünnt in RPMI.

Außerdem wurde in den gekennzeichneten Experimenten der Thrombozyten-Überstand verdaut mit 1,3 U/ml Chondroitinase ABC (Sigma) [96] für 3 Stunden bei 37°C oder mit 33 U/ml Heparinase (Sigma) für 3 Stunden bei 25 °C.

3.3.9. Messung der intrazellulären Calcium-Mobilisation

In nicht aktivierte Zellen liegt die cytosolische Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺]_i typischerweise bei 0,1 μ M. Da der Ca²⁺-Spiegel im extrazellulären Milieu um mehrere Größenordnungen darüber liegt, kann durch kurzfristiges Öffnen von Ca²⁺-Kanälen in der Zellmembran oder in den Membranen von intrazellulären Calcium-Speichern der cytosolische Ca²⁺-Spiegel stark angehoben werden. Dieser Anstieg wurde erstmals bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten beobachtet [86,87] und ist eines der ersten Ereignisse in der Signalkaskade. Inzwischen wurde die intrazelluläre Calcium-Mobilisation bei der Aktivierung vieler Zellen nachgewiesen, insbesondere auch über G-Protein-gekoppelte 7-transmembranale Rezeptoren wie z.B. die Chemokinrezeptoren [Mur94].

Die Konzentration an freiem [Ca²⁺]_i kann mit cytosolischen Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt werden. Diese enthalten mehrere Carboxylgruppen, die jeweils durch eine Esterbindung an ein Acetat maskiert sind. Dadurch wird der Farbstoff insgesamt lipophil und kann einfach durch die Zellmembran permeieren. Im Zellinneren wird er durch cytosolische Esterasen hydrolysiert, die nun freigelegten Carboxylgruppen machen das Molekül hydrophil und halten es im Zellinneren gefangen. Außerdem bilden die Carboxylgruppen mit zweiwertigen Kationen Chelat-Komplexe, wodurch sich die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs verändern.

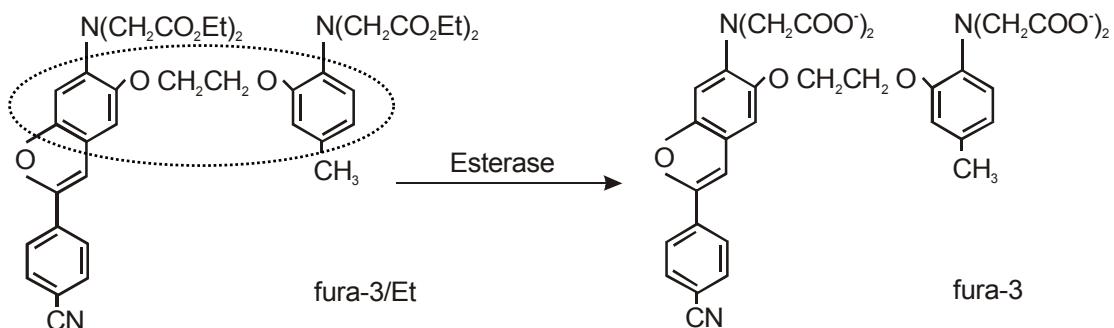


Abb. 3.5: Fura-3 besitzt vier maskierte Carboxylgruppen, wodurch das damit lipophile Molekül einfach durch Zellmembranen diffundieren kann. Im Zellinneren werden die Carboxylgruppen durch zelleigene Esterasen freigesetzt, das Moleköl wird damit im Zytosol gefangen [33]. Gleichzeitig bekommt Fura durch die freien Carboxylgruppen die Eigenschaften eines Chelators und kann zweiwertige Kationen einfangen. Durch die Bindung an ein Kation ändern sich die Fluoreszenzeigenschaften, wodurch die Konzentration des entsprechenden Kations bestimmt werden kann. Die markierte sogenannte Stilbene-Struktur ist den Fluoreszenzfarbstoffen gemeinsam.

Ein geeigneter Fluoreszenzfarbstoff muß mehreren Bedingungen genügen, die durch Fura am besten erfüllt werden. Ein hoher Extinktionskoeffizient als Maß für die Absorptionsausbeute wird bei Fura durch die Kopplung der allen Farbstoffen gemeinsamen Stilbene-Gruppe (siehe Abb. 3.5) an einen heterozyklischen Ring erreicht, wodurch sich auch eine hohe Fluoreszenzausbeute ergibt. Dadurch kann die intrazelluläre Fura-Konzentration so niedrig gehalten werden, daß der Farbstoff keinen Puffer-Effekt auf die Calcium-Ionen hat. Außerdem hat Fura eine relativ hohe Selektivität für Ca^{2+} -Ionen im Vergleich zu

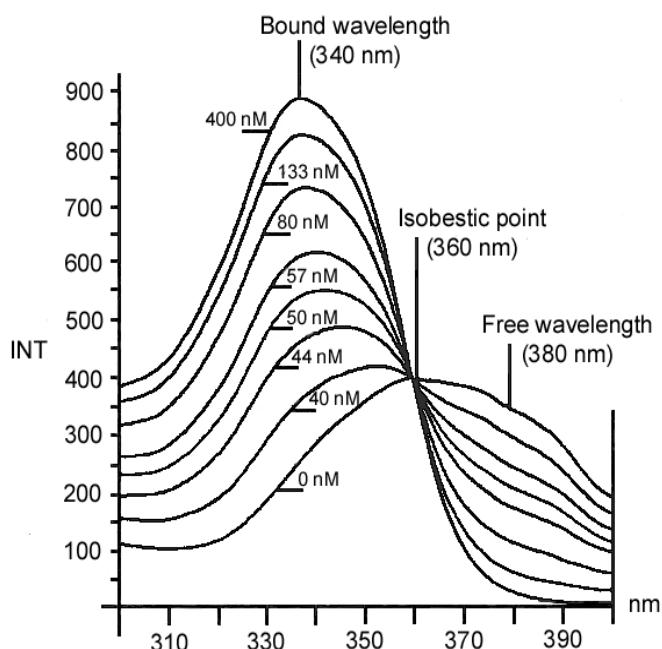


Abb. 3.6: Absorptionsspektrum von freiem Fura (380 nm) und einem Fura- Ca^{2+} -Komplex (340 nm) bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen [32].

Mg^{2+} - und H^+ -Ionen, sodaß insbesondere Änderungen des cytosolischen pH-Wertes einen vernachlässigbaren Einfluß haben. Gleichzeitig ist die Affinität zu Calcium relativ niedrig, wodurch bei nicht aktivierten Zellen ein Großteil des Farbstoffs ungebunden vorliegt, aber nach Zellaktivierung und Anstieg der Calcium-Konzentration um mehrere Größenordnungen fast vollständig Chelat-Komplexe bildet. Der wichtigste Vorteil von Fura ist jedoch, daß durch die Komplexbildung eine Verschiebung der Anregungswellenlänge (das Absorptionsmaximum von freiem Fura liegt über 360 nm, bei Komplexbindung mit Calcium liegt es bei 340 nm) bei gleichbleibender Fluoreszenzwellenlänge stattfindet (beide Anregungszustände emittieren bei 500-510 nm) [Iredale95]. Abbildung 3.6 zeigt das Absorptionsspektrum von freiem und Komplex-gebundenem Fura bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen. Durch diese Wellenlängenabhängigkeit kann die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ aus dem Verhältnis der Fluoreszenz nach abwechselnder Anregung mit 340 und 380 nm bestimmt werden. Dadurch können schlecht kontrollierbare Experimenteinflüsse auf das Meßergebnis vermieden werden, wie z.B. die tatsächliche intrazelluläre Fura-Konzentration oder die Effektivität der Anregung oder der Fluoreszenzbestimmung. Deshalb wurde der Fura-Abkömmling Fura PE3-AM (MoBiTec) verwendet.

Für die Messungen standen im Verlauf der Arbeit zwei sehr unterschiedliche Apparaturen zur Verfügung. Die ersten Messungen wurden an einem inversen Mikroskop durchgeführt (siehe Abb. 3.7). Mit der normalen Lampe und dem Okular wurden etwa 20 konfluierende CHO Zellen pro Gesichtsfeld fokussiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine Quecksilberlampe und ein Filter-Array abwechselnd mit einer Strahlung von 340 und 380 nm Wellenlänge angeregt. Die nach jedem Anregungspuls folgende Fluoreszenz wurde mit einem Photomultiplier gemessen. Aus dem Verhältnis der Flureszenzstrahlung nach Anregung durch die beiden Wellenlängen ergibt sich die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration.

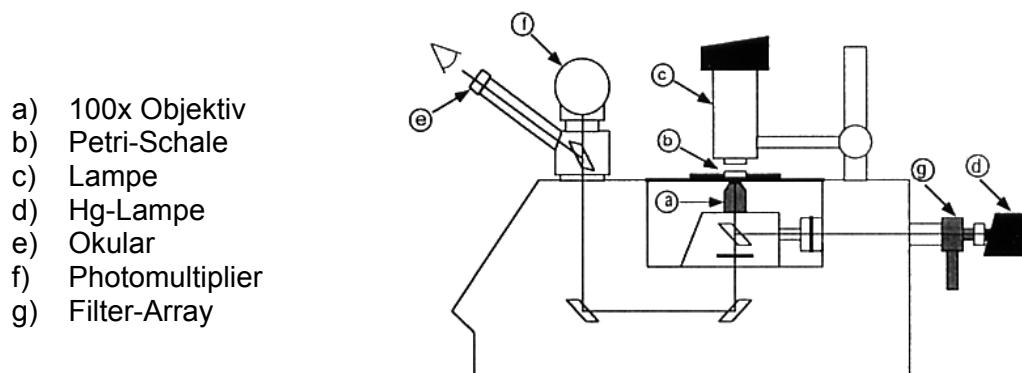


Abb. 3.7: Inverses Mikroskop für die Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration.

24 Stunden vor der Messung wurden jeweils 10^5 CCR5 überexprimierende CHO Zellen in 0,6 ml MEM Alpha Medium mit 10% FCS in kleinen Petri-Schalen in Kultur genommen, d.h. die Messungen wurden mit adhärenten Zellen durchgeführt. Der Boden dieser Petri-Schalen war vorher durch ein Deckglas mit sehr geringer Autofluoreszenz ersetzt worden, um die Messungen nicht zu verfälschen.

Vor der Messung wurden die Zellen mit Calcium-freiem PBS gewaschen und anschließend je Petri-Schale mit 500 μ l Inkubationspuffer (RPMI, 10 mM TCG HEPES, 1 mM Napyr, 2 mM L-Glut., 50 mM B-Mercaptoethanol, 1% FCS, pH 6,8) mit 5 μ l Fura PE-3 (gelöst in 100% DMSO, Endkonzentration 10 μ M) und 0,2% Pluronic versetzt und eine Stunde lichtgeschützt bei 37°C und 75 rpm geschüttelt. Nach einem Waschschritt mit dem Meß-Puffer (HBSS, 10 mM TCG HEPES, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,2, ohne

FCS!), einer 5-minütigen lichtgeschützten Inkubation auf dem Schüttler bei 75 rpm und 37°C in demselben Puffer, einem erneuten Waschschritt und zuletzt Zugabe von 0,5 ml Meß-Puffer waren die Zellen für die Messung bereit.

Nach den gekennzeichneten Zeitpunkten wurden Medium, RANTES, Ionomycin oder Manganchlorid zugegeben. Die Zugabe musste vorsichtig geschehen, um kein Signal durch einen Pipettiereffekt zu erzeugen, aber gleichzeitig sollte möglichst schnell die gewünschte Endkonzentration erreicht werden. Da für die Berechnung der intrazellulären Calcium-Konzentration eine genau Kenntnis der Zusammensetzung des Zytosols nötig wäre, werden die Signale üblicherweise in Prozent der Fura-Sättigung angegeben. Dazu wird durch Zugabe einer hohen Konzentration von Ionomycin die intrazelluläre Calcium-Konzentration so angehoben, daß nahezu 100% Fura-Sättigung erreicht wird. Anschließend werden durch Zugabe von Manganchlorid die Calcium-Ionen vollständig aus der Fura-Bindung verdrängt, da Mn²⁺-Ionen eine wesentlich höhere Affinität besitzen. Gleichzeitig bewirkt die Komplex-Bindung von Fura an Mangan eine starke Dämpfung der Fluoreszenzintensität. Das resultierende Fluoreszenzsignal 340nm/380nm entspricht dabei in etwa einer minimalen Calcium-Konzentration mit 0% Fura-Sättigung.

Obwohl nach Freilegung der maskierten Carboxylgruppen der resultierende hydrophile Farbstoff im Zellinneren gefangen ist, können die Zellen ihn über Transporter wieder aus dem Zytosol entfernen. Bereits 30 Minuten nach Absaugen des Fura-haltigen Inkubationspuffers kann nur noch ein minimales Fluoreszenzsignal gemessen werden. Deshalb ist eine sofortige Messung nach dem letzten Waschschritt zwingend erforderlich. Da die Zellen durch eine zu lange Inkubation in B-Mercaptoethanol geschädigt werden, müssen die Petri-Schalen jeweils einzeln vorbereitet werden, wodurch sich die Anzahl der Messungen auf maximal zehn pro Tag beschränken muß.

Die späteren Calciumflußexperimente wurden an einem Spektrofluorometer (LSB-50, Perkin-Elmer) durchgeführt, bei dem wiederum durch eine Quecksilberlampe und ein schnell rotierendes Filter-Array eine abwechselnde Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs bei 340 und 380 nm stattfindet und sich die Calcium-Konzentration aus dem Verhältnis der entsprechenden Fluoreszenzen ergibt. Hierfür wurden die mit CCR5 transfizierten CHO Zellen vor der Messung mit PBS/1,5 mM EDTA aus den Kulturflaschen abgelöst. Dabei werden für jede geplante Messung etwa 0,5 – 1 x 10⁶ Zellen benötigt. Diese wurden vor der Messung mit Calcium-freiem PBS gewaschen und anschließend in Eppendorfcups mit 1000 µl Inkubationspuffer (RPMI, 10 mM TCG HEPES, 1 mM Napyr, 2 mM L-Glut., 50 mM B-Mercaptoethanol, 1% FCS, pH 6,8) mit 10 µl Fura PE-3 (gelöst in 100% DMSO, Endkonzentration 10 µM) und 0,2% Pluronic versetzt. Darin wurden sie mindestens eine Stunde lichtgeschützt bei 37°C inkubiert und alle 15 Minuten leicht geschüttelt.

Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (Heraeus Biofuge 15, 1800 rpm) und einmal in vorgewärmtem Meß-Puffer (HBSS, 10 mM TCG HEPES, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,2, ohne FCS!) gewaschen, gefolgt von einer 10-20-minütigen lichtgeschützten Inkubation bei 37°C in demselben Puffer, um eine vollständige Hydrolyse des Farbstoffs zu gewährleisten. Die eigentliche Messung erfolgt in speziellen Quarzküvetten mit sehr geringer Autofluoreszenz. Für jede Messung werden 400 µl Zellsuspension (entsprechend 0,5 – 1 x 10⁶ CHO Zellen) in eine Küvette mit einem winzigen Rührfisch überführt und im Spektrometer in einer auf 37°C temperierten Halterung bei konstanter Konzentration und Temperatur gehalten. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die entsprechenden Substanzen zupipettiert, wobei wegen des kontinuierlichen Röhrens die gewünschte Endkonzentration schnell erreicht wird. Die Daten wurden mit der FL-Winlab Software analysiert.

Die Küvetten und Rührfischchen müssen zwischen den Messungen sehr sorgfältig gewaschen werden, um Spuren von Ionomycin, Detergentien, Mangan-Ionen oder der zupipettierten Chemokine zu entfernen. Diese können zu Zellschäden bzw. einem sehr hohen basalen Ca^{2+} -Niveau führen. Deshalb wurden die Küvetten zwischen je zwei Messungen jeweils dreimal mit Aceton und 70%igem Ethanol gespült. Wegen der individuellen Beladung der CHO Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff und der erforderlichen sorgfältigen Reinigung der Quarzküvetten ist auch bei dieser Meßmethode die Anzahl der Messungen pro Tag sehr beschränkt. Gegenüber der Messung mit adhärenten Zellen und einem inversen Mikroskop wird die Fluoreszenz einer größeren Zellzahl gemessen und ausgewertet und man erhält reproduzierbarere Ergebnisse.

3.3.10. Radioaktive Markierung von Proteinen mit ^{125}I

Zur Bestimmung der spezifischen Bindung eines Proteins an einen Rezeptor wird der Ligand markiert. Dies kann entweder mittels eines radioaktiven Isotops oder eines Fluoreszenzfarbstoffs oder Enzyms geschehen. Wegen der Molekülgröße der in Frage kommenden Fluoreszenzfarbstoffe und Enzyme werden durch die Markierung die Bindungsseigenschaften des markierten Proteins häufig stark gestört. Bei der radioaktiven Markierung hingegen genügt oft das Anfügen eines einzigen Atoms pro markiertem Proteinmolekül. Es stehen verschiedene radioaktive Isotope mit unterschiedlichen Halbwertszeiten (HWZ) zur Verfügung. Am gebräuchlichsten sind ^{131}I (HWZ 8 Tage), ^{125}I (HWZ 60 Tage), ^3H (HWZ 12,3 Jahre) und ^{14}C (HWZ 5730 Jahre). Die Sensitivität des Bindungsassay nimmt mit der spezifischen Aktivität der markierten Proteine zu. Deshalb ist eine kurze Halbwertszeit erwünscht, damit ein möglichst großer Anteil der angefügten Isotope zum Signal beiträgt. Trotz der kürzeren Halbwertszeit von ^{131}I wird ^{125}I meist bevorzugt wegen der alleinigen γ -Strahlung und fehlenden β -Strahlung, wegen einer höheren Effizienz bei der Messung der Strahlung und wegen der besseren Verfügbarkeit von ^{125}I . Ein hoher Iodinierungsanteil erhöht die Sensitivität des Bindungsassay. Allerdings darf unabhängig von der Art der Markierungsreaktion die dreidimensionale Proteinstruktur nicht zu stark verändert werden, um verlässliche Bindungsdaten zu erhalten. Dabei wurde als Faustregel eine optimale Iodinierung des zu markierenden Proteins mit durchschnittlich etwas unter einem Iod-Atom pro Proteinmolekül gefunden, wobei die beste Iodinierung empirisch für jedes neue Protein individuell ermittelt werden muß [14].

Proteine können über verschiedene Mechanismen mit ^{125}I markiert werden. Dabei gibt es einstufige Verfahren, bei denen eine direkte Iodinierung bestimmter Aminosäurereste des zu markierenden Proteins erfolgt, und zweistufige Verfahren, bei denen im ersten Schritt ein Trägermolekül iodiniert wird, das dann im zweiten Schritt an das Protein gebunden wird. Zu den üblichen einstufigen Verfahren gehören die Chloramin T Methode und die enzymatische Markierung mit Hilfe von Lactoperoxidase. Bei der direkten Iodinierung wird ein großer Teil der Radioaktivität an Tyrosin- und Histidinreste angefügt. Das markierte Protein kann dabei seine Immunreakтивität durch sterische Effekte, durch oxidativen Schaden während der Markierungsreaktion oder durch Änderungen seiner elektrischen Ladung verlieren.

Das gebräuchlichste Markierungsverfahren ist die zweistufige chemische Iodinierung nach Bolton/Hunter, bei der 3-(*p*-Hydroxyphenyl)-Propionsäure-N-Hydroxysuccinimid (HPPS) als Trägermolekül für ^{125}I dient. HPPS besitzt eine leicht iodinierbare phenolische Hydroxylgruppe und eine Estergruppe, mit der es an Lysine des zu markierenden Proteins binden kann. Da dieses zweistufige Verfahren den meisten Proteinen weniger Schäden zufügt, wird es gewöhnlich bevorzugt. Im Fall von RANTES führt es allerdings zu so starken Veränderungen, daß die Bindung an den Chemokinrezeptor CCR5 nicht nachgewiesen konnte [73,91].

Für RANTES wurde in dieser Arbeit deshalb die Chloramin T Methode verwendet, die in einem Schritt eine reproduzierbare, schnelle und effiziente Markierung erlaubt. Das Iod wird dabei insbesondere an Tyrosin- und in geringerem Maße an Histidinreste angefügt (siehe Abb. 3.8).

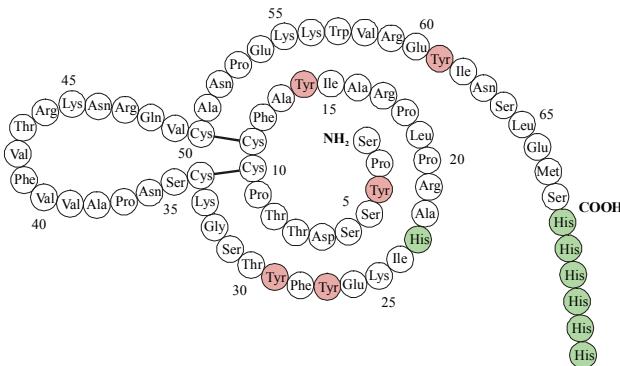


Abb. 3.8: Bei der radioaktiven Markierung mit ^{125}I über die Chloramin T Methode wird das Iod insbesondere an Tyrosin- und in geringerem Maße an Histidinreste angefügt.

Die Markierungsreaktion enthält 10 µl einer frisch angesetzten Chloramin T Lösung (30 mg Chloramin T gelöst in 10 ml H₂O), 10 µl mit gereinigtem RANTES in einer Konzentration von 0,7 – 1,5 mg/ml und 15 µl mit 0,5 mCi $^{125}\text{I}^-$ gelöst in 0,5 M Phosphatpuffer mit pH 7,6. Nach 20 – 30 s Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird die weitere Iodinierung durch Zugabe von 20 µl Natriumdisulfit (30 mg in 10 ml H₂O) unterdrückt und das gesamte Reaktionsvolumen sofort auf eine Sephadex G 25 Säule gegeben, die vorher mit 1 ml PBS/4%BSA gespült wurde, um die Bindung des markierten Proteins an die Säule zu verhindern. Anschließend wird mit 20 ml PBS eluiert, das in Fraktionen von je 0,5 ml gesammelt wird. Von diesen Fraktionen werden je 10 µl in ein anderes Reaktionsgefäß überführt und die Aktivität mittels eines 16fach γ -Counters bestimmt. Das markierte Protein befindet sich üblicherweise in den Fraktionen 5 und 6 und kann für einige Tage bei 4°C aufbewahrt werden. Das nicht gebundene Iod, dem in der Säule ein viel größeres Volumen zur Verfügung steht, wird erst ab Fraktion 10 von der Säule eluiert.

Eine optimale Iodinierung wird von mehreren Parametern beeinflusst. Die Chloramin-T Konzentration muß ausreichen, um eine effiziente Iodinierung zu erreichen, darf aber nicht zu hoch gewählt werden, um unspezifische oxidative Schädigung des Proteins zu vermeiden. Eine effektive Iodinierung hängt stark von der Proteinkonzentration ab, die im Bereich von 1 mg/ml oder darüber liegen sollte, um eine hohe spezifische Aktivität zu erreichen. Der optimale pH-Wert liegt für die meisten Proteine zwischen 7,3 und 7,8 und wird durch einen 0,5 M Phosphatpuffer gewährleistet. Die Reaktion findet sehr schnell statt und benötigt in den meisten Fällen weniger als eine Minute. Um Überiodinierung oder unspezifische Schädigung des Proteins zu vermeiden, muß die Reaktion dann mit einem Überschuß einer reduzierenden Substanz – üblicherweise Natriumdisulfit – unterbrochen werden. Die direkt anschließende Reinigung trennt das markierte Protein von noch ungebundenem Iod und Iod-Oxidationsprodukten.

3.3.11. Bindungs-Assay

Um Bindungsparameter wie die Affinitätskonstante oder die durchschnittliche Anzahl der Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche zu bestimmen, müsste man die spezifische Aktivität des radioaktiv markierten Proteins genau kennen. Diese kann durch Verdrängungsexperimente mit einer konstanten Konzentration eines markierten Proteins und steigenden Konzentrationen desselben unmarkierten Proteins bestimmt werden. Die Bindungsparameter lassen sich dann mittels einer Scatchard Plot Analyse ermitteln [14]. In dieser Arbeit sollte allerdings nur die Bindung der RANTES Modifikationen im Vergleich zu unmodifiziertem RANTES qualitativ untersucht werden, ohne die genauen Bindungsdaten zu bestimmen. Dazu wurde eine konstante Konzentration von markiertem RANTES verdrängt durch steigende Konzentrationen der RANTES Modifikationen jeweils im Vergleich zur parallel durchgeführten Kontrolle mit Verdrängung durch unmodifiziertes RANTES.

Für Bindungsexperimente wurden CHO-Zellen verwendet, die stabil mit CCR5 oder CXCR4 transfiziert sind und die entsprechenden Chemokinrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche überexprimieren. Dabei können die ganzen lebenden Zellen eingesetzt werden. Es ist nicht nötig, vorher eine Membranpräparation durchzuführen. Für jeden geplanten Meßwert werden etwa 1×10^6 Zellen benötigt. Diese werden vor der Messung mit PBS/1,5 mM EDTA aus den Kulturflaschen abgelöst und einmal mit α -MEM/10% FCS gewaschen. In 96 Well Microtiterplatten werden in jeweils 40 μl α -MEM/10% FCS Verdünnungsreihen von unmarkiertem RANTES und seinen Modifikationen mit Konzentrationen von 0 nM bis 1550 nM (entsprechend einer Endkonzentration von 0 nM bis 625 nM) vorbereitet. Dazu werden in jedes Well 40 μl der Zellsuspension in α -MEM/10% FCS mit etwa 1×10^6 Zellen zugegeben und zuletzt 20 μl α -MEM/10% FCS mit einer konstanten Menge von radioaktiv markiertem RANTES (1 nM Endkonzentration) dazupipettiert. Es folgt eine Inkubation von 60 Minuten auf Eis. Anschließend werden die CHO Zellen in der Microtiterplatte bei 1800 rpm (Heraeus Biofuge) abzentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet durch Schütteln im verbliebenen Flüssigkeitsrest resuspendiert. Es folgen vier Waschschritte mit Zugabe von jeweils 200 μl eiskaltem PBS je Well, erneuter Zentrifugation und Abkippen des Überstands. Im letzten Schritt werden die Zellen in 100 μl PBS aufgenommen und der Inhalt jedes Wells sehr sorgfältig in je ein 1,5 ml Eppendorfcup überführt. Die Aktivität der einzelnen Eppendorfcups wird jeweils eine Minute lang in einem 16 fach γ -Counter gemessen. Bis zur Messung können die Cups einige Tage bei beliebiger Temperatur gelagert werden, da für alle Cups gleichermaßen die Aktivität nur mit der Halbwertszeit für ^{125}I von 60 Tagen abnimmt unabhängig vom Zustand der Zellen.

Für alle Bedingungen wurden vier parallele Ansätze durchgeführt, da die zum Schluß bestimmte Aktivität des ^{125}I Zerfalls von der absoluten Zahl der markierten Proteinmoleküle und der eingesetzten Zellen abhängt. Deshalb machen sich Fehler bei der Pipettiergenauigkeit oder Verlust von Zellen bei notwendigen Waschschritten viel stärker bemerkbar als z.B. bei der FACS-Analyse. Durch die Bestimmung von Vierfachwerten können jedoch gut reproduzierbare Mittelwerte mit relativ kleinen Standardabweichungen für die Aktivität der Strahlung erreicht werden.

Wegen der langen Reichweite der γ -Strahlung in Luft müssen alle Schritte insbesondere bei der radioaktiven Markierung, aber auch bei den einzelnen Experimenten durch Bleiziegel und spezielle, für γ -Strahlung geeignete Schirme abgeschirmt werden. Alle anfallenden flüssigen und festen Abfälle werden getrennt gesammelt und im Abklingraum 10 Halbwertszeiten lang aufbewahrt, bevor sie über den üblichen Laborabfall entsorgt werden können. Deshalb erfolgt auch das Abkippen des Überstands aus den Microtiterplatten über einen großen Trichter in eine Sammelflasche aus Glas.

3.3.12. Reinigung und Aktivierung von Thrombozyten

Für die Gewinnung von Thrombozyten wurde ein mit Natriumcitrat antikoaguliertes Blut von Spendern 20 Minuten lang bei 180 g zentrifugiert. Das Plasma mit den darin enthaltenen Thrombozyten wurde sorgfältig abgenommen und für 15 Minuten bei 37°C mit 1 mM Aspirin und 0,3 U/ml Apyrase (Sigma) inkubiert. Nach Zugabe von Zitronensäure mit einer Endkonzentration von 9 mM und EDTA mit einer Endkonzentration von 5 mM wurde das Plasma für 20 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands wurde das Pellet im Puffer B (138 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.36 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES, 0.6 U/ml Apyrase) bei pH 6,2 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurde das Pellet im Puffer B bei pH 7,4 mit zusätzlich 5 mM Glucose resuspendiert und auf eine Endkonzentration von 1×10^6 Thrombozyten / µl verdünnt.

Bei den entsprechend gekennzeichneten Experimenten wurden die Thrombozyten für 10 Minuten mit 1 U/ml Thrombin (Sigma) oder 100 µg/ml Kollagen (Nycomed, Ismaning) aktiviert. Zellfreier Überstand wurde erzeugt durch Zentrifugation des Plasmas für 15 Minuten bei 4000 g.

4. Ergebnisse

4.1. Entwicklung und Herstellung von NH₂-terminalen RANTES-Modifikationen

Ausgehend von den bereits bekannten antagonistischen Eigenschaften von Met-RANTES und AOP-RANTES wurden in einer ersten Generation von Modifikationen verschiedene saure, neutrale und basische Aminosäuren an den NH₂-Terminus von RANTES angefügt (siehe Abb. 4.1 und 4.2).

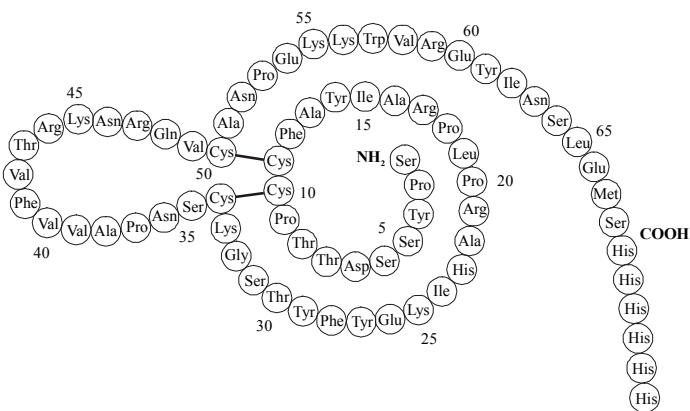


Abb. 4.1: Aminosäurestruktur von RANTES. An den COOH-Terminus ist bereits eine Sequenz aus sechs Histidinen angefügt, die eine einfache Reinigung mittels Affinitätschromatographie erlaubt. Die NH₂-terminalen Modifikationen sind an das Serin angefügt.

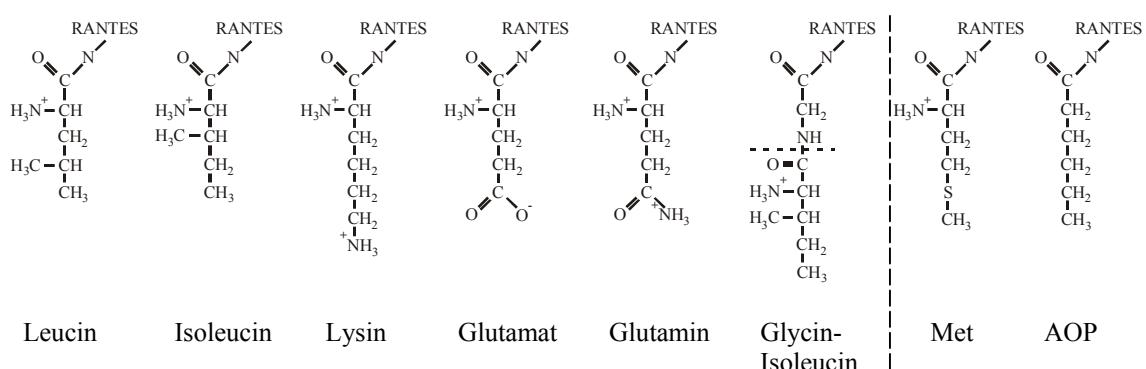


Abb. 4.2: Erste Generation der RANTES-Modifikationen. Analog zu Met-RANTES und AOP-RANTES wurden verschiedene saure, neutrale und basische Aminosäuren an den NH₂-Terminus von RANTES angefügt.

Nachdem erste Ergebnisse eine vergleichbar starke Bindung und Rezeptorinternalisierung für Isoleucin-Glycin-RANTES wie für RANTES zeigten, wurden in einer zweiten Generation verschiedene Kombinationen aus zwei zusätzlichen NH₂-terminalen Aminosäuren getestet. Außerdem zeigte sich bei eukaryontischer RANTES-Expression in CHO-Zellen, daß ein großer Teil des exprimierten Chemokins degradiert und um zwei bis drei

NH_2 -terminale Aminosäuren verkürzt war. Da auch dieses um zwei Aminosäuren verkürzte $\Delta 2$ -RANTES eine stärkere Bindung und Rezeptorinternalisierung als RANTES zeigte, wurden in einer dritten Generation verschiedene Aminosäurekombinationen an den NH_2 -Terminus von $\Delta 2$ -RANTES angefügt (siehe Abb. 4.3).

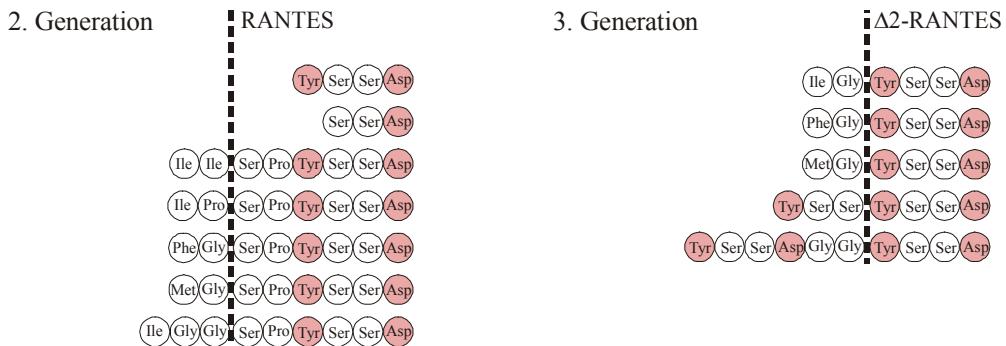


Abb. 4.3: 2. und 3. Generation der RANTES-Modifikationen.

4.1.1. Primer-Design

Für die Subklonierung der Modifikationen stand der OA-Vektor für periplasmatische Expression zur Verfügung. Dieser OA-Vektor enthält einen lac Promotor und eine Shine-Dalgarno-Sequenz, welche als Ribosomenbindungsstelle in Prokaryonten dient. Anschließend folgen das Startcodon und die DNA-Codierung für die OmpA-Startsequenz des „outer membrane protein A“ von E.coli. An deren 3'-Ende befindet sich eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Fsp1. Für den Einbau der zusätzlichen NH_2 - und COOH-terminalen Aminosäuren mußten die entsprechenden Primer entworfen werden. Die 5'-Primer der RANTES-Modifikationen beginnen mit einer Verlängerung aus drei Adenosin, damit das Restriktionsenzym ansetzen kann, danach folgt die Fsp1-Schnittstelle (TGC GCA) und die übrigen vier Basen der OmpA-Startsequenz (GGCC). Im Anschluß daran wurden die gewünschten Veränderungen eingebaut, z.B. die Basen CTT für ein zusätzliches Leucin (siehe Abb. 4.4 a). Danach folgt ein Teil der RANTES-cDNA-Sequenz, dessen Länge so gewählt ist, daß sich eine errechnete Annealing-Temperatur von 52°C ergibt (siehe „Polymerase Kettenreaktion“ in Kapitel 3.1.).

Da für die 3'-Primer die Amplifikation in umgekehrter Richtung 3' → 5' erfolgen soll, ist die Primersequenz spiegelverkehrt zur „normalen“ 5' → 3'-Sequenz und enthält die jeweils komplementären Basen ($C \leftrightarrow G$, $A \leftrightarrow T$). Die 3'-Primer beginnen mit einer Verlängerung von drei Basen, gefolgt von einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym Sal1 (GTC GAC). Im Beispiel RANTES-6His-Sal (Abb. 4.4 b) folgen direkt im Anschluß das Stopcodon CTA (entsprechend TAG gespiegelt und mit den komplementären Basen) und die komplementäre und gespiegelte DNA-Sequenz für sechs Histidine (CAT CAC CAT CAC CAT CAC), die am COOH-Terminus von RANTES angefügt wurden. Die zur normalen RANTES-Sequenz komplementäre Primer-DNA ist wieder so gewählt, daß sich eine errechnete Annealing-Temperatur von 52°C ergibt.

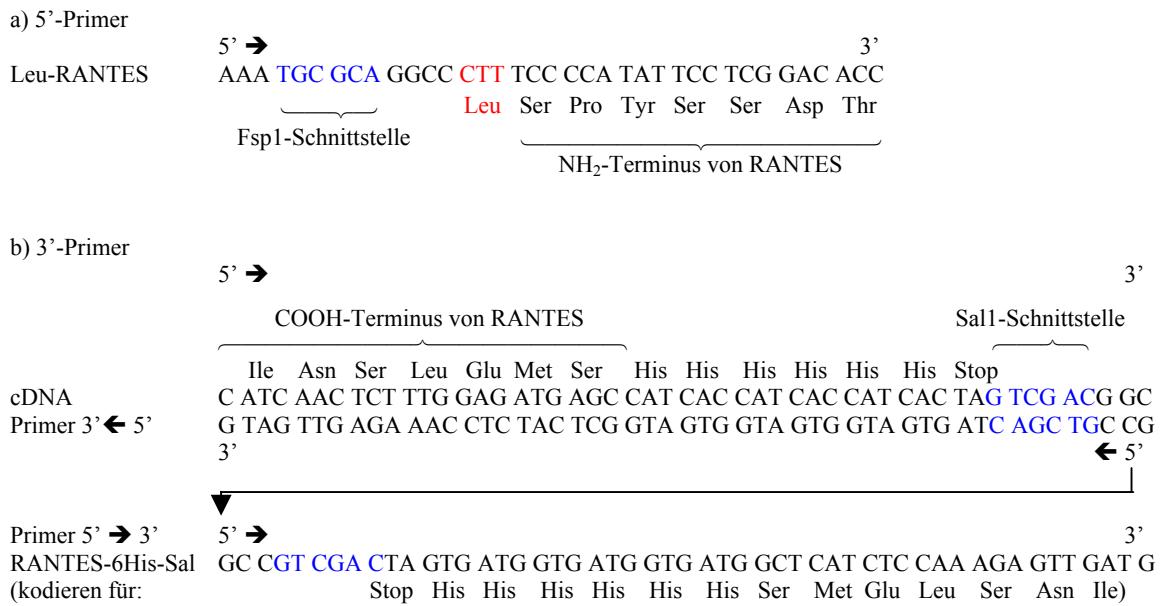


Abb. 4.4: DNA-Sequenz je eines 5'- (Leu-RANTES, a)) und eines 3'-Primers (RANTES-6His-Sal, b)). Der gemeinsame Anteil mit der unmodifizierten RANTES-cDNA des NH₂-Terminus bzw. des COOH-Terminus ist so gewählt, daß die errechnete Annealing-Temperatur 52°C beträgt. Da der 3'-Primer eine Amplifikation entgegen der normalen 5' → 3'-Sequenz von RANTES bewirken soll, besteht seine Sequenz aus den zur RANTES-cDNA komplementären Basen in spiegelverkehrter Reihenfolge.

4.1.2. Subklonierung der RANTES-Modifikationen

Mit diesen Primern wurde die PCR Reaktion durchgeführt, die amplifizierte DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, und die Bande mit der modifizierten RANTES-cDNA jeweils ausgeschnitten. Die DNA wurde mittels Phenolextraktion aus dem Agarosegel gelöst, mit den Restriktionsenzymen Fsp1 und Sal1 verdaut und anschließend in den OA-Vektor subkloniert, der mit den selben Enzymen präpariert wurde.

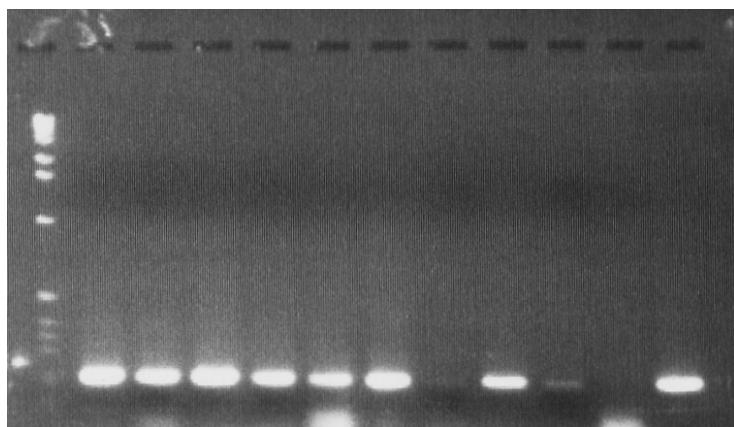


Abb. 4.5: Agarosegel mit PCR-Amplifikation des modifizierten RANTES-cDNA-Fragments zum Screening positiver Klone. Die Fragmentlänge liegt bei 350 – 400 bp.

Nach Transformation von kompetenten *E. coli* mit den so gewonnenen Plasmiden wurden die auf dem Agar wachsenden Klone mittels PCR mit den gleichen wie zur Präparation verwendeten Primern getestet. Abb. 4.5 zeigt ein typisches Agarosegel mit positiven und negativen Klonen. Die entsprechenden Banden liegen je nach Modifikation zwischen 350 und 400 bp.

Von allen subklonierten Modifikationen wurde von jeweils einem positiven Subklon die Plasmid-DNA präpariert und die DNA des modifizierten RANTES-Fragments sequenziert. Dazu wurde der Primer 5' H-Li verwendet, der etwas über 50 bp vor dem NH₂-Ende des DNA-Fragments bindet.

4.1.3. Periplasmatische Expression und Periplasmalyse

Zur Optimierung der Ausbeute bei der periplasmatischen Expression wurden die Inkubationszeiten und -temperaturen und die zugefügte Menge an IPTG, das zur Induktion der Expression über den lac Promotor führt, in parallelen Ansätzen variiert. Die optimale Chemokin-Ausbeute für eine Liter-Kulturflasche *E. coli* wird erzielt mit Inkubation und Wachstum der Bakterien bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,9, gemessen bei 550 nm. Nach Zugabe von 1 g IPTG folgt eine weitere Inkubation über vier Stunden bei Raumtemperatur (20°C). Eine höhere Temperatur führt verstärkt zu Bakterienwachstum anstatt zur Proteinexpression. Bei kürzerer Inkubationszeit haben die Bakterien noch nicht ihre volle Expressionskapazität ausgeschöpft, wohingegen bei längerer Inkubationszeit offenbar schon zu viele Bakterien absterben und das Chemokin durch die dabei freigesetzten intrazellulären Proteasen degradiert wird.

Die Periplasmalyse kann entweder durch Inkubation in einem Borsäure-haltigen Puffer (BBS) oder durch vier Zyklen mit abwechselndem Einfrieren bei -80°C und Auftauen bei +37°C erfolgen. Dabei stellte sich die letzte Methode als wesentlich ergiebiger heraus, so daß sie im folgenden ausschließlich verwendet wurde.

Die erzielte Ausbeute im Periplasmalysat wurde jeweils über einen Sandwich-ELISA bestimmt. Für die funktionellen Tests wurde das Periplasmalysat entweder sofort verwendet, oder für kurze Zeit bei -20°C gelagert. Zur längerfristigen Lagerung oder für Experimente, bei denen höhere Chemokinkonzentrationen benötigt wurde, wurden die Periplasmalysate gereinigt.

4.1.4. Reinigung mittels Affinitätschromatographie

Zur Reinigung wurde das Periplasmalysat eine Stunde bei 4°C mit Ni-NTA Agarose (QIAGEN) geschüttelt. Dabei entsteht eine Metallchelat-Bindung zwischen dem Histidin-Tag und den Nickel-Ionen, wodurch das Chemokin fast vollständig aus dem Überstand gewonnen wird, wie durch eine Konzentrationsbestimmung mit ELISA überprüft wurde. Anschließend wurde die Agarose auf eine Säule geladen und über eine FPLC eluiert, nachdem erst andere Proteine mit einer geringeren Affinität zum Nickel von der Säule gewaschen waren. Zur Elution des Chemokins wurden ein Imidazol-Stufengradient im Vergleich zu einem pH-Stufengradienten angewendet und das Eluat in Fraktionen von jeweils einem Milliliter gesammelt. Da der pH-Stufengradient eine bessere Aufreinigung durch effektivere Elution der Verunreinigungen in den vorangehenden Waschschriften und eine schärfere Elution des Chemokins in wenigen Fraktionen ermöglicht und andererseits RANTES bekanntermaßen sehr säurestabil ist [81], wurde im folgenden ein pH-Stufengradient zur Reinigung verwendet. Dadurch kann außerdem die Dialyse zur Entfernung des Imidazols vermieden werden. Abb. 4.6 zeigt ein typisches Chromatogramm.

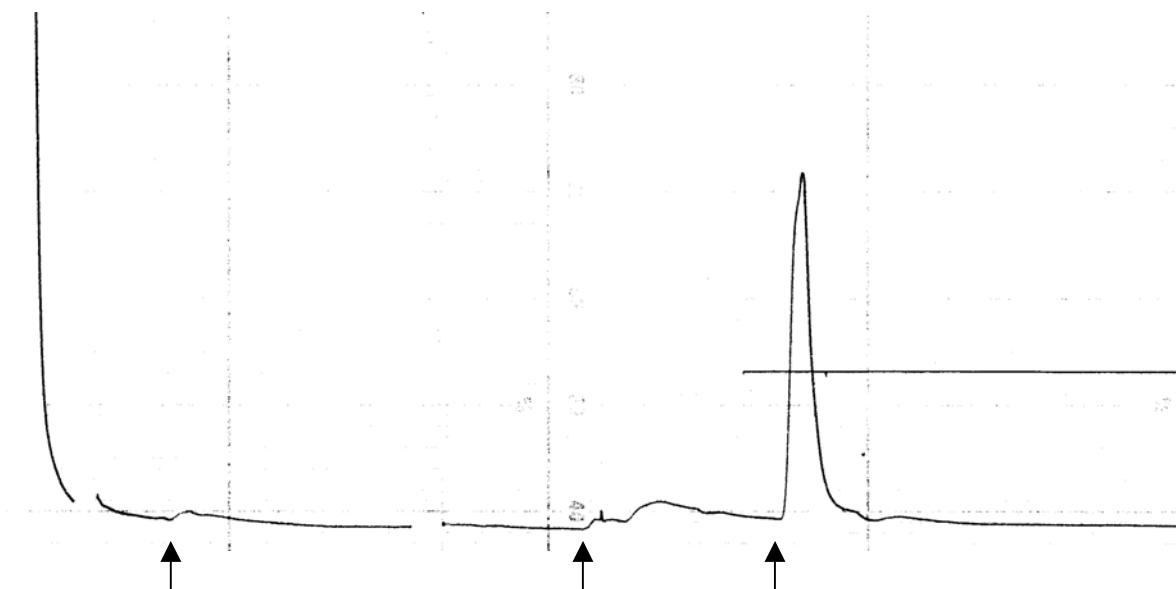


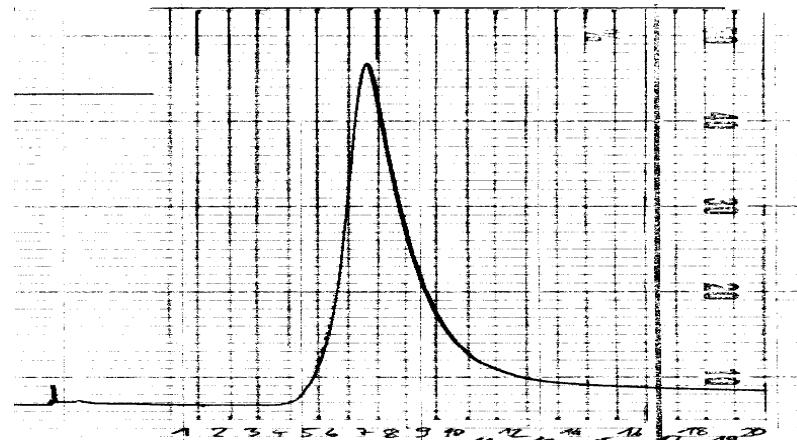
Abb. 4.6: Chromatogramm bei Reinigung von RANTES-6His mittels Affinitätschromatographie über eine FPLC-Säule mit Ni-NTA-Agarose (QIAGEN)

4.1.5. Konzentrationsbestimmung mittels ELISA

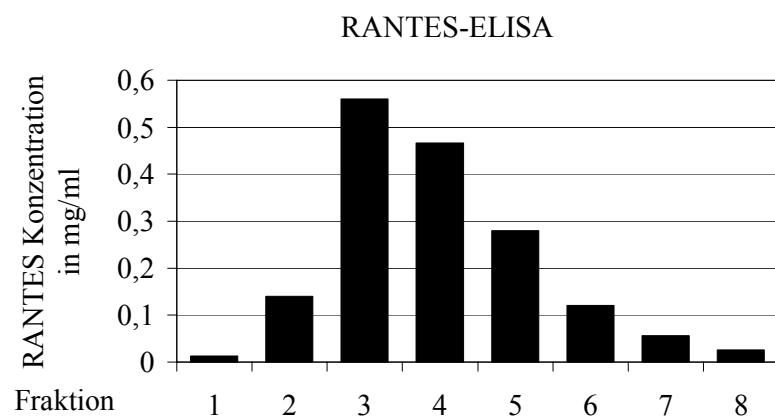
Die RANTES-Konzentration des Periplasmalysats, des Überstands nach Bindung an die Ni-NTA-Agarose und der einzelnen Elutionsfraktionen wurde über einen Sandwich-ELISA bestimmt. Dazu standen die gereinigten anti-RANTES-Antikörper VL3 und VL1-HRP zur Verfügung, die auch in kommerziell erhältlichen RANTES-ELISAs Verwendung finden. Der letztere ist dabei an Peroxidase gekoppelt, die über Oxidation von ABTS zu einer Grünfärbung führt, die proportional zur Konzentration der Peroxidase und damit des Chemokins ist.

Die beiden Antikörper VL1 und VL3 binden dabei an RANTES-Epitope, die durch die NH₂-terminalen und COOH-terminalen Veränderungen nicht beeinflusst werden. Durch Ersetzen von VL3 durch einen anti-6His-Antikörper ergaben sich die gleichen Konzentrationsverhältnisse für RANTES-6His im Vergleich zu den Modifikationen wie im ursprünglichen ELISA. Außerdem korrelieren die im ELISA bestimmten Konzentrationen von gereinigtem periplasmatischem RANTES-6His und synthetischem RANTES ohne His-Tag mit der Bandenstärke der beiden Proteine in der SDS-Gelelektrophorese. Der RANTES-ELISA kann also ohne Einschränkungen für die RANTES-Modifikationen verwendet werden.

a)



b)



c)

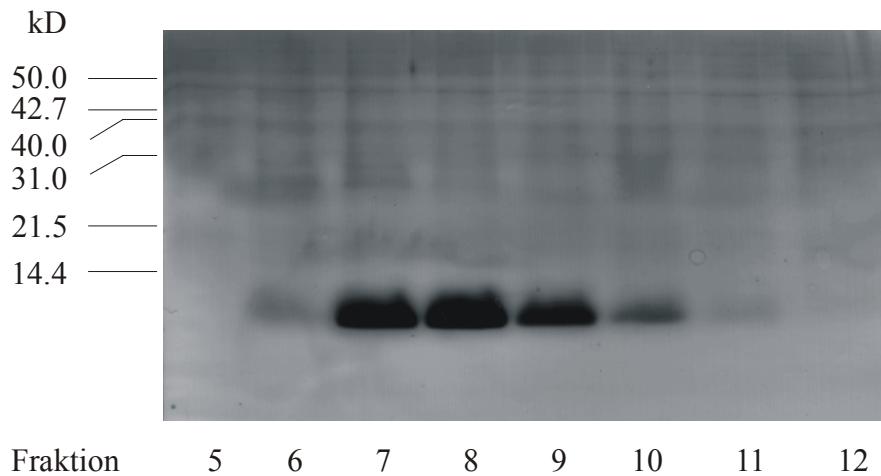


Abb. 4.7: a) Ausschnitt eines Chromatogramms, das den RANTES-Peak zeigt, der in den Fraktionen 5 bis 12 aufgefangen wurde.

b) Bestimmung der RANTES-Konzentration mittels ELISA in denselben Fraktionen.

c) Dieselben Fraktionen aufgetragen auf einem Polyacrylamid-Proteingel. Mittels Western Blot (nicht dargestellt) wurde gezeigt, daß die Banden RANTES entsprechen. Die einstufige Reinigung mittels Affinitätschromatographie ist sehr effektiv, weitere Banden sind nur schwach erkennbar.

4.1.6. Nachweis des rekombinanten Proteins in SDS-PAGE und Western Blot

Bis zur Optimierung der Reinigung wurde anfangs nach jeder Reinigung zur Kontrolle ein Coomassie-gefärbtes Polyacrylamid Proteingel und parallel dazu ein Western Blot angefertigt.

Da die verfügbaren anti-RANTES-Antikörper offenbar nur dreidimensionale RANTES-Epitope bei intakter Tertiärstruktur erkennen, sind sie für einen Western Blot nicht geeignet, nachdem das Protein mittels SDS denaturiert wurde. Zur Anfärbung im Western Blot wurde deshalb ein Antikörper gegen den Histidin-Tag verwendet, womit RANTES-6His und alle Modifikationen dargestellt werden konnten, die auch den C-terminalen Histidin-Tag besitzen.

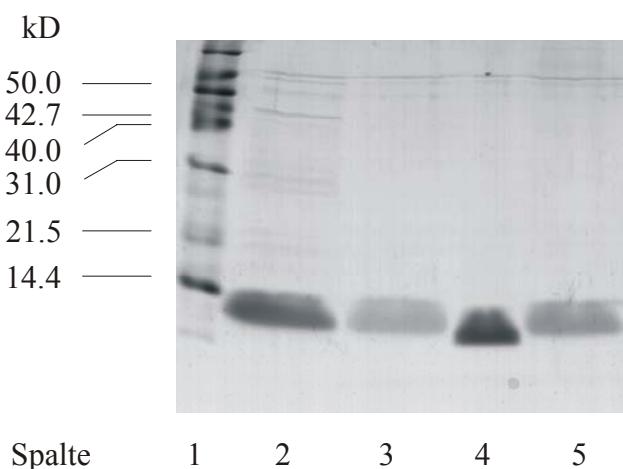


Abb. 4.8: Darstellung von gereinigtem RANTES aus verschiedenen Expressionssystemen auf einem mit Coomassie gefärbten Polyacrylamid Proteingel. Spalte 1 zeigt den Größenmarker. In Spalte 2 und 3 ist RANTES-6His aufgetragen, das im Periplasma von *E. coli* exprimiert wurde. Spalte 4 zeigt RANTES, das in inclusion bodies im Zytoplasma von *E. coli* exprimiert und daraus gereinigt und anschließend mittels eines Faltungs-Protokolls renaturiert wurde. Spalte 5 zeigt RANTES-6His exprimiert in eukaryontischen CHO-Zellen. Die Größe von humanem RANTES beträgt ca. 8 kD. Das periplasmatische und das eukaryontische RANTES in den Spalten 2, 3 und 5 ist etwas größer wegen des zusätzlichen His-Tags aus 6 Histidinen.

4.2. Periplasmatisches RANTES-6His zeigt die gleiche Funktion wie RANTES ohne C-terminalen His-Tag aus anderen Expressionssystemen

Nach erfolgreicher Expression von RANTES im periplasmatischen Spalt von *E. coli* mußte als erstes gezeigt werden, daß der C-terminale His-Tag keinen Einfluß auf die Bindung und Aktivierung des Chemokinrezeptors CCR5 hat. In einem zweiten Schritt mußte gezeigt werden, daß das periplasmatische RANTES-6His die volle Funktionalität im Vergleich zu RANTES aus anderen Expressionssystemen besitzt.

4.2.1. Periplasmatisches RANTES mit und ohne C-terminalen His-Tag

Um einen Einfluß des C-terminalen His-Tags auf die Bindung und Zellaktivierung über den Chemokinrezeptor CCR5 auszuschließen, wurde die Rezeptorinternalisierung durch Periplasmalysat mit RANTES mit und ohne His-Tag flowzytometrisch untersucht. Im Vergleich dazu sind außerdem die Internalisierung durch gereinigtes periplasmatisches RANTES-6His, durch Periplasmalysat ohne RANTES und durch den zur Reinigung verwendeten Elutionspuffer dargestellt.

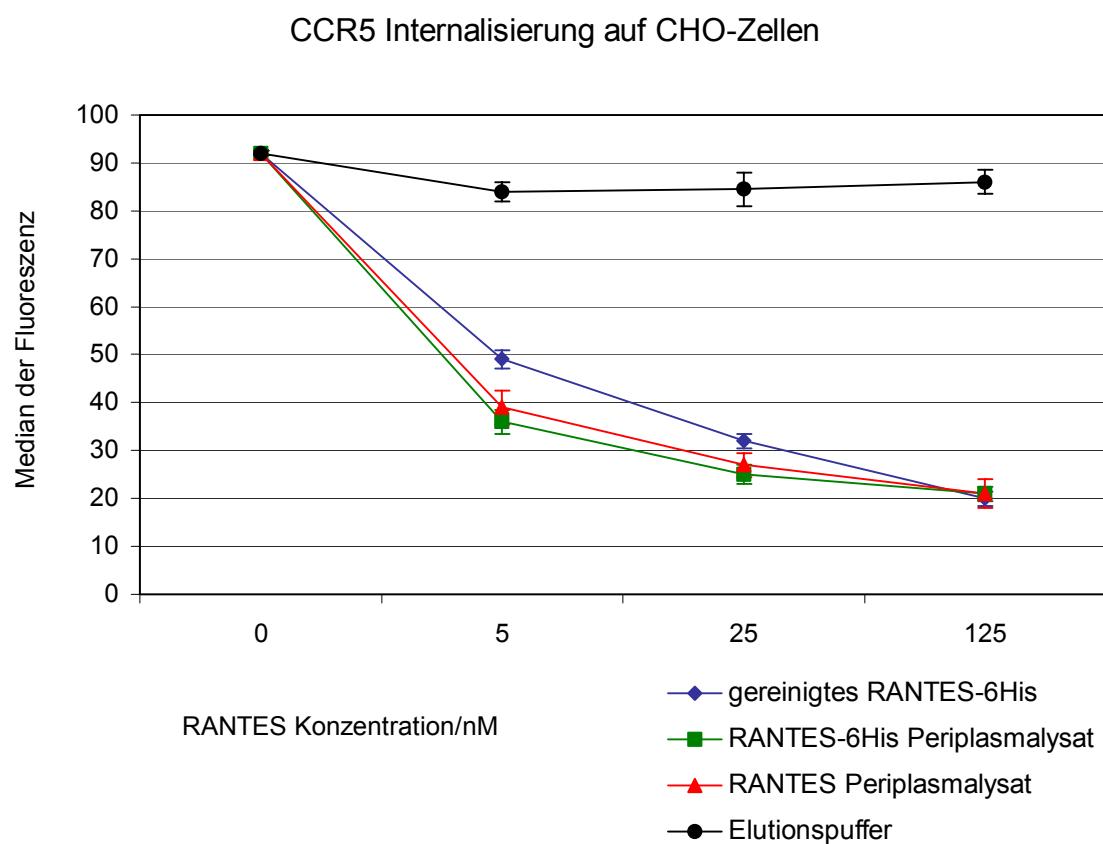


Abb. 4.9: Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5 durch ungereinigtes und gereinigtes RANTES mit und ohne His-Tag.

In Abb. 4.9 entspricht der Wert bei 0 nM einer Positivkontrolle, bei der die Zellen ausschließlich mit Kulturmedium inkubiert wurden. Dies entspricht also der maximalen Anzahl von auf der Zelloberfläche anfärbbaren Rezeptoren. Im Vergleich dazu erkennt man, daß der zur Reinigung verwendete Elutionspuffer keinen Einfluß auf die Rezeptoren

hat. Periplasmalysat mit RANTES führt zu einer konzentrationsabhängigen deutlichen Rezeptorinternalisierung auf etwa 25 % des Ausgangswertes. Dabei ist die Kurve für RANTES-6His identisch mit derjenigen für RANTES ohne den C-terminalen His-Tag. Die Kurve für gereinigtes RANTES-6His entspricht weitgehend den Kurven für Periplasmalysat von RANTES mit und ohne den C-terminalen His-Tag.

Der C-terminale His-Tag hat also keinen Einfluß auf die CCR5 Internalisierung. Außerdem wird die Aktivität des periplasmatischen RANTES-6His durch den bei der Reinigung verwendeten Puffer mit pH 3,2 offenbar nicht beeinträchtigt.

4.2.2. CCR5 Internalisierung durch RANTES aus verschiedenen Expressionssystemen

Um die volle Funktionalität von gereinigtem periplasmatischem RANTES zu zeigen, wurde es im Vergleich zu RANTES aus drei anderen Expressionssystemen getestet. Dazu standen in eukaryontischen CHO-Zellen exprimierte, in inclusion bodies im Zytosoma von E. coli exprimierte [24] und „synthetisches“ – aus einzelnen Aminosäuren chemisch hergestelltes [20] – RANTES zur Verfügung. Außerdem wurde synthetisch hergestelltes, um die beiden letzten NH₂-terminalen Aminosäuren verkürztes Δ2-RANTES mit dem

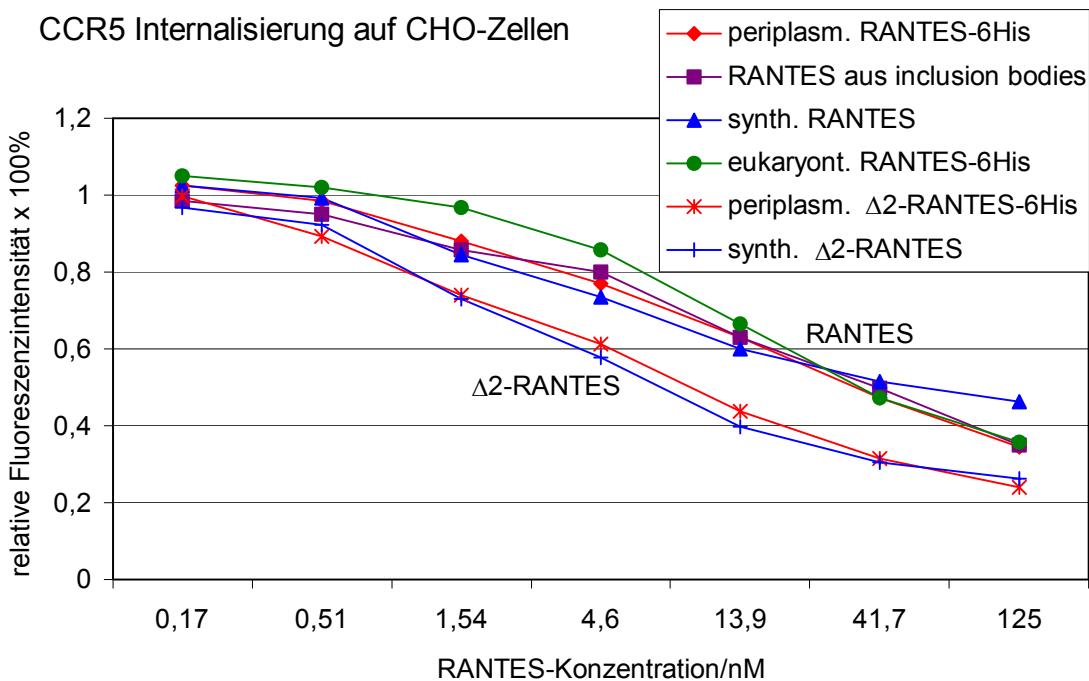


Abb. 4.10: Flowzytometrische Untersuchung der Expression von CCR5 auf der Oberfläche von CHO-Zellen. Die Internalisierung des Rezeptors ist nahezu identisch für RANTES aus vier verschiedenen Expressionssystemen und für Δ2-RANTES aus zwei verschiedenen Expressionssystemen.

periplasmatischen Δ2-RANTES verglichen. Dabei zeigt sich in der flowzytometrischen Untersuchung der Rezeptorexpression auf CHO-Zellen (siehe Abb. 4.10), daß RANTES aus allen vier Expressionssystemen eine identische konzentrationsabhängige Internalisierung von CCR5 zeigt. Dasselbe gilt für synthetisches im Vergleich zu periplasmatischem Δ2-RANTES.

4.2.3. CCR5 Recycling durch RANTES aus verschiedenen Expressions-systemen

Nach der Bindung eines Chemokins an den entsprechenden Rezeptor werden Ligand und Rezeptor zusammen mit einem Stück Zellmembran in das Zellinnere eingestülpt. Dort wird der Ligand vom Rezeptor abgetrennt und verarbeitet. Die Rezeptoren sind damit wieder funktionsfähig und werden erneut an die Zelloberfläche gebracht, wo sie durch spezifische Antikörper angefärbt und flowzytometrisch dargestellt werden können.

Abb. 4.11 zeigt ein identisches Rezeptorrecycling für periplasmatisches und eukaryontisches RANTES-6His sowie für synthetisches RANTES und RANTES aus inclusion bodies von *E. coli*. Dabei wurden alle in einer Konzentration von 125 nM eingesetzt, bei der es zur maximalen Rezeptorinternalisierung mit einer Verminderung der Fluoreszenzintensität auf unter 40% des Wertes der Positivkontrolle (Inkubation mit Kulturmedium ohne Chemokin während der Internalisierung der anderen Proben) kommt. Bereits nach zusätzlicher 30-minütiger Inkubation der CHO-Zellen bei 37°C in Kulturmedium ohne Chemokin erreicht die Fluoreszenzintensität wieder 80% des Ausgangswertes, d.h. etwa zwei Drittel der internalisierten Rezeptoren sind wieder auf der Zelloberfläche nachweisbar. Nach 60 Minuten Recyclingzeit befinden sich offenbar fast alle internalisierten Rezeptoren wieder auf der Zelloberfläche. Der C-terminale His-Tag hat dabei offensichtlich keinen Einfluß auf die Abtrennung des Liganden vom Rezeptor in den CHO-Zellen.

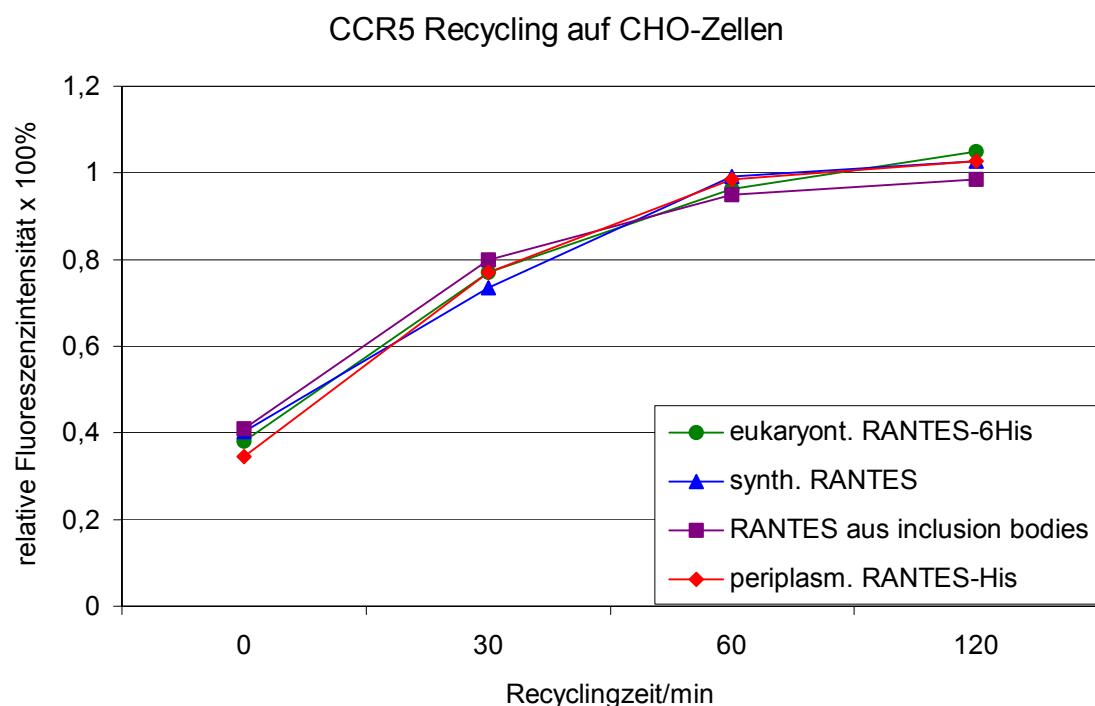


Abb. 4.11: Flowzytometrische Untersuchung des Rezeptorrecyclings von CCR5 auf der Oberfläche von CHO-Zellen. Das Recycling ist identisch für RANTES aus vier verschiedenen Expressionssystemen.

4.2.4. Intrazelluläre Calcium-Mobilisation durch RANTES aus verschiedenen Expressionssystemen

Als zweite Methode zum Nachweis der vollen Funktionalität von periplasmatisch exprimiertem RANTES wurde die intrazelluläre Calcium-Mobilisation von CCR5-positiven CHO Zellen durch periplasmatisches RANTES im Vergleich zu RANTES aus inclusion bodies von E. coli untersucht. In Abb. 4.12 ist ein Kontrollexperiment dargestellt. Man erkennt, daß sich durch Zugabe des für die Reinigung von RANTES verwendeten Elutionspuffers (in Calcium-Meßpuffer verdünnt entsprechend der RANTES-Verdünnung) zu den Zeitpunkten 100 s und 160 s kein Signal induzieren lässt. Insbesondere kann damit auch ein Pipettiereffekt durch die entstehenden Scherkräfte auf die Zelloberfläche ausgeschlossen werden. Hingegen erhält man durch Zugabe von periplasmatisch exprimiertem RANTES mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml zum Zeitpunkt 220 s ein deutliches Signal. Durch eine erneute Zugabe derselben Menge RANTES zum Zeitpunkt 280 s kann jedoch kein weiteres Signal erzeugt werden, da bereits alle CCR5 Rezeptoren blockiert sind. Als Positivkontrolle dient Ionomycin zum Zeitpunkt 340 s, ein Calcium-Ionophor das sofort nach Zugabe in die Zellmembranen eingebaut wird und einen ungehinderten Calcium-Einstrom in das Zytosol ermöglicht.

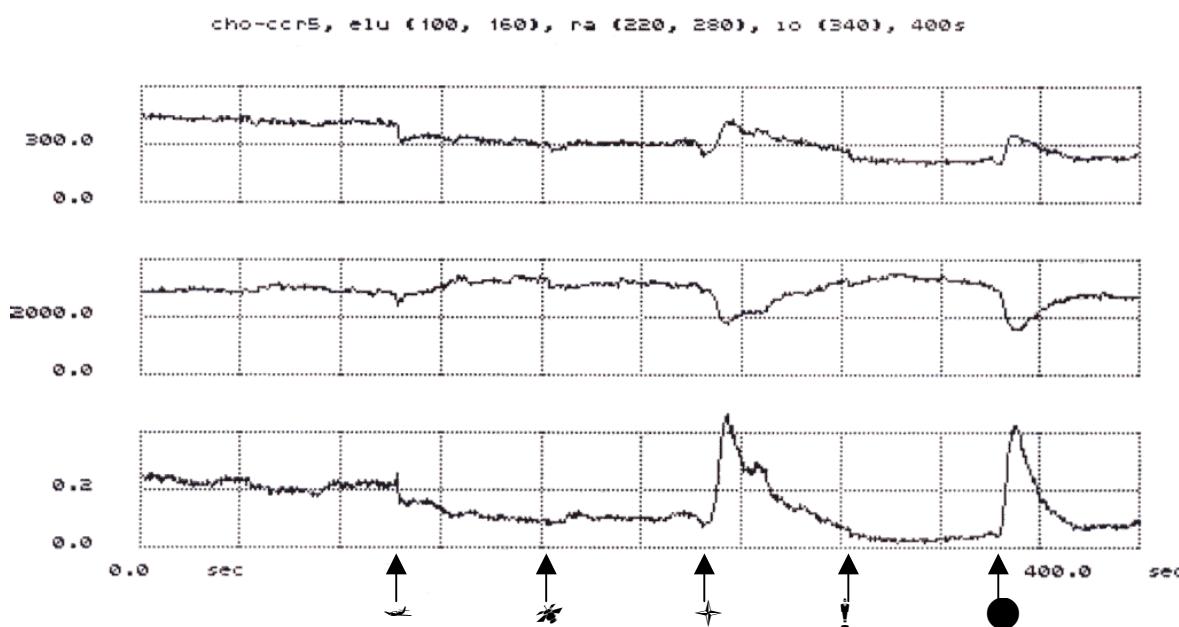


Abb. 4.12: Dargestellt ist eine 400 s lange Messung des Calcium-Einstroms in das Zytosol von CCR5-positiven CHO Zellen bei Zugabe von in Meßpuffer verdünntem Elutionspuffer (← bei 100 s und ✕ bei 160 s), RANTES (+ bei 220 s und ↗ bei 280 s) und Ionomycin (● bei 340s). Die obere Spur zeigt das Fluoreszenzsignal bei Anregung mit 340 nm Wellenlänge. Bei Zugabe von RANTES + und Ionomycin ● nimmt das Fluoreszenzsignal deutlich zu, da Fura zum größten Teil an Calcium gebunden vorliegt. Die mittlere Spur zeigt das Fluoreszenzsignal bei 380 nm, bei der das Fluoreszenzsignal bei Calcium-Einstrom durch die Abnahme von freiem Fura deutlich abnimmt. Die untere Spur zeigt das Verhältnis der beiden oberen Signale 340nm/380nm. Man erkennt, daß durch zupipettieren von Elutionspuffer kein falsch positives Signal entsteht. Auch durch eine zweite Zugabe von RANTES entsteht kein Signal, da bereits alle Rezeptoren blockiert sind. Die Zugabe von Ionomycin bei 340 s dient als Positivkontrolle, da es einen ungehinderten Calcium-Einstrom in die Zellen bewirkt.

Der Vergleich mit RANTES aus inclusion bodies von *E. coli* ist in Abb. 4.13 dargestellt. Auch hier kann durch eine erneute Zugabe von RANTES kein zweites Signal erzeugt werden (Zugabe von RANTES aus inclusion bodies zu den Zeitpunkten 100 s und 185 s in der unteren Spur). Die Signalhöhe und -dauer ist für RANTES aus den zwei verschiedenen Expressionssystemen mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml nahezu identisch. Als Positivkontrolle dient wiederum Ionomycin.

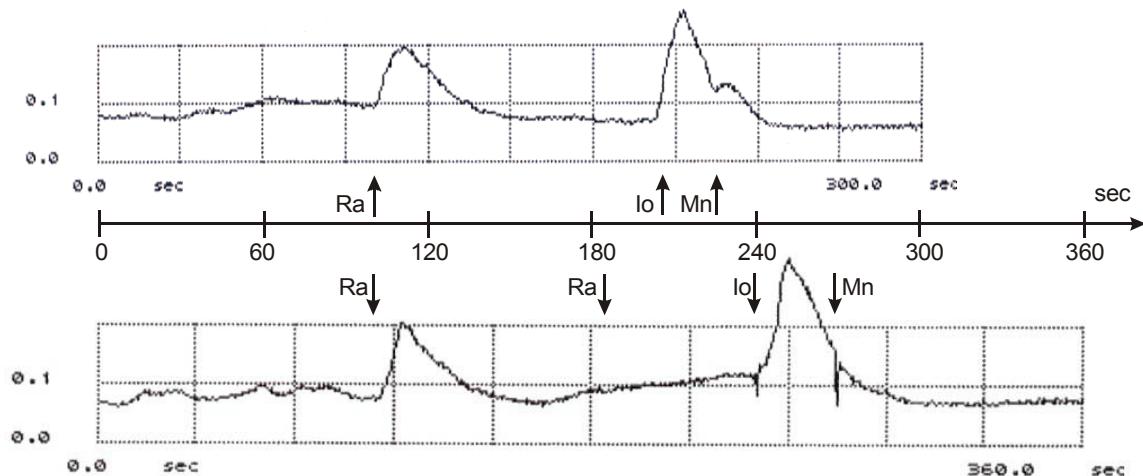


Abb. 4.13: Zum Nachweis der identischen Funktionalität von periplasmatisch exprimiertem RANTES (zum Zeitpunkt 100 s in der oberen Spur) wurde die intrazelluläre Calcium-Mobilisation mit derjenigen durch RANTES aus inclusion bodies von *E. coli* (zu den Zeitpunkten 100 s und 185 s in der unteren Spur) verglichen. Gezeigt wird jeweils das Signalverhältnis 340nm/380nm, entsprechend der unteren Spur in Abb. 4.12. Mit einer jeweils eingesetzten Endkonzentration von 1 µg/ml ergibt sich dabei für beide Expressionsformen von RANTES ein nahezu identisches Signal im Vergleich zur Positivkontrolle mit Ionomycin (Io) mit einer Endkonzentration von 10 µM zu den Zeitpunkten 205 s bzw. 240 s. Durch Zugabe von Manganchlorid (Mn) mit einer Endkonzentration von 1 mM zu den Zeitpunkten 225 s bzw. 270 s (entsprechend 0% Fura-Sättigung) und Ionomycin (entsprechend 100% Fura-Sättigung) kann die Signalhöhe in Prozent der Fura-Sättigung angegeben werden. Dargestellt sind zwei repräsentative Experimente.

4.2.5. Vergleich der Bindung an den Chemokinrezeptor CCR5 durch RANTES aus verschiedenen Expressionssystemen

Zur Durchführung eines Bindungsexperimentes wurde periplasmatisches RANTES mittels der Chloramin T Methode mit ^{125}I -Ionen radioaktiv markiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über eine Sephadex G25 Säule gegeben und mit PBS eluiert. Das Eluat wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und in einem 16-fach γ -Counter die Aktivität von jeweils 10 μl jeder Fraktion bestimmt. Abb. 4.14 zeigt das Elutionsprofil einer solchen radioaktiven Markierung. Dabei befindet sich das markierte Protein in dem ersten Peak, der nach etwa einem Säulenvolumen auftritt, da das Protein wegen seiner Größe nicht in die Beads der Säule eindringen kann und ihm deshalb nur ein begrenztes Verteilungsvolumen zur Verfügung steht. Der zweite Peak enthält einen großen Teil der überschüssigen ^{125}I -Ionen, die nicht an das Protein gebunden haben.

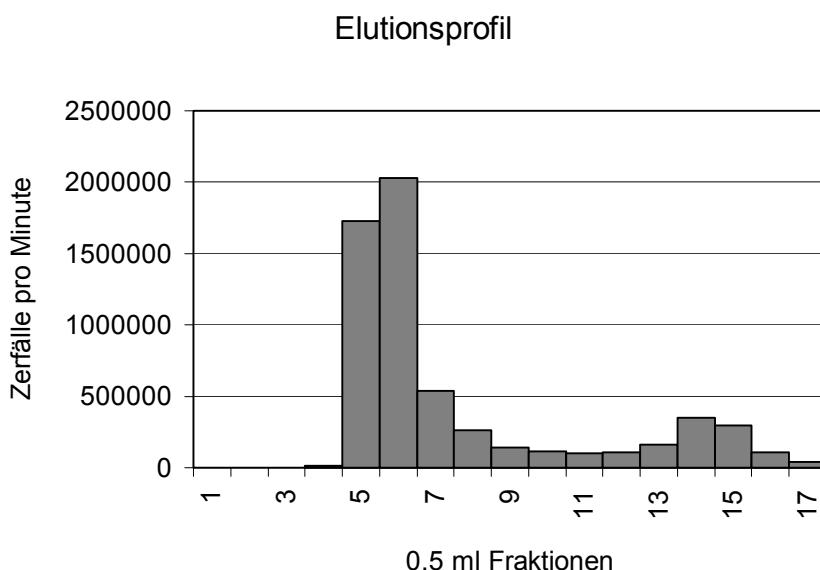
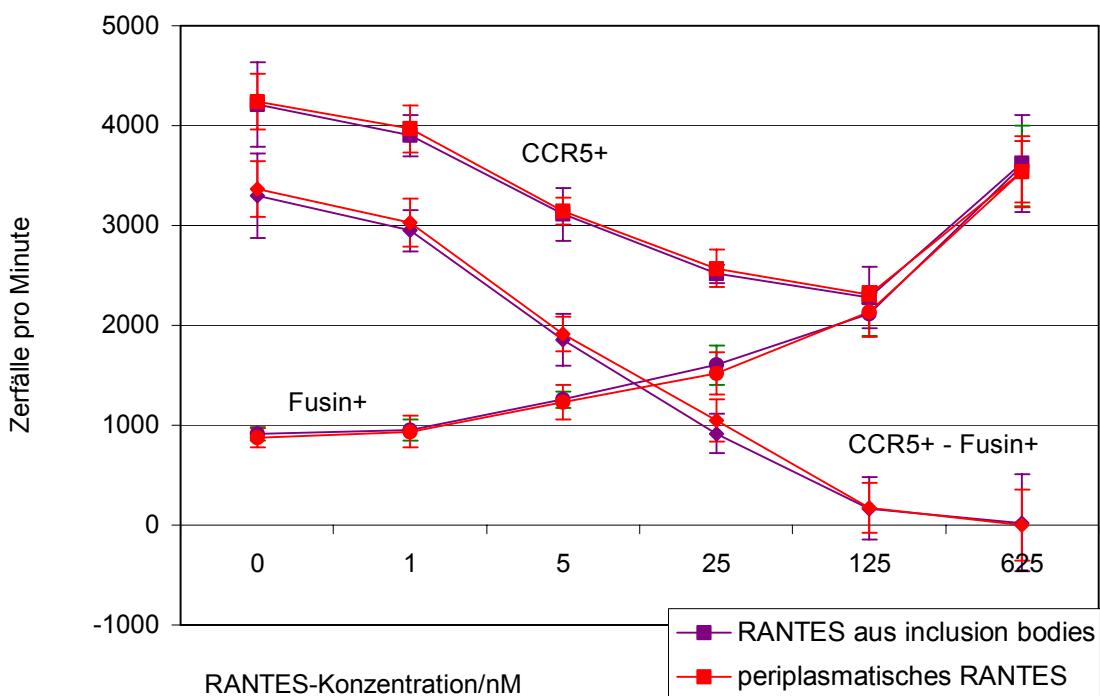


Abb. 4.14: Nach der radioaktiven Markierung mit ^{125}I wird das Reaktionsgemisch über eine 2 ml Sephadex G25 Säule gegeben und anschließend mit PBS eluiert. Das Eluat wird in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und die Aktivität von jeweils 10 μl pro Fraktion in einem 16-fach γ -Counter gemessen. Der erste Peak in den Fraktionen 5 bis 7 entspricht dem radioaktiv markierten RANTES, der zweite Peak in den Fraktionen 12 bis 17 entsteht durch ^{125}I -Ionen, die nicht an der Markierungsreaktion beteiligt waren.

Bei einer optimalen Markierung wäre es wünschenswert, wenn an jedes Protein genau ein ^{125}I -Ion binden würde. Die genaue Ermittlung der spezifischen Aktivität der ^{125}I -Ionen pro Chemokinmolekül wird benötigt für die quantitative Bestimmung der Bindungsparameter und kann durch Verdrängung eines radioaktiv markierten Proteins durch verschiedene Konzentrationen desselben unmarkierten Proteins erfolgen [14]. Eine einfache Abschätzung der richtigen Größenordnung erhält man, indem man die Anzahl der ^{125}I -Ionen, die man über $N(^{125}\text{I}) = T_{1/2} * A(^{125}\text{I}) / \ln 2$ erhält, durch die Anzahl der RANTES-Moleküle $N(\text{RANTES}) = c(\text{RANTES}) * x \text{ ml} * L / 8 \text{ g/mol}$ dividiert. Dabei ist $T_{1/2} = 60 \text{ d}$ die Halbwertszeit für den radioaktiven Zerfall der ^{125}I -Ionen, $A(^{125}\text{I})$ ist die mit dem γ -Counter bestimmte Aktivität umgerechnet auf das für die Markierungsreaktion eingesetzte Volumen, $c(\text{RANTES})$ ist die mittels ELISA bestimmte RANTES-Konzentration und $L = 6,022045 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ist die Avogadro-Zahl. Bei den Markierungsreaktionen, die für

die folgenden Daten verwendet wurden, lag die abgeschätzte Zahl von gebundenen ^{125}I -Ionen pro RANTES-Molekül bei 0,7 bis 1,0.

Um die Bindung von RANTES aus verschiedenen Expressionssystemen zu vergleichen, wurde eine konstante Menge von radioaktiv markiertem periplasmatischem RANTES-6His verdrängt durch eine steigende Konzentration von unmarkiertem periplasmatischem RANTES-6His im Vergleich zu RANTES, das im Zytoplasma von *E. coli* in inclusion bodies exprimiert wurde. Alle Bindungsexperimente wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen durchgeführt, da man dadurch eine genau definierte Zellpopulation mit konstanter hoher Rezeptorexpression erhält. Da im Gegensatz zur FACS-Analyse die gemessene Aktivität von der absoluten Anzahl an vorhandenen Rezeptoren und damit von der Anzahl der Zellen pro Well abhängt, unterliegen einzelne Meßwerte stärkeren Schwankungen.



*Abb. 4.15: Zerfälle pro Minute bei Verdrängung von radioaktiv markiertem periplasmatischem RANTES-6His durch unmarkiertes periplasmatisches RANTES-6His im Vergleich zu RANTES aus inclusion bodies von *E. coli*. Zu jeder Konzentration von unmarkiertem RANTES wurden Vierfachwerte gemessen. Bei hohen Konzentrationen bindet RANTES unabhängig vom Rezeptor CCR5 an die CHO-Zellen und aggregiert zu Multimeren, wodurch die Aktivität auf CCR5-positiven CHO-Zellen bei 625 nM wieder ansteigt. Dieselbe von CCR5 unabhängige Bindung erkennt man auf Fusin-positiven CHO-Zellen, die mit CXCR4 statt CCR5 transfiziert sind. Die spezifische Bindung an CCR5 ergibt sich aus der Differenz der beiden Bindungskurven an CCR5-positiven und CXCR4-positiven CHO-Zellen (resultierende Bindungskurven CCR5+ - Fusin+).*

Deshalb wurden Vierfachwerte bestimmt, um eine kleine Standardabweichung zu erhalten. Man erkennt in Abb. 4.15 an der Bindungskurve für die CCR5-positiven CHO-Zellen, daß bei hoher Konzentration an unmarkiertem RANTES die gemessene Aktivität durch die

^{125}I -Ionen wieder zunimmt. Bei einem parallel durchgeführtem Bindungsexperiment mit CHO-Zellen, die mit dem Chemokinrezeptor CXCR4 (Fusin) transfiziert sind, erkennt man ebenso einen Anstieg der gemessenen Aktivität mit steigender RANTES-Konzentration, obwohl kein RANTES-spezifischer Chemokinrezeptor vorhanden ist. Das Chemokin bindet offensichtlich auf der Zelloberfläche und bildet bei steigender Konzentration Dimere oder Multimere, wodurch zusätzliches radioaktiv markiertes RANTES an der Zelloberfläche haften bleibt. Wenn man CCR5-positive und Fusin-positive CHO-Zellen in gleicher Konzentration einsetzt, dann erhält man für hohe Konzentrationen an unmarkiertem RANTES die gleiche gemessene Aktivität durch die ^{125}I -Ionen. Bei niedrigen RANTES-Konzentrationen hingegen überwiegt die spezifische Bindung der radioaktiv markierten RANTES-Moleküle an den Chemokinrezeptor CCR5. Aus der Differenz der beiden Bindungskurven an CCR5-positiven und CXCR4-positiven CHO-Zellen erhält man also die spezifische Bindung an CCR5. Die Kurven sind gleich für periplasmatisches RANTES-6His und für RANTES aus inclusion bodies von E. coli.

CCR5 ⁺ CHO-Zellen							Fusin ⁺ CHO-Zellen						
4179	4157	2967	2439	1823	3074		839	834	1355	1310	1815	3250	
4369	3673	2900	2465	2072	3172		833	987	1187	1540	2225	3695	
4965	4039	3476	2594	2552	4002		963	1074	1263	1787	2293	4196	
3448	3998	3222	2374	2271	3902		941	892	1193	1520	2214	3486	
4240	3967	3141	2468	2180	3538	Mittelwert	894	947	1250	1539	2137	3657	
625	207	263	92	309	482	Standardabw.	68	106	78	195	217	403	
0	1	5	25	125	625	nM RANTES	0	1	5	25	125	625	

Tab. 2: Zerfälle pro Minute bei der Messung der CCR5-spezifischen und -unspezifischen RANTES-Bindung. Hier sind die Einzelwerte für RANTES aus inclusion bodies aus Abb. 4.15 wiedergegeben. Zu jeder Konzentration von unmarkiertem RANTES wurden Vierfachwerte (Spalten) gemessen, um eine kleine Standardabweichung zu erhalten.

4.2.6. Chemokinrezeptorunabhängige Bindung auf Zelloberflächen durch RANTES aus verschiedenen Expressionssystemen

Wenn man RANTES in hohen Konzentrationen auf Eis mit CHO-Zellen inkubiert, dann kann man durch Färbung mit einem Anti-RANTES-Antikörper, z.B. mit VL-1 in der Flowzytometrie einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität bei steigenden RANTES-Konzentrationen erkennen. Diese Bindung an die Zelloberfläche ist unabhängig von dem spezifischen Chemokinrezeptor und kann gleichermaßen für CCR5-positive CHO-Zellen wie für CCR2- oder CXCR4- (= Fusin-) positive CHO-Zellen gefunden werden (siehe Abb. 4.16 und 4.17). Diese CCR5-unabhängige Bindung an die Zelloberfläche ist sowohl für periplasmatisches wie für synthetisches RANTES und für RANTES aus inclusion bodies im Zytoplasma von E. coli nachweisbar. Dies korreliert mit dem Anstieg der ^{125}I -Aktivität bei Bindungsexperimenten an CCR5- und CXCR4-positiven CHO-Zellen. Eine entsprechende Bindung an die Zelloberfläche kann auch für native PBMCs, insbesondere an Monozyten gezeigt werden.

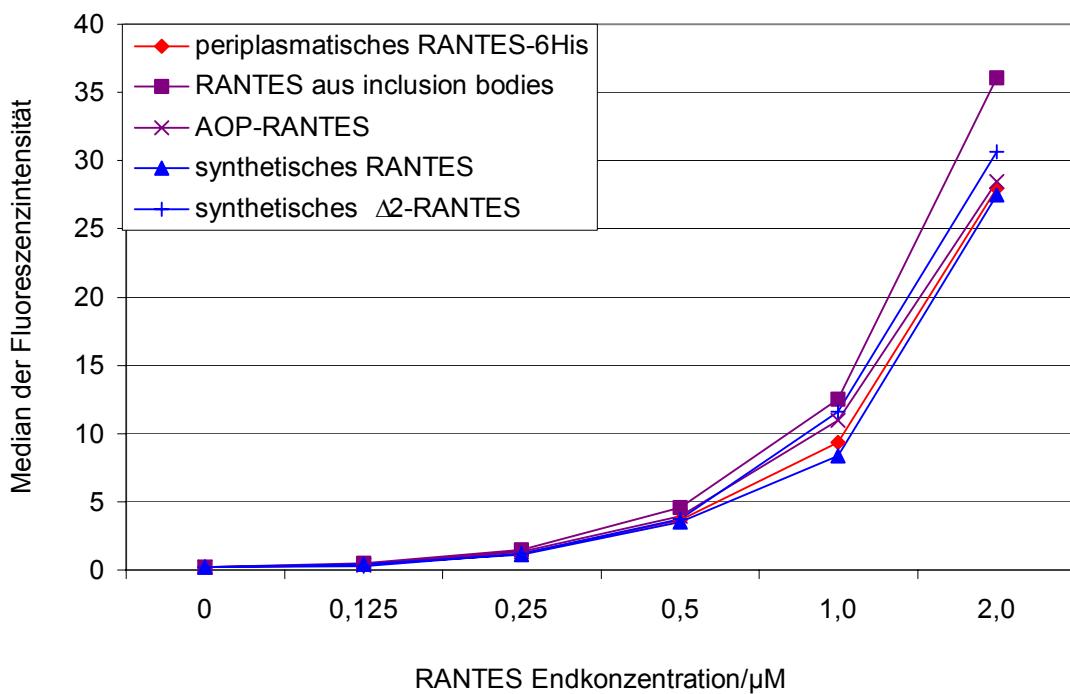


Abb. 4.16: CCR5-unabhängige RANTES-Bindung an die Zelloberfläche von CCR5-positiven CHO-Zellen. RANTES wurde auf Eis mit den CHO-Zellen inkubiert, mit dem Anti-RANTES-Antikörper VL1 angefärbt und flowzytometrisch nachgewiesen. Dies ist für RANTES aus drei verschiedenen Expressionssystemen gleichermaßen nachweisbar.

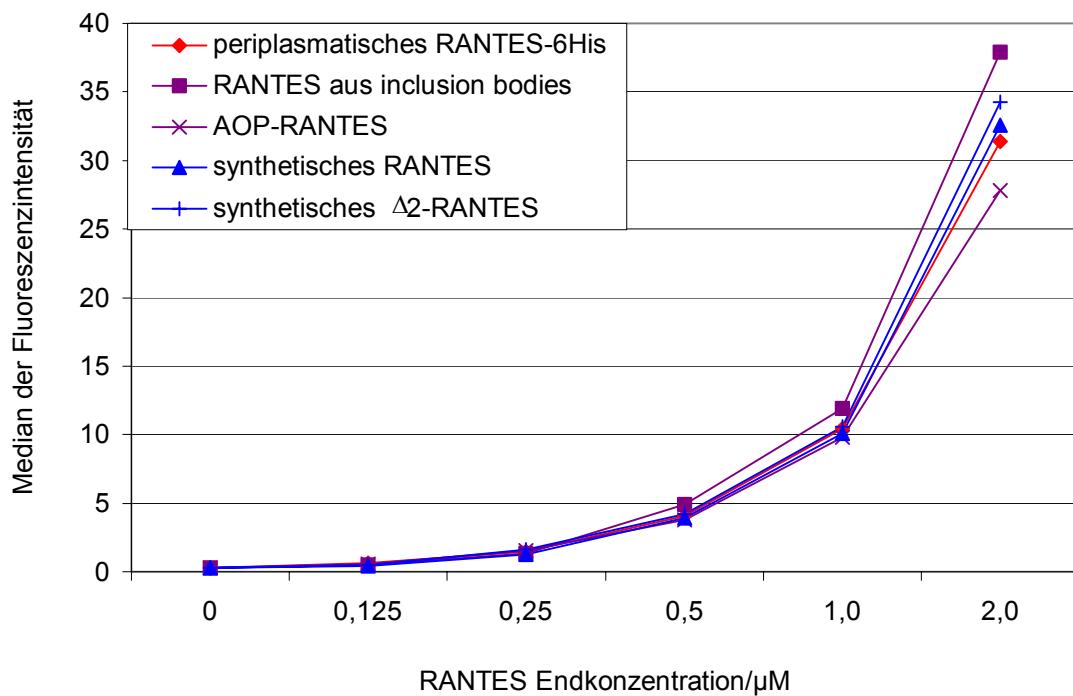


Abb. 4.17: CCR5-unabhängige RANTES-Bindung an die Zelloberfläche von CXCR4-positiven CHO-Zellen. Es zeigt sich annähernd die gleiche Fluoreszenzintensität bei RANTES aus drei verschiedenen Expressionssystemen.

4.3. Spezifische Bindung und Aktivierung von Chemokinrezeptoren durch RANTES und seine Modifikationen

4.3.1. Internalisierung und Recycling des Chemokinrezeptors CCR5 auf CCR5-überexprimierenden CHO Zellen

Zur Charakterisierung der RANTES Modifikationen wurde in einem ersten Schritt die Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5 auf CCR5-überexprimierenden CHO Zellen untersucht. Dazu wurden 10^5 Zellen mit den RANTES Modifikationen mit einer Endkonzentration von 125 nM (1 µg/ml) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend der Chemokinrezeptor CCR5 angefärbt.

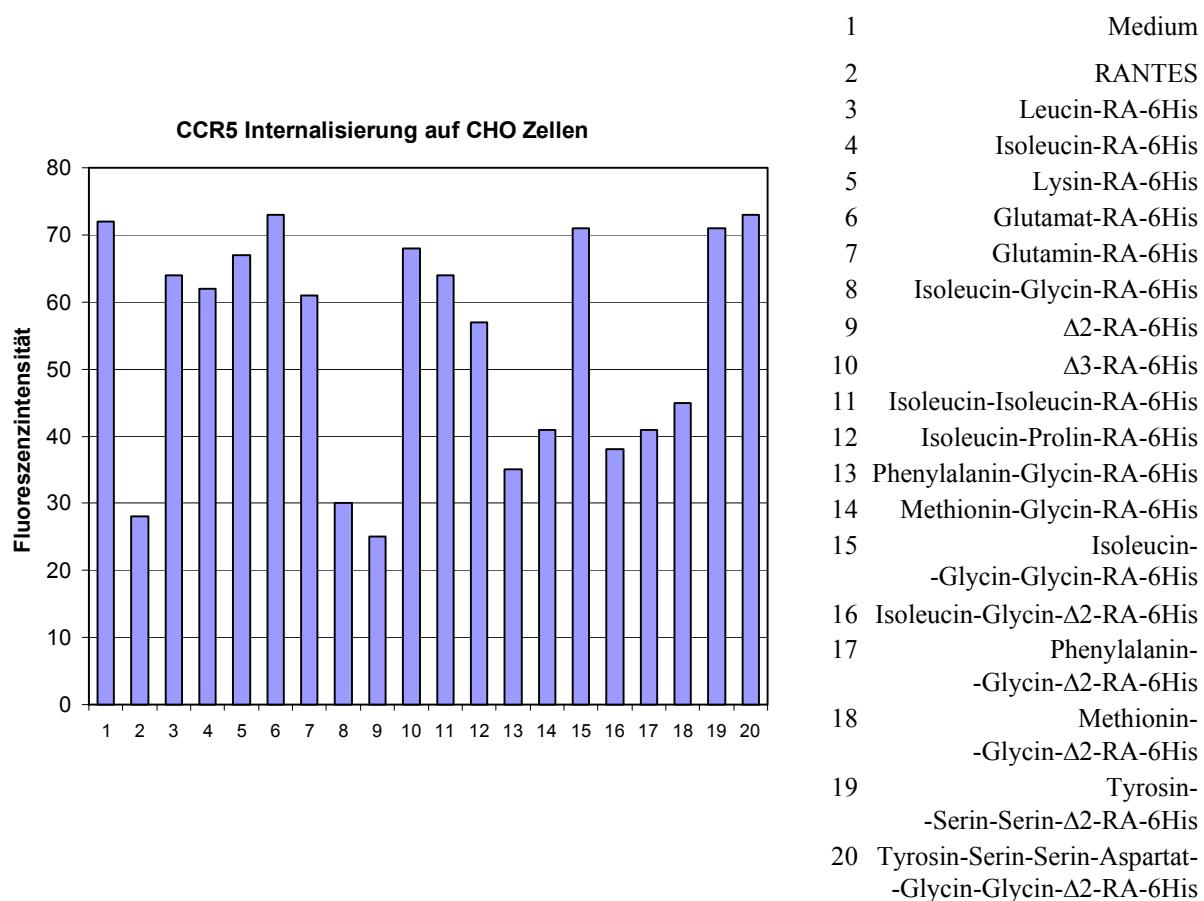


Abb. 4.18: Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5 auf überexprimierenden CHO Zellen durch RANTES und seine Modifikationen im Vergleich zu unmodifiziertem RANTES (2. Balken) und Medium (1. Balken) als Kontrollen. Δ2-RANTES bewirkt eine stärkere Internalisierung als RANTES. Mit Ile-Gly-RANTES kann eine etwa gleiche Internalisierung wie für RANTES erreicht werden. Auch Phe-Gly-RANTES, Met-Gly-RANTES, Ile-Gly-Δ2-RANTES, Phe-Gly-Δ2-RANTES und Met-Gly-Δ2-RANTES bewirken eine deutliche CCR5-Internalisierung.

Abb. 4.18 zeigt ein repräsentatives Experiment. Die meisten Modifikationen bewirken keine oder eine nur sehr geringe Rezeptorinternalisierung im Vergleich zur Positivkontrolle, bei der statt des Liganden nur Medium zugegeben wurde. Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 gezeigt, verursacht Δ2 RANTES eine stärkere Rezeptorinternalisierung als das unmodifizierte RANTES. Eine mit RANTES vergleichbare Internalisierung konnte mit Isoleucin-Glycin-RANTES erreicht werden. Bei Phenylalanin-Glycin-RANTES, Methionin-Glycin-RANTES, Isoleucin-Glycin-Δ2-RANTES, Phenylalanin-Glycin-Δ2-RANTES und Methionin-Glycin-Δ2-RANTES konnte eine etwas geringere Rezeptorinternalisierung gefunden werden. Bei diesen Modifikationen wurde die CCR5 Internalisierung genauer untersucht.

Bei einer Titration derjenigen Modifikationen, die in hoher Konzentration eine deutliche Internalisierung zeigten, findet man eine nahezu identische Konzentrationsabhängigkeit wie für RANTES (Ergebnisse nicht gezeigt). Mit einer Konzentration von 125 nM wird für die Modifikationen wie für RANTES eine maximale Rezeptorinternalisierung erreicht. Dabei kann noch etwa ein Drittel der ursprünglich auf der Zelloberfläche vorhandenen Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden.

Auch das Rezeptorrecycling nach CCR5-Internalisierung durch die RANTES Modifikationen ist identisch demjenigen für RANTES (Ergebnisse nicht gezeigt). Bereits nach 30 Minuten, in denen die CHO Zellen bei 37°C ohne Anwesenheit des Liganden inkubieren, ist bereits etwa 80% der ursprünglichen Fluoreszenzintensität wieder auf der Zelloberfläche nachweisbar. Nach einer Stunde Recyclingzeit hat die Fluoreszenzintensität etwa die gleiche Höhe erreicht wie die Kontrolle mit Medium, bei der keine Rezeptorinternalisierung stattgefunden hat. Es findet sich also im Gegensatz zu AOP-RANTES keine NH₂-terminale RANTES Modifikation, die den Rezeptor CCR5 dauerhaft blockieren kann, indem nach starker Rezeptorinternalisierung das Recycling verhindert wird.

4.3.2. Internalisierung der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 auf PBMC

Mit Hilfe der verfügbaren monoklonalen Antikörper gegen hCCR1, hCCR2 und hCCR5 wurde untersucht, ob die NH₂-terminalen Veränderungen an RANTES eine Veränderung der Rezeptorspezifität mit sich bringen. Dazu wurde die Rezeptorinternalisierung auf PBMC mittels FACS-Analyse untersucht.

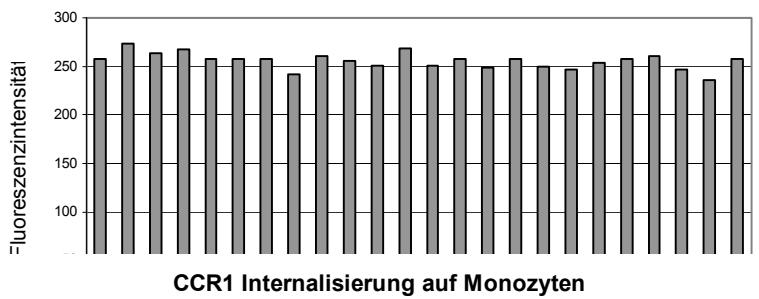
Der Chemokinrezeptor CCR2 findet sich auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen, darunter z.B. Monozyten, Lymphozyten, NK-Zellen und basophile Granulozyten. Da Monozyten den Rezeptor konstitutionell in einer großen Zahl exprimieren, sind sie gut geeignet, um die Rezeptorinternalisierung zu untersuchen. Da die Monozyten jedoch bei einer längeren Kultivierung aktiviert werden und nach Aktivierung die Oberflächenexpression des Rezeptors CCR2 stark abnimmt, und da Monozyten bei Kultivierung bei 37°C am Boden der Kulturflaschen adhärieren, wurden sie für diese Experimente nach dem Auftauen nur für wenige Stunden in Kultur genommen. In der FACS-Analyse zeigt sich ein hohes Fluoreszenzsignal, das für RANTES wie erwartet in der gleichen Höhe wie für die Positivkontrolle mit Medium liegt, und somit keine Rezeptorinternalisierung ergibt. Dieselbe Höhe des Fluoreszenzsignals findet man für alle erzeugten RANTES Modifikationen, d.h. durch die NH₂-terminalen Veränderungen findet kein Wechsel der Rezeptorspezifität zu CCR2 statt.

Der humane Chemokinrezeptor CCR1 findet sich auf verschiedenen Lymphozytensubpopulationen mit unterschiedlichem Expressionsniveau und auf Monozyten, aber nicht auf neutrophilen Granulozyten. Die CCR1 Internalisierung durch RANTES und seine Modifikationen wurde auf Monozyten untersucht, die zuvor 24 Stunden lang in Kultur genom-

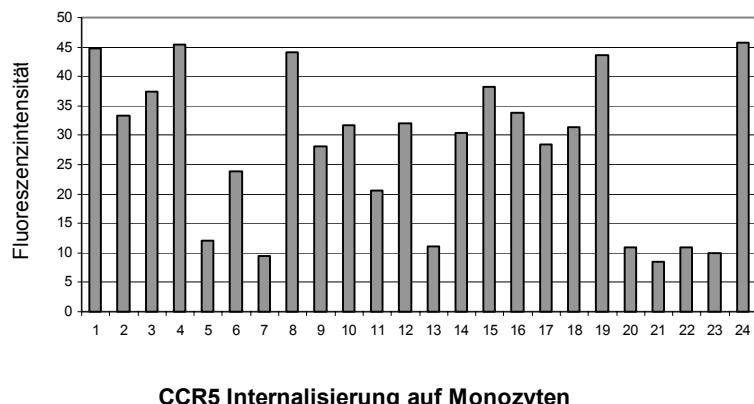
men waren. In Abb. 4.19 erkennt man, daß periplasmatisch exprimierte RANTES mit oder ohne His-Tag, gereinigt oder ungereinigt eine vergleichbare CCR1 Internalisierung zeigt wie RANTES aus inclusion bodies von E.coli. Von den RANTES Modifikationen findet sich nur bei Glutamat-RANTES, Isoleucin-Glycin-RANTES und Methionin-Glycin-RANTES eine vergleichbar starke Rezeptorinternalisierung.

Die Internalisierung des humanen Chemokinrezeptors CCR5 wurde auf Monozyten und auf Lymphozyten untersucht. Diese wurden 24 Stunden vor dem jeweiligen Experiment aufgetaut und in Kultur genommen. Für Monozyten ist diese Kultivierung dringend erforderlich, da die Oberflächenexpression von CCR5 erst nach Aktivierung der Zellen erfolgt und der Rezeptor kurz nach dem Auftauen kaum nachweisbar ist. Wiederum ist die Rezeptorinternalisierung durch periplasmatisch exprimierte RANTES mit oder ohne His-Tag, gereinigt oder ungereinigt vergleichbar mit der durch RANTES aus inclusion bodies von E.coli verursachten. Die CCR5 Internalisierung durch die Modifikationen ergibt ein sehr ähnliches Bild für Lymphozyten wie für Monozyten. Eine deutliche Verminderung wird insbesondere für Glutamat-RANTES, Isoleucin-Glycin-RANTES, Δ2-RANTES, Methionin-Glycin-RANTES, Isoleucin-Glycin- Δ2-RANTES, Phenylalanin-Glycin- Δ2-RANTES und Methionin-Glycin- Δ2-RANTES gefunden. Dies unterscheidet sich deutlich von der CCR5 Internalisierung auf überexprimierenden CHO Zellen, wo mit Glutamat-RANTES keine Rezeptorinternalisierung zu beobachten war, hingegen Phenylalanin-Glycin-RANTES eine deutliche Verminderung des Fluoreszenzsignals bewirkte. Die stärkste Internalisierung wurde wiederum durch Δ2-RANTES verursacht, doch auch Isoleucin-Glycin-RANTES zeigte mindestens die gleiche Effektivität wie RANTES selbst. Das Rezeptorrecycling kann mit PBMCs nicht untersucht werden, da Monozyten während der zweistündigen Inkubation bei 37°C an der Mikrotiterplatte adhärieren und man dabei fast alle Zellen verliert. Mit Lymphozyten erhält man keine statistisch signifikanten Werte, da nur ein kleiner Teil der Lymphozyten CCR5 exprimieren und die erzielte Verschiebung der Fluoreszenzintensität zu gering wird.

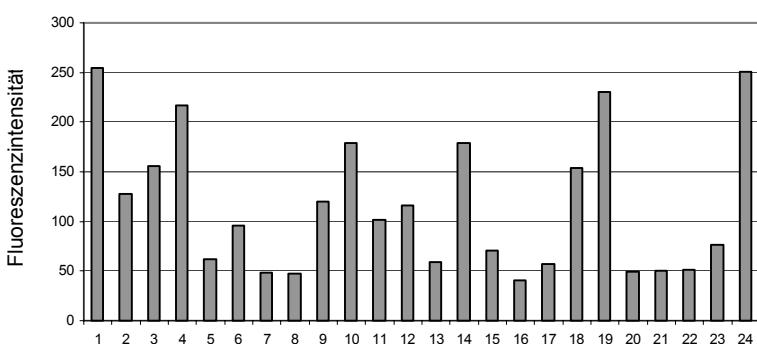
CCR2 Internalisierung auf Monozyten



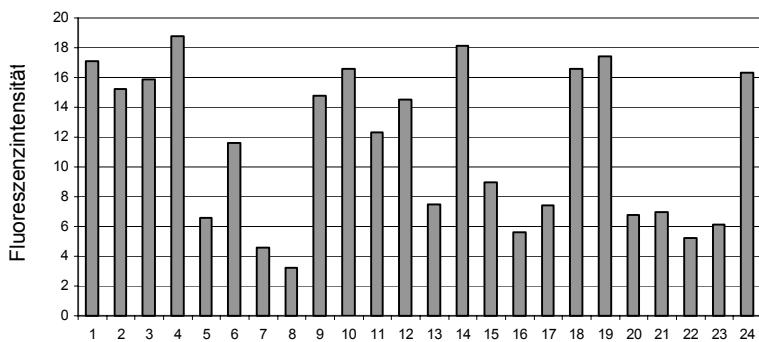
CCR1 Internalisierung auf Monozyten



CCR5 Internalisierung auf Monozyten



CCR5 Internalisierung auf Lymphozyten



- 1 Positivkontrolle ohne RANTES
- 2 Leucin-RA-6His
- 3 Isoleucin-RA-6His
- 4 Lysin-RA-6His
- 5 Glutamat-RA-6His
- 6 Glutamin-RA-6His
- 7 Isoleucin-Glycin-RA-6His
- 8 Δ2-RA-6His
- 9 Δ3-RA-6His
- 10 Isoleucin-Isoleucin-RA-6His
- 11 Isoleucin-Prolin-RA-6His
- 12 Phenylalanin-Glycin-RA-6His
- 13 Methionin-Glycin-RA-6His
- 14 Isoleucin-Glycin-Glycin-RA-6His
- 15 Isoleucin-Glycin-Δ2-RA-6His
- 16 Phenylalanin-Glycin-Δ2-RA-6His
- 17 Methionin-Glycin-Δ2-RA-6His
- 18 Tyrosin-Serin-Serin-Δ2-RA-6His
- 19 Tyrosin-Serin-Serin-Aspartat-Glycin-Glycin-Δ2-RA-6His
- 20 PPL RA-6His
- 21 PPL RANTES
- 22 RA-6His aus PPL gereinigt
- 23 RANTES aus inclusion bodies
- 24 PPL ohne RANTES

Abb. 4.19: Internalisierung verschiedener Chemokinrezeptoren auf PBMC durch RANTES und seine Modifikationen.

4.3.3. Bindung der RANTES Modifikationen an den Chemokinrezeptor CCR5 auf überexprimierenden CHO Zellen

Analog zum Vergleich der Bindung von RANTES aus verschiedenen Expressions-systemen (siehe Abschnitt 4.2.5.) wurde eine konstante Menge von radioaktiv markiertem periplasmatischem RANTES-6His verdrängt durch eine steigende Konzentration von unmarkiertem periplasmatischem RANTES-6His oder dessen ebenfalls periplasmatisch exprimierten NH₂-terminalen Modifikationen. Wiederum wurden alle Bindungsexperimente mit stabil transfizierten CHO-Zellen mit konstanter hoher Rezeptorexpression durchgeführt. Eine Untersuchung der Bindung der RANTES Modifikationen auf Monozyten wäre wegen der unterschiedlichen Rezeptorinternalisierung im Vergleich zu den CCR5-positiven CHO Zellen wünschenswert. Für das Bindungs-Screening müsste dazu jedoch eine sehr große Zahl nativer Monozyten aus dem Blut isoliert werden. Auch auf Monozytenzelllinien würde wegen der deutlich niedrigeren Rezeptorexpression eine wesentlich höhere Zellzahl benötigt, um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

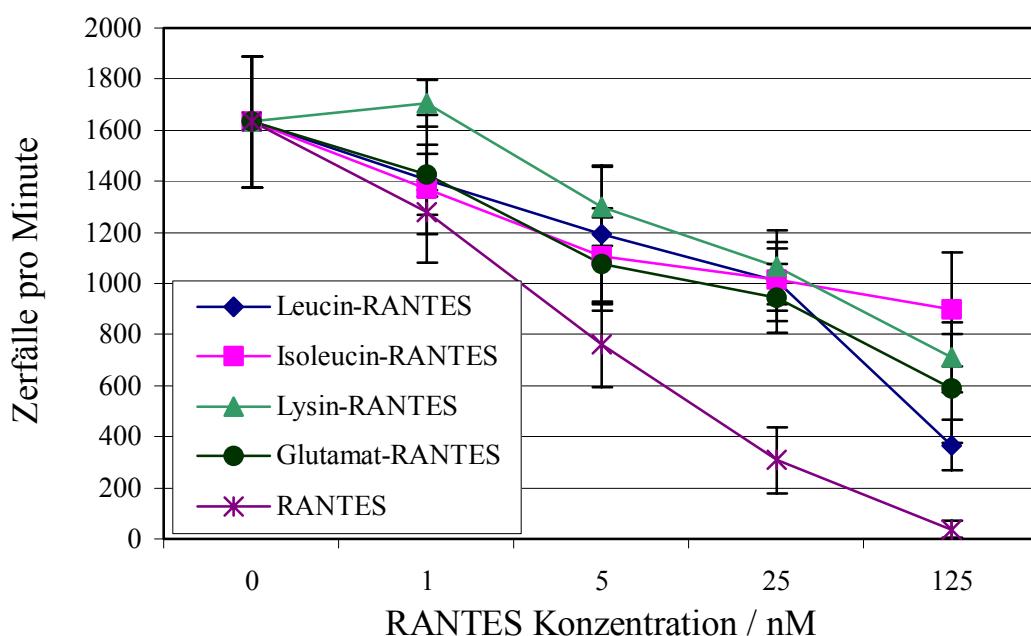


Abb. 4.20: Relative Bindungskurven von RANTES Modifikationen im Vergleich zu RANTES. Eine konstante Menge von radioaktiv markiertem RANTES wurde verdrängt durch eine steigende Konzentration von unmarkiertem RANTES oder dessen NH₂-terminalen Modifikationen. Für jede Konzentration wurden jeweils Vierfachwerte auf CCR5-positiven und CXCR4-positiven CHO-Zellen bestimmt. Dargestellt ist die resultierende Bindungskurve aus der Differenz der Aktivitäten für CCR5-positive und CXCR4-positive CHO Zellen. Die gezeigten Modifikationen binden deutlich schlechter als RANTES.

Da die gemessene Aktivität von der absoluten Anzahl der Zellen pro Well abhängt, wurden für die Bindungsexperimente wieder Vierfachwerte für jede Konzentration aller Modifikationen bestimmt (siehe Abschnitt 4.2.5.), um kleine statistischen Schwankungen zu erhalten. Für jedes Well wurden 10⁶ CHO Zellen eingesetzt. Außerdem wurden erneut sämtliche Werte parallel für CCR5-positive und CXCR4-positive CHO Zellen bestimmt, da bei steigenden Konzentrationen die Aktivität durch unspezifische Bindung und Multi-

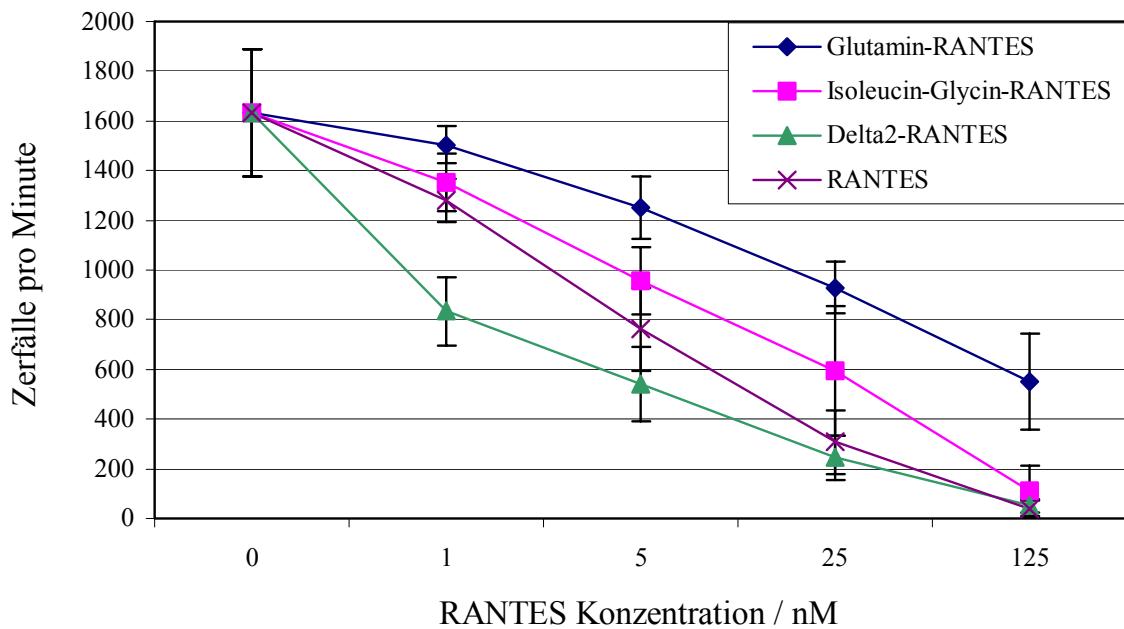


Abb. 4.21: Relative Bindungskurven von RANTES Modifikationen im Vergleich zu RANTES. Δ2 RANTES zeigt eine deutlich bessere spezifische Bindung an CCR5 als RANTES. Die Bindungskurve von Isoleucin-Glycin-RANTES liegt sehr nahe bei derjenigen von RANTES.

merisierung deutlich zunimmt. In den folgenden Abbildungen ist bereits die resultierende Bindungskurve aus der Differenz der Aktivitäten für CCR5-positive und CXCR4-positive CHO Zellen dargestellt. Da die Bestimmung der absoluten Bindungsparameter wie der Affinitätskonstante oder der durchschnittlichen Anzahl von Rezeptormolekülen auf der Zelloberfläche einen wesentlich aufwendigeren Experimentansatz notwendig macht, wurden für das Screening der RANTES Modifikationen die Bindungskurven im Vergleich

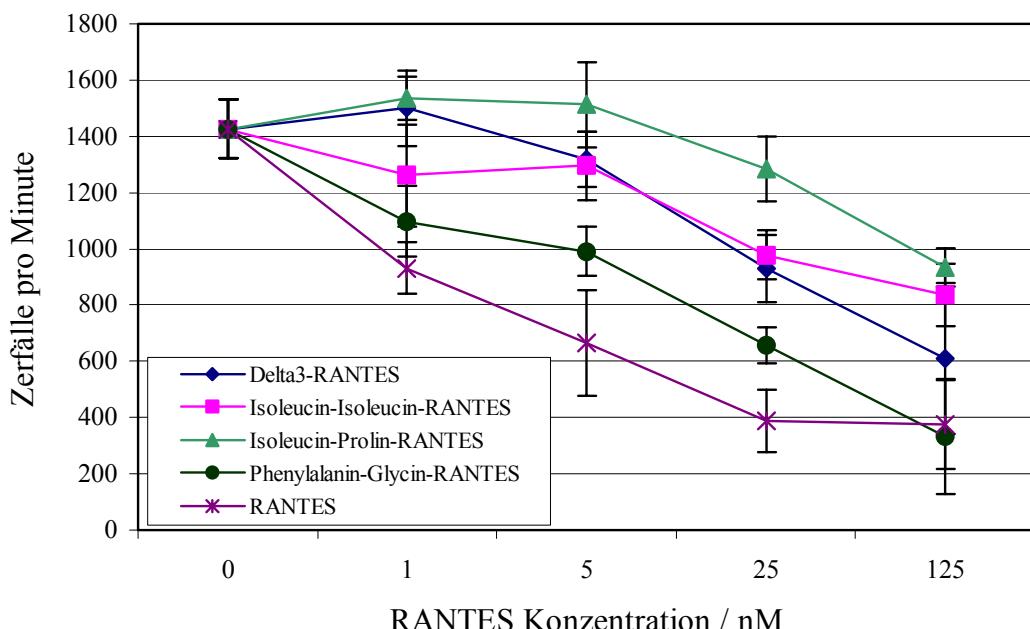


Abb. 4.22: Relative Bindungskurven von RANTES Modifikationen im Vergleich zu RANTES. Die Bindungskurve von Phenylalanin-Glycin-RANTES liegt relativ nahe bei derjenigen von RANTES.

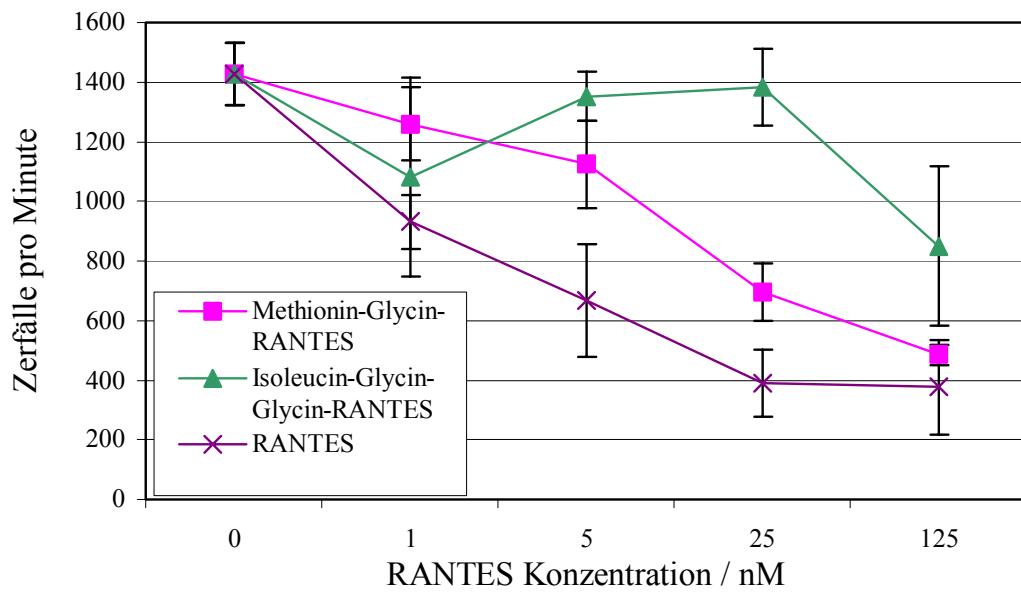


Abb. 4.23: Relative Bindungskurven von RANTES Modifikationen im Vergleich zu RANTES. Die Bindungskurve von Methionin-Glycin-RANTES liegt relativ nahe bei derjenigen von RANTES.

zu derjenigen von RANTES bestimmt. Abbildungen 4.20 bis 4.23 zeigen jeweils das Ergebnis eines repräsentativen Experiments.

Von den untersuchten periplasmatisch exprimierten RANTES Modifikationen zeigt also nur $\Delta 2$ RANTES eine stärkere spezifische Bindung an CCR5 als RANTES selbst. Die Bindungskurven von Isoleucin-Glycin-RANTES, Phenylalanin-Glycin-RANTES und Methionin-Glycin-RANTES liegen derjenigen von RANTES am nächsten. Damit zeigen also diejenigen Modifikationen die stärkste Bindung an CCR5 auf CHO Zellen, die auch die stärkste Rezeptorinternalisierung in der FACS-Analyse bewirken.

4.4. CCR5 unabhängige RANTES Bindung an Zelloberflächen

Ausgehend von der Beobachtung, daß RANTES aus den drei untersuchten Expressionssystemen (zytoplasmatische Expression in inclusion bodies von E.coli, bzw. synthetische Herstellung und jeweils anschließende Renaturierung und periplasmatische Expression in E.coli), gleichermaßen bei hohen Konzentrationen unabhängig vom Chemokinrezeptor CCR5 an der Oberfläche von CHO Zellen bindet (siehe Abb. 4.16 und 4.17), wurde diese CCR5 unabhängige Bindung systematisch untersucht. Dazu wurde zuerst die Bindung an Oberflächen anderer Zelltypen und insbesondere nativer humaner Zellen überprüft.

Anschließend wurden humanes Serum und Plasma mit RANTES präinkubiert, um zu untersuchen, ob die CCR5 unabhängige Bindung gehemmt werden kann. Dabei zeigte sich kein Effekt für Blutplasma. Humanes Serum hingegen konnte die RANTES Bindung an Zelloberflächen fast vollständig unterdrücken. Chondroitinsulfat A aus Thrombozyten wurde als der verantwortliche Faktor identifiziert, der die Immobilisierung von RANTES an Zelloberflächen unterdrückt. Außerdem blockiert Chondroitinsulfat A die funktionelle Antwort von Zellen auf RANTES.

4.4.1. RANTES Bindung an die Oberfläche von Endothelzellen, PBMCs und CHO Zellen

Mittels FACS Analyse unter Verwendung monoklonaler anti-RANTES-Antikörper VL-1, VL-2, VL-3 und VL-4 konnte gezeigt werden, daß RANTES in höheren Konzentrationen neben CHO Zellen auch an die Oberfläche von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (human microvascular endothelial cells, HMVEC), Lymphozyten und Monozyten bindet (Abb. 4.24). Dazu wurden die Zellen auf Eis mit verschiedenen RANTES Konzentrationen inkubiert und anschließend mit einem monoklonalen anti-RANTES-Anti-

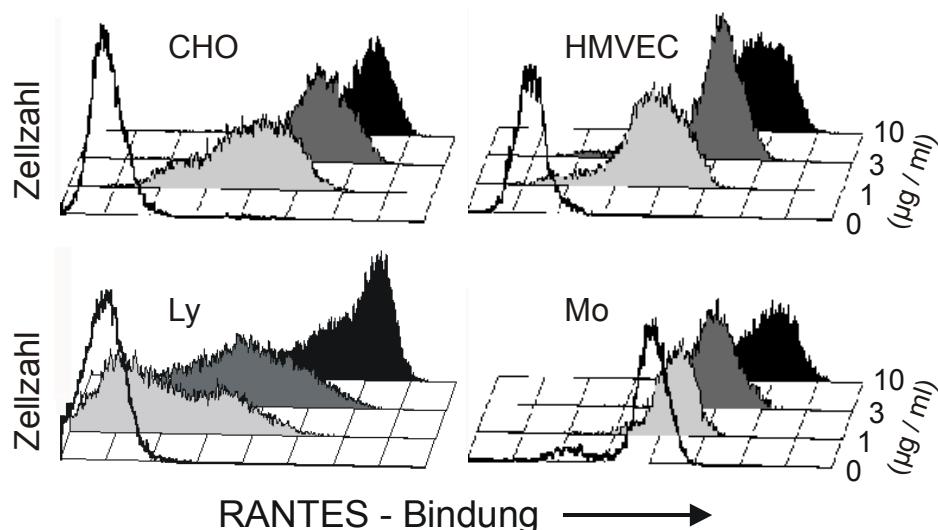


Abb. 4.24: CCR5 unabhängige Bindung von RANTES an Zelloberflächen. CHO Zellen, Endothelzellen (human microvascular endothelial cells, HMVEC), Lymphozyten (Ly) und Monozyten (Mo) wurden mit verschiedenen RANTES Konzentrationen von 0 bis 10 µg/ml auf Eis inkubiert. Die Bindung an der Zelloberfläche wurde flowzytometrisch mit Hilfe des monoklonalen anti-RANTES-Antikörpers VL-1 bestimmt. Das Experiment wurde mit den Endothelzellen zweimal und mit PBMC und CHO-Zellen mindestens sechsmal durchgeführt.

körper gefärbt. Dabei war die RANTES Bindung an die Zelloberflächen selbst bei Konzentrationen kleiner als 1 µg/ml nachweisbar.

Im Vergleich der vier anti-RANTES-Antikörper wurden die besten Resultate mit den Klonen VL-1 = VL-2 >> VL-3 = VL-4 erzielt. Interessanterweise hemmen die Antikörper VL-3 und VL-4 die RANTES Bindung an Zelloberflächen, wenn sie mit RANTES präinkubiert werden. Für die Antikörper VL-1 und VL-2 wurde diese Hemmung nicht beobachtet. VL-3 und VL-4 scheinen Glycosaminoglykan-Bindungsepitope zu erkennen (Abb. 4.25).

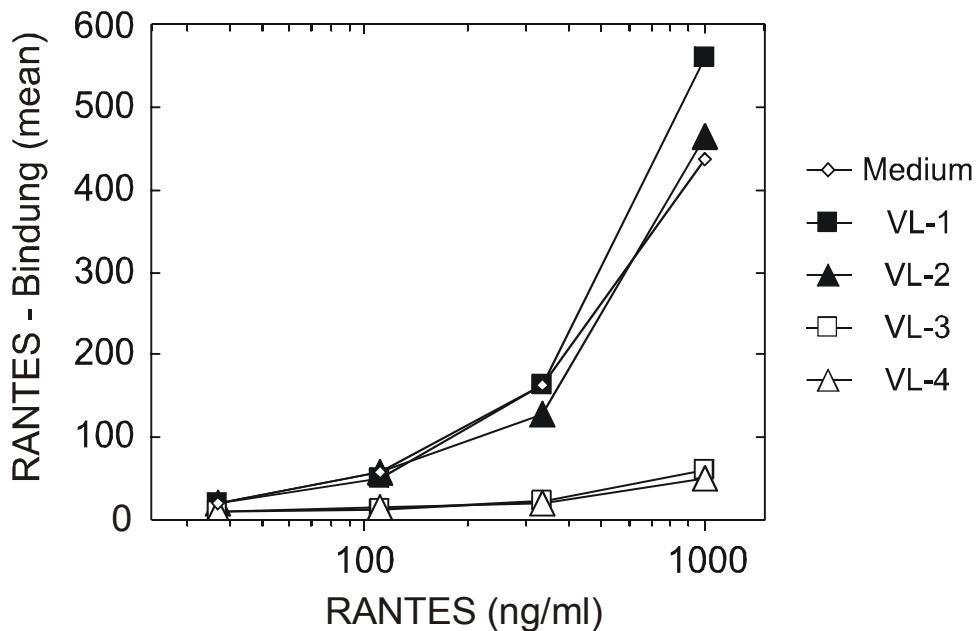


Abb. 4.25: Die monoklonalen Anti-RANTES Antikörper VL-3 und VL-4 verhindern die Immobilisation von RANTES. RANTES wurde mit einer Konzentration von 3 µg/ml 30 min. lang mit den Antikörpern oder Medium als Kontrolle präinkubiert. Anschließend wurde die RANTES Bindung an CHO Zellen flowzytometrisch mit Hilfe des Antikörpers VL-1 bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei.

4.4.2. Humanes Serum verhindert die RANTES Bindung an Zelloberflächen

Die effiziente Bindung von RANTES an Oberflächen verschiedener Zellen veranlasste uns, nach Substanzen zu suchen, die diese Bindung hemmen können. Bei der Suche nach natürlichen Mediatoren, die die RANTES Bindung an Zelloberflächen unter physiologischen Bedingungen regulieren können, erschienen Plasma und Serum als vielversprechende Kandidaten, da Chemokine in entzündlichem Geschehen produziert werden und in den Blutkreislauf freigesetzt werden können.

Dazu wurde RANTES präinkubiert mit humanem Serum und anschließend die RANTES Bindung an der Oberfläche von CHO Zellen gemessen. Abb. 4.26 zeigt, daß Präinkubation von RANTES (3.3 µg/ml) mit Serum den Mittelwert des Fluoreszenzsignals von zellgebundenem RANTES von 478 auf 19 reduziert. Ähnliche Ergebnisse wurden für Endothelzellen und PBMC erzielt (Daten nicht dargestellt).

Um die Fähigkeit von Serum, die RANTES Bindung an Zelloberflächen zu hemmen, genauer zu quantifizieren, wurde Serum in PBS verdünnt. Dabei ergab sich eine Hemmung der RANTES Bindung bei einer Konzentration von 10 µg/ml um 97%, 54% und 31% bei

einem Serum Anteil von 90%, 30% und 10% am gesamten Reaktionsansatz (Daten nicht dargestellt).

Im Gegensatz dazu hat die Präinkubation von RANTES mit Plasma aus EDTA Blut keinen Einfluß auf die RANTES Bindung an Zelloberflächen. Abb. 4.27 zeigt den RANTES Nachweis auf CHO Zellen nach Präinkubation mit Serum oder Plasma im Vergleich zu Medium (Positivkontrolle) oder ohne RANTES (Negativkontrolle).

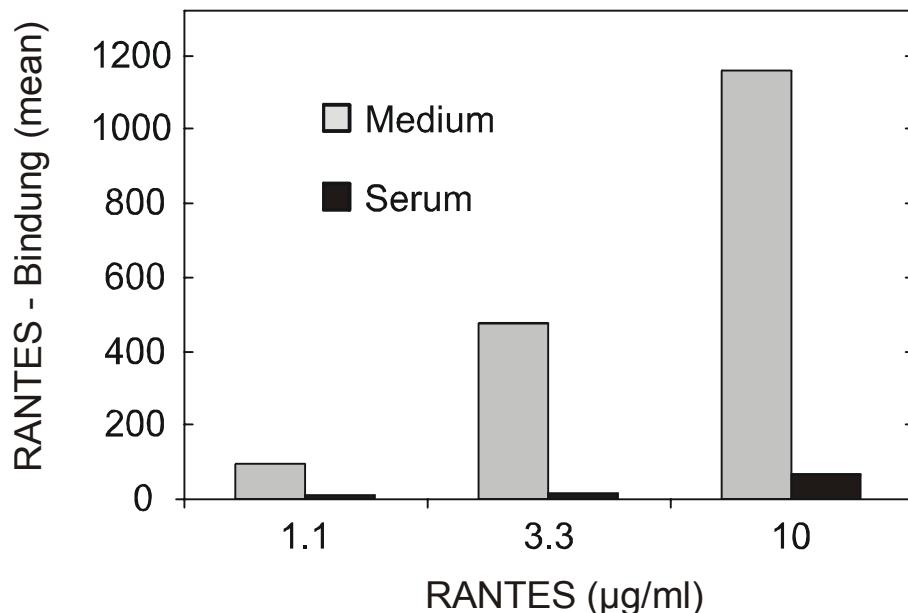


Abb. 4.26: Einfluß von humanem Serum auf die Bindung von RANTES an CHO Zellen.
RANTES wurde mit verschiedenen Konzentrationen von 1,1 bis 10 µg/ml mit Serum präinkubiert und anschließend für eine Stunde mit CHO Zellen inkubiert. Danach wurde die RANTES Bindung an CHO Zellen flowzytometrisch mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers VL-1 bestimmt. Präinkubation von RANTES mit Serum reduziert die RANTES Bindung selbst bei hohen Konzentrationen deutlich. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von fünf.

Um auszuschließen, daß Serumkomponenten den Nachweis von zellgebundenem RANTES durch VL-1 stören, wurden CHO Zellen erst mit RANTES beladen, bevor sie mit Serum inkubiert wurden. Wenn das Serum zugegeben wurde, nachdem RANTES bereits auf der Zelloberfläche gebunden hatte, ließ sich eine vergleichbare Menge RANTES nachweisen wie ohne Zugabe von Serum. D.h. insbesondere, daß Serum den RANTES Nachweis durch VL-1 nicht behindert (Daten nicht dargestellt).

Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, daß Komponenten im Serum (z.B. andere Chemokine als RANTES) mit RANTES um Bindungsstellen auf der Zelloberfläche konkurrieren. Dazu wurden die Zellen mit Serum vorinkubiert und anschließend gewaschen, bevor sie mit RANTES beladen wurden. Dabei zeigte sich, daß Präinkubation mit Serum die anschließende Bindung von RANTES an Zelloberflächen nicht hemmt (Daten nicht dargestellt).

Humanes Serum enthält also einen Faktor, der an RANTES bindet und dadurch die CCR5 unabhängige Bindung von RANTES an Zelloberflächen hemmt. Dieser Faktor ist in Plasma nicht vorhanden.

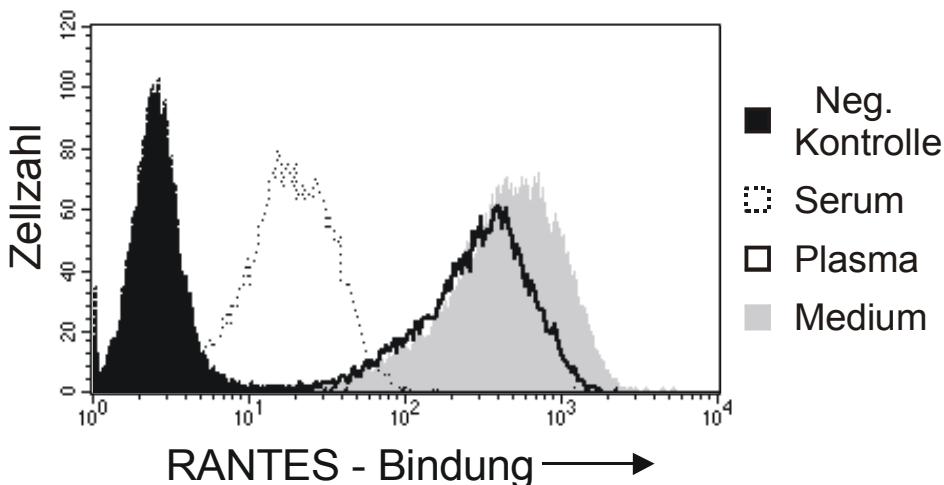


Abb. 4.27: Einfluß von humanem Serum oder Plasma auf die Bindung von RANTES an CHO Zellen. RANTES wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml mit Serum oder Plasma präinkubiert und danach für eine Stunde mit CHO Zellen inkubiert. Anschließend wurde die RANTES Bindung an CHO Zellen flowzytometrisch mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers VL-1 bestimmt. Präinkubation von RANTES mit Serum reduziert die RANTES Bindung deutlich, wohingegen die Präinkubation mit Plasma keinen Effekt hat. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von fünf.

4.4.3. Chondroitinsulfat A aus Thrombozyten bindet an RANTES

Der erste Hinweis auf den Ursprung des Moleküls, das an RANTES bindet und dessen CCR5 unabhängige Bindung an Zelloberflächen hemmt, ergab sich aus der Beobachtung, daß Plasma aus Blut, das mit EDTA antikoaguliert wurde, keinen Einfluß auf die Zellbindung von RANTES hat. Deshalb untersuchten wir, ob das an RANTES bindende Molekül durch nachträgliche Koagulation von EDTA Plasma durch Zugabe von CaCl₂ erzeugt werden kann. Um zwischen Molekülen zu unterscheiden, die in der Gerinnungskaskade entstehen oder die von Thrombozyten freigesetzt werden, entfernten wir die Thrombozyten aus dem Plasma durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 2000 g. Nach Koagulation durch Zugabe von 5mM CaCl₂ hemmt nur Thrombozyten-reiches, aber nicht Thrombozyten-freies Plasma die RANTES Bindung an CHO Zellen (Abb. 4.28). Das an RANTES bindende Molekül wird also offensichtlich aus Thrombozyten freigesetzt.

Bei der Untersuchung von Seren von Patienten mit Thrombozytopenie und einer Thrombozytenzahl kleiner als 50000/µl zeigt sich, daß diese eine signifikant geringere Fähigkeit haben, die RANTES Bindung an CHO Zellen zu hemmen, als Seren mit Thrombozytenzahlen von mehr als 250000/µl (Abb. 4.29).

Zum endgültigen Nachweis, daß Thrombozyten den gesuchten an RANTES bindenden Faktor freisetzen, reinigten wir Thrombozyten von gesunden Spendern und aktivierten diese (1×10^6 /ml) mit Thrombin oder Kollagen. Dabei zeigte sich, daß der zellfreie Überstand nicht aktiverter Thrombozyten ebenso wie Kontrollmedium mit Thrombin oder Kollagen die RANTES Bindung nicht hemmen konnten. Im Gegensatz dazu hemmte der Überstand von Thrombozyten sowohl nach Aktivierung mit Thrombin als auch mit Kollagen die Bindung von RANTES mit einer Konzentration von 10 µg/ml an die Oberfläche von CHO Zellen fast vollständig (Abb. 4.30).

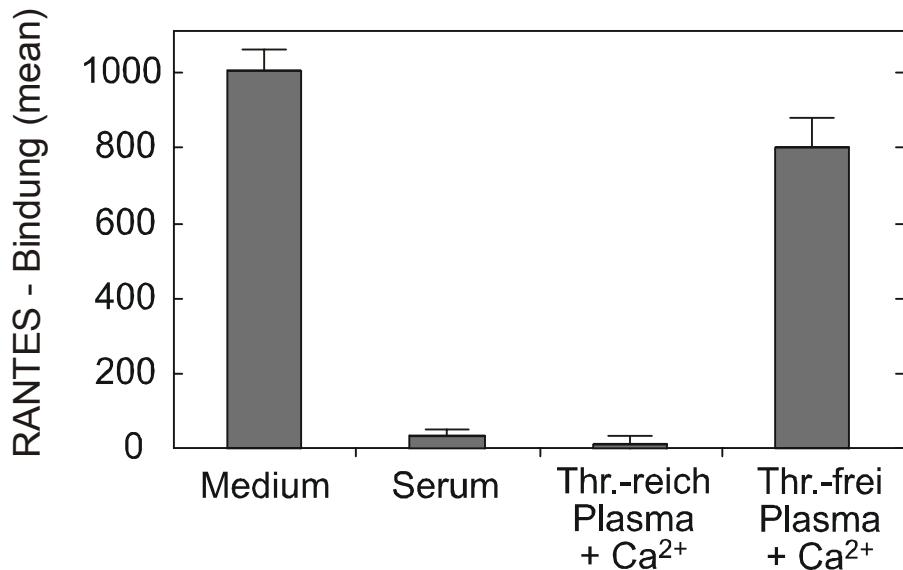


Abb. 4.28: Die Aktivierung von Thrombozyten ist Voraussetzung für die Eigenschaft von Serum, die RANTES Bindung an Zelloberflächen zu unterdrücken. Thrombozyten-reiches Plasma wurde gewonnen durch Zentrifugation von EDTA-Blut bei 200 g für 15 min., Thrombozyten-freies Plasma durch weitere Zentrifugation bei 2000 g für 15 min. Anschließend wurden beide durch Zugabe von 5 mM CaCl₂ zum Gerinnen gebracht. Präinkubation von RANTES mit einer Konzentration von 10 µg/ml verhindert RANTES Immobilisation auf Zelloberflächen nur im Fall von geronnem Thrombozyten-reichem, aber nicht Thrombozyten-freiem Plasma. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei.

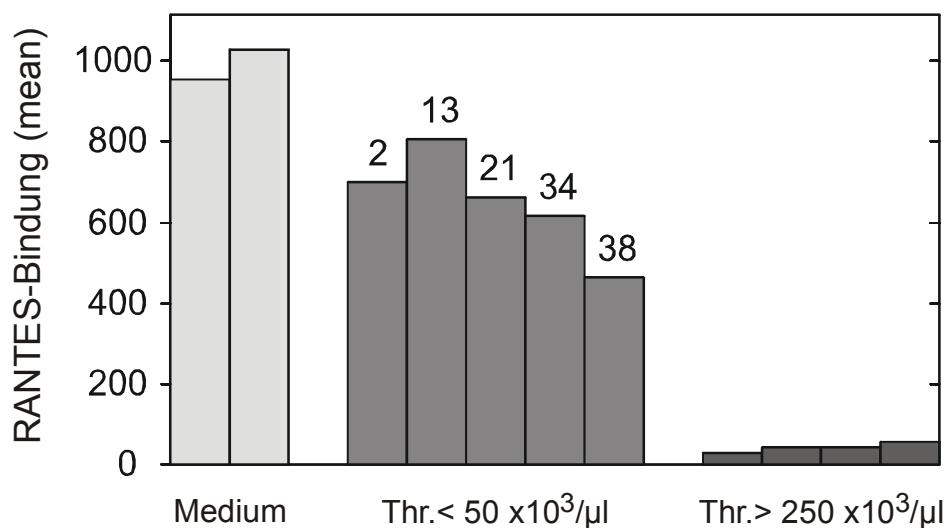


Abb. 4.29: Serum von Patienten mit Thrombozytopenie hat eine geringere Fähigkeit, die Immobilisation von RANTES an Zelloberflächen zu verhindern. Die jeweiligen Thrombozytenzahlen (x 10³/µl) sind über den Balken angegeben.

Bei Verdünnung des Überstands aktivierter Thrombozyten auf 30 %, 10% und 3%, entsprechend Thrombozytentzahlen von 300000/ μ l (vergleichbar mit Serum), 100000/ μ l und 33000/ μ l betrug die Hemmung 97%, 54% und 30% im Vergleich zur ungehemmten RANTES Bindung auf der Zelloberfläche (Daten nicht dargestellt).

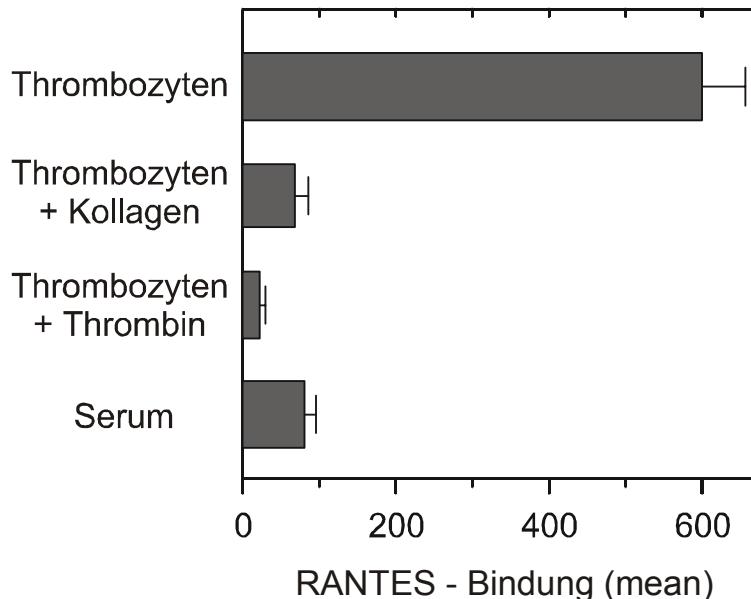


Abb. 4.30: Inkubation von RANTES mit zellfreiem Überstand von aktivierten gereinigten Thrombozyten verhindert die Bindung von RANTES an die Oberfläche von CHO Zellen. Die Thrombozyten ($1 \times 10^6 / ml$) wurden aktiviert mit Kollagen oder Thrombin für 10 min. bei 37°C und anschließend bei 2000 g für 15 min. zentrifugiert, um einen zellfreien Überstand zu erhalten. Der Überstand nichtaktivierter Thrombozyten und Serum dienten als Kontrollen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von fünf.

Nach Zentrifugation von Serum durch einen Centricon Filter mit einem Cut-off Molekulargewicht von 100 kD ließ sich die RANTES Bindung nur durch den Überstand, nicht aber durch das Zentrifugat hemmen, so daß das Molekulargewicht des gesuchten Faktors offensichtlich über 100 kD liegt. Außerdem bindet der gesuchte Faktor bei pH 7,0 leicht an DEAE Dextran (Daten nicht dargestellt). Wir nahmen deshalb an, daß das an RANTES bindende Molekül ein negativ geladenes Makromolekül wie zum Beispiel ein Glykosaminoglykan sein könnte. Da Thrombozyten bekanntermaßen nach Aktivierung Chondroitinsulfat A freisetzen, überprüften wir, ob der gesuchte Faktor Chondroitinsulfat A sein könnte, und verdauten den Überstand mit Chondroitinase ABC und als Kontrolle mit Heparinase I. Abb. 4.31 zeigt, daß nach Verdauung des Thrombozyten-Überstands mit Chondroitinase die Hemmung der RANTES Bindung an Zelloberflächen vollständig aufgehoben war, während die Verdauung des Thrombozyten Überstands mit Heparinase keinen Einfluß hatte. Dieses Ergebnis zeigt, daß Chondroitinsulfat A tatsächlich das gesuchte an RANTES bindende Molekül ist, das die Bindung von RANTES an Zelloberflächen hemmt.

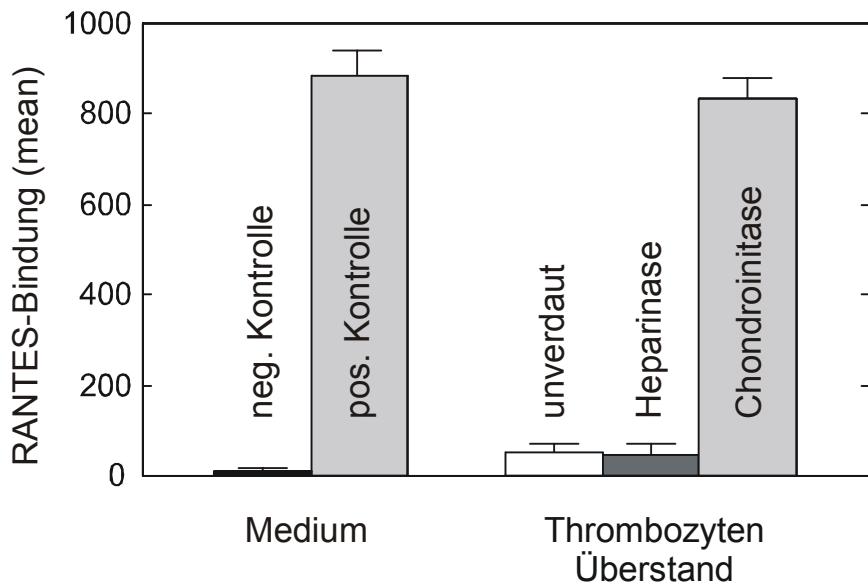


Abb. 4.31: Chondroitinsulfat A, das aus Thrombozyten freigesetzt wird, ist verantwortlich für die Verhinderung der RANTES Immobilisation an Zelloberflächen. Der Überstand Thrombin-aktivierter Thrombozyten wurde verdaut mit Chondroinitase ABC, Heparinase I oder zur Kontrolle unverdaut gelassen. RANTES wurde in einer Konzentration von 3 µg/ml präinkubiert mit Medium (pos. Kontrolle) oder mit verdautem oder unverdautem Überstand. Die Bindung von RANTES an der Zelloberfläche wurde nachgewiesen mit dem monoklonalen Antikörper VL-1 oder einer IgG-2b Isotypkontrolle (neg. Kontrolle). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von vier.

4.4.4. Chondroitinsulfat A verhindert die RANTES Immobilisation an Zelloberflächen und blockiert die funktionelle Antwort auf RANTES

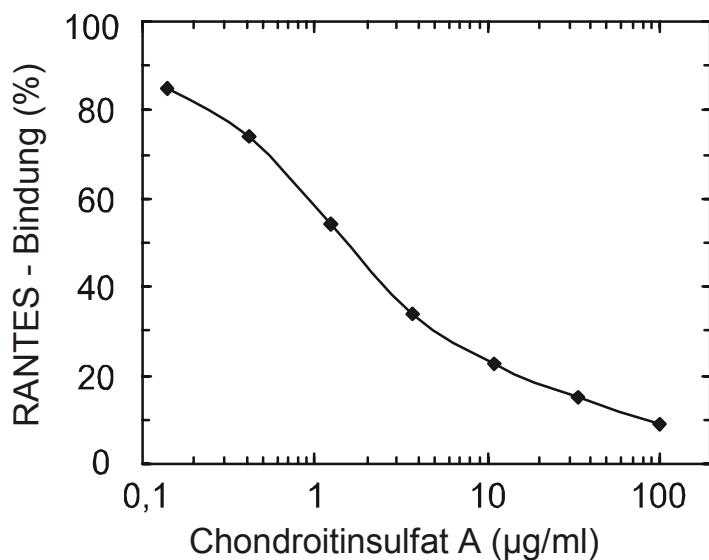


Abb. 4.32: Chondroitinsulfat A verhindert die Bindung von RANTES (mit einer Konzentration von 10 µg/ml) an die Oberfläche von CHO Zellen mit einem IC₅₀ von 4,1 µg/ml.

Um den Einfluß von Chondroitinsulfat A auf die RANTES Bindung an Zelloberflächen zu quantifizieren, wurde RANTES mit verschiedenen Konzentrationen von Chondroitinsulfat A präinkubiert und anschließend für eine Stunde mit CHO Zellen inkubiert. Wie in Abb. 4.32 gezeigt, reduzierte Chondroitinsulfat A die RANTES Bindung mit einem IC_{50} von 4.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und unterdrückte die Bindung um mehr als 90% bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Entsprechend reduzierte Chondroitinsulfat A die RANTES Bindung an Lymphozyten, Monozyten und Endothelzellen um fast zwei Größenordnungen (Abb. 4.33)

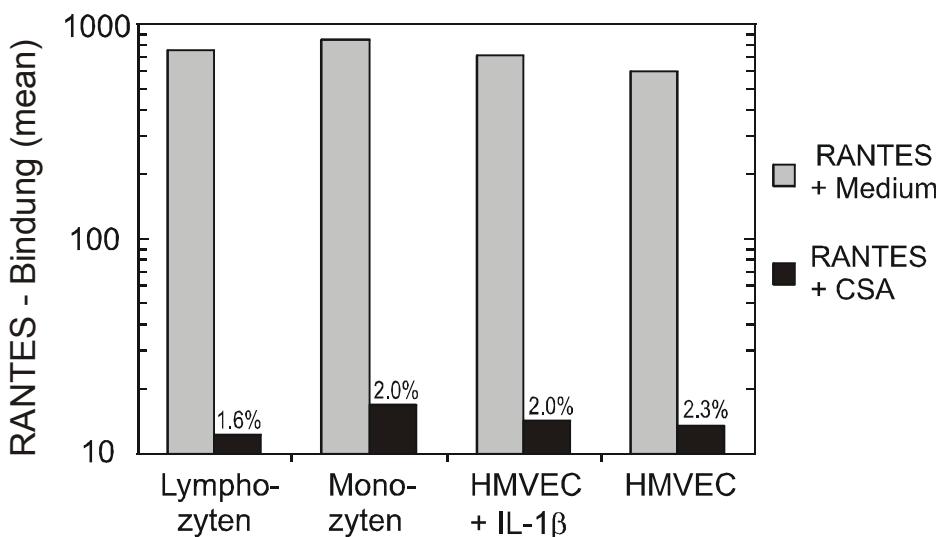


Abb. 4.33: Durch Präinkubation von RANTES mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chondroitinsulfat A kann die RANTES Bindung an Zelloberflächen von Lymphozyten, Monozyten und von IL-1 β aktivierten und nicht-aktivierten Endothelzellen (human microvascular endothelial cells, HMVEC) fast vollständig verhindert werden. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von zwei.

Man nimmt an, daß durch die Bindung von Chemokinen an Zelloberflächen höhere lokale Konzentrationen erreicht werden können und dadurch die funktionelle Antwort über die entsprechenden spezifischen Chemokinrezeptoren verstärkt wird. Um den Einfluß von Chondroitinsulfat A auf die durch RANTES vermittelte Aktivierung des Chemokinrezeptors CCR5 zu untersuchen, wurde deshalb der Calcium Einstrom und die Rezeptorinternalisierung in mit CCR5 transfizierten CHO Zellen untersucht.

Dabei hemmt Präinkubation von RANTES mit Chondroitinsulfat A den Calcium Einstrom in CCR5 positive CHO Zellen, ohne einen Einfluß auf deren Antwort auf Zugabe von Ionomycin zu haben (Abb. 4.34). Interessanterweise hatte Chondroitinsulfat A nur einen geringen Effekt auf die RANTES induzierte Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5. Bei Präinkubation von RANTES mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chondroitinsulfat A war in der FACS Analyse die Internalisierung von CCR5 nur um $8.4\% \pm 1.6\%$ ($\text{mean} \pm \text{SD}$) reduziert, verglichen mit der CCR5 Internalisierung durch RANTES alleine (Daten nicht dargestellt).

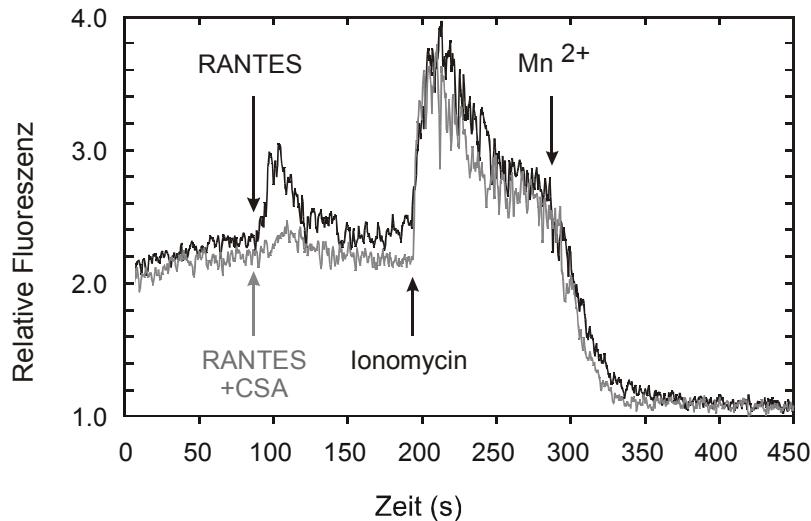


Abb. 4.34: Präinkubation von RANTES mit Chondroitinsulfat A blockiert den RANTES induzierten Calcium Einstrom in CCR5 transfizierte CHO Zellen. Die Zellen wurden mit Fura-3AM beladen. Der Calcium Einstrom wurde induziert durch 1 µg/ml RANTES (schwarze Kurve) oder Komplexe von RANTES (1 µg/ml) mit Chondroitinsulfat A (100 µg/ml) (graue Kurve). Als Positivkontrolle wurde bei 200 sec. Ionomycin zugegeben. Durch Zugabe von MnCl₂ (1 mM) bei 300 ms wurde das Fluoreszenzsignal vollständig unterdrückt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von zwei.

Zusammenfassend zeigte sich, daß humanes Serum ein Molekül enthält, das die RANTES-Bindung an Endothelzellen, PBMC und CHO Zellen unterdrückt. Mittels Thrombozyten-reichem und Thrombozyten-armem Plasma, gereinigten Thrombozyten und Serum von Patienten mit Thrombozythämie wurden Thrombozyten als die Quelle und Chondroitinsulfat A als das Chemokin-bindende Molekül identifiziert. Gereinigtes Chondroitinsulfat A verhindert die RANTES-Bindung an Endothelzellen, PBMC und CHO Zellen mit einem IC₅₀ von 4,1 µg/ml. Ebenso unterdrückt es den RANTES-vermittelten Calcium-Einstrom in transfizierte CCR5-positive CHO Zellen, hat jedoch nur einen geringen Einfluß auf die Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5.

5. Diskussion

Chemokine und ihre Rezeptoren wurden in den letzten Jahren mit vielen verschiedenen Krankheitsbildern in Zusammenhang gebracht. Eine Sonderstellung geniessen dabei das Chemokin RANTES und der Rezeptor CCR5, der nicht nur als Korezeptor bei der HIV-Infektion mit M-tropen Virenstämmen bekannt geworden ist, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten bei Entzündungsreaktionen spielt. Durch die Entdeckung der partiell antagonistischen Eigenschaften von Met-RANTES, das bei der zytosolischen Expression von RANTES in E.coli entsteht, wurde die Bedeutung des NH₂-Terminus von RANTES für Bindung und Aktivierung des Chemokinrezeptors CCR5 entdeckt. Dies wurde bestätigt durch eine RANTES Mutagenese, bei der jeweils eine Aminosäure durch Alanin ersetzt wurde [68]. Dabei wurden 5 der ersten 15 NH₂-terminalen Aminosäuren identifiziert, die eine besondere Rolle bei Bindung und Aktivierung von CCR5 spielen. Bei einer Verkürzung des NN₂-Terminus um mehrere Aminosäuren wurde Δ2-RANTES als im Vergleich zu RANTES stärkerer Agonist an CCR5 erkannt. Schließlich wurde mit AOP-RANTES durch Anfügen einer chemischen Modifikation an den NH₂-Terminus ein sehr potenter Rezeptorantagonist gefunden, der im Gegensatz zu allen zuvor beschriebenen RANTES Modifikationen zwar zu einer starken Rezeptorinternalisierung führt, anschließend aber durch Verhinderung des Rezeptorrecyclings eine dauerhafte Blockade von CCR5 bewirkt [58]. Deshalb schien das Studium weiterer RANTES Modifikationen insbesondere durch Verlängerung des NH₂-Terminus um wenige Aminosäuren erfolgversprechend, um neue CCR5 Antagonisten zu finden. Diese könnten insbesondere als Teil eines Fusionsproteins zur simultanen Blockade der beiden Rezeptoren CD4 und CCR5 eingesetzt werden.

Zur Erzeugung von mehreren RANTES Modifikationen wurde ein Expressionssystem benötigt, mit dem kleine Proteine in einem einfach durchführbaren Protokoll in ihrer korrekten Faltung und vollen Funktion exprimiert und gereinigt werden können. Diese Voraussetzungen werden erfüllt durch die Expression im periplasmatischen Spalt von E. coli, die bisher für Chemokine noch nicht angewendet worden war. Wir konnten zeigen, daß sich RANTES und seine Modifikationen mit einer Ausbeute von einigen 100 µg aus einer Liter-Kultur von transformierten E.coli erzeugen lassen. Durch Hinzufügen eines Histidin-Tag an den COOH-Terminus von RANTES wurde eine bequeme und sehr effiziente einstufige Reinigung mittels Affinitätschromatographie ermöglicht. Dabei zeigt das ungereinigte Periplasmalysat mit RANTES mit und ohne Histidin-Tag eine identische Internalisierung von CCR5 in der FACS-Analyse. Der Vergleich von gereinigtem periplasmatischem RANTES mit Histidin-Tag mit RANTES aus verschiedenen anderen Expressionssystemen, wie z.B. zytosolisch in inclusion bodies von E.coli exprimiertem, synthetisch aus einzelnen Aminosäuren hergestelltem oder eukaryontisch in CHO Zellen exprimiertem RANTES wiederum zeigt identische Ergebnisse bei CCR5 Internalisierung, Rezeptorrecycling, intrazellulärer Calcium-Mobilisation und Bindung an CCR5. Damit konnte die volle Funktionalität von RANTES aus periplasmatischer Expression in E.coli nachgewiesen werden.

Die periplasmatische Expression hat gegenüber anderen gebräuchlichen Expressionssystemen viele Vorteile. Zwar lassen sich mittels bakterieller Expression in inclusion bodies im Zytoplasma von E. coli große Proteinmengen in der Größenordnung von Gramm aus einer Liter-Kultur erzeugen, die allerdings im Fall von RANTES ein zusätzliches Methionin am NH₂-Terminus aufweisen. Da im bakteriellen Zytoplasma außerdem die notwendigen Enzyme zur Ausbildung von Disulfidbrücken fehlen, muß die korrekte Konformation durch ein aufwendiges „Faltungs-Protokoll“ nachträglich hergestellt

werden. Dieselbe Prozedur wird auch nach der chemischen Synthese von Chemokinen aus einzelnen Aminosäuren benötigt. Bei der eukaryontischen Expression entstehen zwar korrekt gefaltete Proteine, allerdings mit einer sehr geringen Ausbeute. Aufgrund von Proteolyse sind diese Chemokine häufig bereits direkt nach der Sezernierung degradiert. Bei in CHO-Zellen exprimiertem RANTES fehlten einem großen Anteil der Proteine die ersten zwei oder drei NH₂-terminalen Aminosäuren. Im Gegensatz dazu konnte bei der periplasmatischen Expression von RANTES mittels einer Proteinsequenzierung eine korrekte Aminosäuresequenz des NH₂-Terminus nachgewiesen werden (durchgeführt von GlaxoWellcome; Ergebnisse nicht gezeigt). Mit dem Nachweis der vollen Funktionalität trotz des COOH-terminalen His-Tags stand also ein schnelles und einfaches Expressionsystem zur Verfügung, mit dem Chemokine und deren Modifikationen innerhalb weniger Experimentstage in ausreichender Menge hergestellt und gereinigt werden können.

Die Modifizierung der Aminosäurestruktur von RANTES konnte nun durch geeignete Primer-Wahl, Amplifikation der modifizierten DNA mittels PCR, Einfügen der amplifizierten DNA in einen geeigneten Vektor, Transformation von kompetenten E.coli, Expression, Periplasmalyse und Reinigung mittels Affinitätschromatographie erfolgen. Auf diese Weise wurden 18 verschiedene RANTES Modifikationen erzeugt. Zur Kontrolle wurde nach Transformation der kompetenten Bakterien mittels DNA-Präparation und Sequenzierung die korrekte DNA-Sequenz nachgewiesen.

Zur Überprüfung der Eigenschaften der RANTES Modifikationen wurden mittels FACS-Analyse die CCR5 Internalisierung und ggf. das Rezeptorrecycling untersucht. Außerdem wurde durch Verdrängung von radioaktiv markiertem periplasmatisch exprimiertem RANTES die Bindung der RANTES Modifikationen im Vergleich zu unmodifiziertem RANTES bestimmt. Die Messung der intrazellulären Calcium-Mobilisation mit den zur Verfügung stehenden Geräten, die beim Nachweis der Funktionalität von periplasmatisch exprimiertem RANTES zum Einsatz kam, ist wegen der auf wenige Proben pro Experimenttag beschränkten Kapazität als Screening-Verfahren ungeeignet. Die Bestimmung der Chemotaxis in einer 96-Well Boyden-Kammer war mit stabil transfizierten CCR5-positiven CHO Zellen nicht möglich (Ergebnisse nicht gezeigt). Offensichtlich fehlt den CHO Zellen die Fähigkeit zur gerichteten Migration trotz Transfizierung mit einem funktionsfähigen Chemokinrezeptor. Mit einer Monozytenzelllinie konnte später die Migration entlang eines RANTES Gradienten gezeigt werden (Dr. C. Klier, Medizinische Poliklinik der LMU; Ergebnisse nicht gezeigt). Doch auch dieses Verfahren ist wegen der großen Probenzahl zu aufwendig und nicht zum Screening der RANTES Modifikationen geeignet.

Unter den verschiedenen denkbaren Möglichkeiten der Bindung und Aktivierung eines Rezeptors sind zwei Versionen besonders gut als Rezeptorantagonisten geeignet. Dies sind die effiziente Bindung an den Rezeptor ohne dessen Aktivierung und noch besser eine Bindung mit Rezeptorinternalisierung und unterdrücktem Rezeptorrecycling, so daß nach eventueller einmaliger Aktivierung keine Rezeptoren für eine weitere Zellantwort auf einen Chemokinreiz zur Verfügung stehen. Mit den oben beschriebenen Screening-Verfahren könnten beide Antagonistenversionen problemlos identifiziert werden.

Da zu Beginn der Arbeit die antagonistischen Eigenschaften von Met-RANTES und AOP-RANTES bereits bekannt waren [58, 71], wurden in einer ersten Generation von Modifikationen einzelne basische, saure und neutrale Aminosäuren an den NH₂-Terminus von RANTES angefügt, sowie die Kombination aus Isoleucin und Glycin, die der Struktur von AOP-RANTES am ähnlichsten war. Dabei zeigte sich in der FACS-Analyse eine mit unmodifiziertem RANTES verbleichbare Rezeptorinternalisierung durch Isoleucin-Glycin-RANTES. Auch bei den Bindungsexperimenten lag einzig die Kurve von Isoleucin-Glycin-RANTES nahe derjenigen von RANTES. Die anderen Modifikationen der ersten

Generation Leucin-RANTES, Issoleucin-RANTES, Lysin-RANTES, Glutamin-RANTES und Glutamat-RANTES zeigten unabhängig von sauren, basischen oder neutralen Eigenschaften eine nur sehr geringe Rezeptorinternalisierung und eine deutlich schlechtere Bindung an CCR5 als unmodifiziertes RANTES.

Deshalb wurden in einer zweiten Generation verschiedene Kombinationen aus zwei zusätzlichen NH₂-terminalen Aminosäuren getestet. Außerdem zeigte sich bei der Proteineinsequenzierung von RANTES aus eukaryontischer Expression in CHO-Zellen (durchgeführt von GlaxoWellcome; Ergebnisse nicht gezeigt), daß ein großer Teil des exprimierten Chemokins degradiert und um zwei bis drei NH₂-terminale Aminosäuren verkürzt war. Da dieses verkürzte eukaryontische RANTES eine stärkere CCR5 Rezeptorinternalisierung als unmodifiziertes periplasmatisches RANTES zeigte, wurden auch Δ2-RANTES und Δ3-RANTES untersucht. Von den Kombinationen aus zwei bzw. drei zusätzlichen NH₂-terminalen Aminosäuren zeigten Phenylalanin-Glycin-RANTES und Methionin-Glycin-RANTES eine eindeutige Rezeptorinternalisierung, die aber deutlich hinter derjenigen von unmodifiziertem RANTES zurückblieb. Auch die Bindungskurven lagen zwar nahe bei derjenigen von RANTES, erreichten aber nicht die Affinität von Isoleucin-Glycin-RANTES. Die Modifikationen Isoleucin-Isoleucin-RANTES, Isoleucin-Prolin-RANTES, Isoleucin-Glycin-Glycin-RANTES und Δ3-RANTES zeigten wiederum eine sehr geringe Rezeptorinternalisierung und eine deutlich schlechtere Bindung an CCR5 als unmodifiziertes RANTES. Hingegen bewirkte Δ2-RANTES eine stärkere CCR5 Internalisierung und die Bindungsexperimente zeigten eine bessere Verdrängung des radioaktiv markierten RANTES als RANTES selbst.

In einer dritten Generation wurden deshalb Modifikationen erzeugt, bei denen die aktivsten Aminosäurekombinationen Isoleucin-Glycin, Phenylalanin-Glycin und Methionin-Glycin an Δ2-RANTES angefügt wurden. Diese zeigten alle eine deutliche Rezeptorinternalisierung, die aber geringer war als die durch RANTES, Δ2-RANTES oder Isoleucin-Glycin-RANTES verursachte. Zwei weitere Modifikationen entstanden durch Wiederholung der ersten drei bzw. vier NH₂-terminalen Aminosäuren von Δ2-RANTES. Die beiden Modifikationen Tyrosin-Serin-Serin-Δ2-RANTES und Tyrosin-Serin-Serin-Aspartat-Glycin-Glycin-Δ2-RANTES mit zwei zusätzlichen Glycinen als Linker zeigten jedoch nicht die geringste CCR5 Internalisierung.

Bei einer Titration derjenigen Modifikationen, die in hoher Konzentration eine deutliche Internalisierung zeigten, fand sich eine nahezu identische Konzentrationsabhängigkeit wie für RANTES. Die maximale Rezeptorinternalisierung, bei der noch etwa ein Drittel der ursprünglich auf der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptoren nachweisbar sind, wird für die Modifikationen wie für RANTES bei einer Konzentration von 125 nM erreicht. Auch das Rezeptorrecycling nach CCR5-Internalisierung durch die RANTES Modifikationen ist identisch demjenigen für RANTES. Bereits nach 30 Minuten ist etwa 80% der ursprünglich vorhandenen Fluoreszenzintensität wieder auf der Zelloberfläche nachweisbar. Nach einer Stunde Recyclingzeit hat die Fluoreszenzintensität wieder etwa die gleiche Höhe erreicht wie die Mediumkontrolle. Es findet sich also im Gegensatz zu AOP-RANTES keine NH₂-terminale RANTES Modifikation, die den Rezeptor CCR5 dauerhaft blockieren kann, indem nach starker Rezeptorinternalisierung das Recycling verhindert wird.

Zusammenfassend war also eine starke Bindung an den Chemokinrezeptor CCR5 bei den untersuchten RANTES Modifikationen verknüpft mit einer entsprechend starken Internalisierung des Rezeptors bei ungestörtem Rezeptorrecycling. Umgekehrt zeigten die Modifikationen mit geringer Rezeptorinternalisierung auch eine deutlich schwächere Bindung. Ein Antagonist mit den oben geforderten Eigenschaften konnte also nicht gefunden werden. Für Fusionsproteine geeignete Linker-Strukturen wurden jedoch gefunden, z.B. durch Anfügen von Isoleucin-Glycin- an RANTES oder Isoleucin-Glycin-, Phenylalanin-Glycin- oder Methionin-Glycin- an Δ2-RANTES. Die Bindung und

Aktivierung scheint dabei von der sterischen Struktur des gesamten NH₂-Terminus abzuhängen, aber wenig von der individuellen letzten NH₂-terminalen Aminosäure. Die Modifikationen mit einer deutlichen CCR5 Internalisierung endeten mit einem aliphatischen Isoleucin, einem aromatischen Phenylalanin oder Tyrosin (bei Δ2-RANTES), einer schwefelhaltigen Seitenkette beim Methionin oder der aliphatischen Hydroxylgruppe von Serin (bei RANTES selbst). Dabei fand sich die stärkste CCR5 Internalisierung für Δ2-RANTES mit einem NH₂-terminalen Tyrosin, dessen Hydroxylgruppe mit einem pK von 10,0 das Proton freisetzt. Hingegen zeigte das ebenfalls basische Lysin-RANTES, dessen Aminogruppe auch ein Proton mit einem pK von 10,0 freisetzt, nicht die geringste CCR5 Internalisierung. Das ungestörte Recycling bei den Modifikationen mit deutlicher Internalisierung ist nicht verwunderlich. Der Ligand wird dabei zusammen mit dem Rezeptor und kleinen Membranpartikeln in das Zellinnere eingeschnürt. Dort stehen Enzyme zur Verfügung, die den Liganden in seine Bestandteile zerlegen und die Aminosäuren damit für eine weitere Nutzung zur Verfügung stellen können. Dabei ist leicht einsehbar, daß chemische Modifikationen wie bei AOP-RANTES im Gegensatz zu gewöhnlichen Aminosäuren von diesen Enzymen eventuell nicht verarbeitet werden können.

Da sich unter den Modifikationen der dritten Generation keine fand, die eine bessere CCR5 Internalisierung als RANTES zeigte, und da bei den zuvor untersuchten Modifikationen eine starke Bindung an CCR5 immer mit einer entsprechend starken Internalisierung einherging, wurde auf die aufwendigen Bindungsexperimente zugunsten des im Folgenden beschriebenen Projektes verzichtet.

Bei Bindungsexperimenten fand sich, daß die gemessene Aktivität des radioaktiv markierten RANTES bei hohen Konzentrationen von unmarkiertem RANTES deutlich ansteigt trotz der damit verbundenen stärkeren Verdrängung vom RANTES-spezifischen Rezeptor CCR5. Diese Beobachtung fand sich sowohl auf CCR5-positiven CHO-Zellen wie auch auf CXCR4-positiven CHO-Zellen. Die erwartete Verdrängungskurve ließ sich errechnen durch die Differenz der gemessenen Aktivität an CCR5-positiven minus derjenigen an CXCR4-positiven CHO-Zellen. Auch in der Flowzytometrie ließ sich durch Färbung mit einem Anti-RANTES-Antikörper ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität auf CHO Zellen bei Inkubation mit steigenden RANTES-Konzentrationen erkennen. Diese Bindung an die Zelloberfläche ist unabhängig vom spezifischen Chemokinrezeptor und ist sowohl für periplasmatisches wie für synthetisches RANTES und für zytoplasmatisches RANTES aus inclusion bodies nachweisbar. Offensichtlich finden sich auf der Zelloberfläche spezifische oder unspezifische Bindungsstellen für RANTES unabhängig von den Chemokinrezeptoren. Diese haben wohl eine deutlich geringere Affinität für RANTES als CCR5, da bei den Bindungsexperimenten die CCR5-spezifische Bindung sehr gut von allen anderen Effekten abgrenzbar war. Trotzdem lässt sich der Anstieg der Aktivität bei hohen RANTES-Konzentration nicht allein durch diese Bindungsstellen erklären. Bei allen reversiblen Bindungsformen sollte das radioaktiv markierte RANTES genauso verdrängt werden wie bei der Bindung an CCR5. Die gemessene Aktivität sollte also abnehmen. Bei einer irreversiblen Bindung sollte die Aktivität zumindest nicht stark zunehmen, sondern höchstens konstant sein. Andererseits ist bekannt, daß RANTES bei hohen Konzentrationen Dimere und Multimere bildet [81]. Die gemessene Zunahme der Aktivität bei den Bindungsexperimenten und der Fluoreszenzintensität bei der FACS-Analyse entsteht also offensichtlich durch Aggregation von RANTES zu Multimeren und Bindung an Chemokinrezeptor-unabhängigen Bindungsstellen mit niedrigerer Affinität auf der Oberfläche von Zellen.

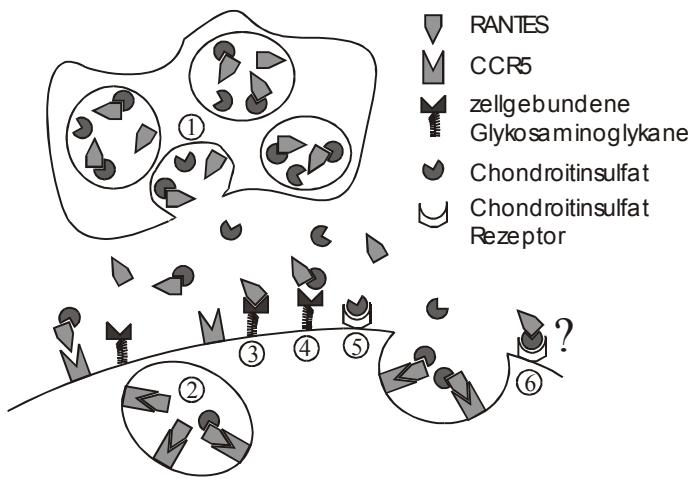


Abb. 5.1: (1) Aktivierte Thrombozyten setzen aus α -Granula RANTES und einen Überschuß von Chondroitinsulfat A frei. (2) Freies oder im Komplex mit Chondroitinsulfat A gebundenes RANTES kann durch Bindung an CCR5 die Zelle aktivieren und wird dabei zusammen mit dem Rezeptor internalisiert. (3) Zellgebundene Glykosaminoglykane können an Heparin-Bindungsstellen von RANTES binden und es damit auf der Zelloberfläche präsentieren. (4) Für Komplex-gebundenes RANTES mit Chondroitinsulfat A sind die Heparin-Bindungsstellen von RANTES bereits besetzt und die Präsentation auf der Zelloberfläche kann nicht durch membranständige Glykosaminoglykane erfolgen. (5) Auf Zelloberflächen gibt es jedoch auch verschiedene Chondroitinsulfat Rezeptoren. (6) Eventuell kann dadurch indirekt eine Präsentation von RANTES erfolgen.

Die Präsentation von Chemokinen auf der Oberfläche von Endothelzellen ist entscheidend für die selektive Rekrutierung von Leukozyten. Bei einer Entzündung, Gewebeschädigung oder Thrombose werden Chemokine produziert und potentiell in das Kreislaufsystem freigesetzt. Unkontrollierte Akkumulation von an Zelloberflächen gebundenen Chemokinen könnte die Empfindlichkeit einer notwendigen Reaktion behindern oder sogar eine überaggressive Entzündungsantwort bewirken. Wir stellten deshalb die Hypothese auf, daß endogene Moleküle existieren, die an Chemokine binden und sie aus dem Kreislaufsystem entfernen und damit als „Chemokinpuffer“ wirken. Mit RANTES als Sonde konnte gezeigt werden, daß die Bindung von RANTES an der Oberfläche von Endothelzellen, PBMC und CHO Zellen sehr effektiv moduliert wird durch Chondroitinsulfat A, das aus Thrombozyten freigesetzt wird. Experimente mit Thrombozyten-freiem Plasma, Thrombozyten-reichem Plasma, gereinigten Thrombozyten und Serum von Patienten mit Thrombozytopenie zeigten, daß die RANTES bindenden Moleküle im humanen Serum aus Thrombozyten stammen. Nach Aktivierung mit Thrombin oder Kollagen setzen Thrombozyten einen Überschuß von Chondroitinsulfat A frei. Dieser blockiert nicht nur die Oberflächenbindung von RANTES, das selbst in großen Mengen aus Thrombozyten freigesetzt wird [44,46], sondern verhindert auch die Immobilisierung von exogen zugegebenem RANTES mit Konzentrationen bis zu 10 µg/ml. Nach Verdau des Überstandes von aktivierte Thrombozyten mit Chondroitinase ABC wurde die RANTES Immobilisation nicht länger blockiert, womit gezeigt werden konnte, daß Chondroitinsulfat A der verantwortliche Faktor ist. Durch eine Verdünnung von Serum mit PBS wurde gezeigt, daß die RANTES Präsentation um mehr als 97% bzw. 54% verringert werden konnte, wenn der Serum-Anteil noch 90% bzw. 30% betrug. Fast identische Ergebnisse wurden mit gereinigten Thrombozyten in einer Konzentration von 300,000/µl bzw. 100,000/µl erzielt. Okayama et al. [65] berechneten die aus Thrombozyten freigesetzte Menge an Chondroitinsulfat A als ca. 1,5 µg Hexuronat / ml bei einer Thrombozyten-Konzentration von 3×10^6 / ml. Dort wird auch beschrieben, daß aus

Thrombozyten freigesetztes Chondroitinsulfat A vollständig sulfatisiert ist, während im Plasma vorhandenes Chondroitinsulfat A (5.8 µg Hexuronat / ml) nur geringfügig sulfatisiert ist. Da Plasma die RANTES Bindung nicht verringern konnte, hat gering sulfatisiertes Chondroitinsulfat A offensichtlich nur einen kleinen Einfluß auf die Unterdrückung der RANTES Bindung an Oberflächen. Kommerziell erhältliches Chondroitinsulfat A (Sigma) blockierte die RANTES Präsentation auf Zelloberflächen mit einer 50%-igen Inhibierungskonzentration IC₅₀ von 4,1 µg/ml und war damit deutlich weniger aktiv als vollständig sulfatisiertes Chondroitinsulfat A aus Thrombozyten. Damit ist vorstellbar, daß auch unter *in vivo* Bedingungen in geschädigtem Gewebe mit Akkumulation und Aktivierung von Thrombozyten ausreichende Konzentrationen von Chondroitinsulfat A freigesetzt werden, um die Präsentation von Chemokinen auf Zelloberflächen zu beeinflussen.

Um den Einfluß von Chondroitinsulfat A auf die durch RANTES vermittelte feste Adhäsion von Leukozyten zu untersuchen, wurden Flußexperimente mit Monozyten auf aktivierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen durchgeführt [59]. Chondroitinsulfat A verringerte die RANTES vermittelte Adhäsion von Monozyten sehr effektiv auf das Niveau der Kontrollwerte. Die Inhibition der Monozytenadhäsion durch Chondroitinsulfat A könnte durch die verringerte RANTES Präsentation auf den Endothelzellen oder durch eine verringerte Aktivierung der Chemokinrezeptoren bedingt sein. Es ist gezeigt worden, daß Komplexe aus RANTES mit Glykosaminoglykanen an CCR5 binden können, aber keine intrazelluläre Calcium Mobilisation induzieren können [13]. Chondroitinsulfat A könnte deshalb einen doppelten Effekt ausüben durch Blockade der Chemokinpräsentation auf Zelloberflächen und durch Veränderung der Interaktionen von Chemokinen mit ihren spezifischen Rezeptoren. Wir untersuchten deshalb den Einfluß von Chondroitinsulfat A auf die RANTES induzierte intrazelluläre Calcium Mobilisation und auf die Internalisierung von CCR5. Dabei zeigte sich, daß Chondroitinsulfat A den Calcium-Einstrom in die Zellen verringert, aber die Rezeptorinternalisierung von CCR5 nur gering beeinflusst. Interessanterweise korreliert bei Patienten mit Thrombozytopenie eine geringe Thrombozytenzahl mit einer geringen Fähigkeit von Serum, die RANTES Präsentation auf Zelloberflächen zu blockieren. Deshalb könnte eine bei Patienten mit bestimmten Kollagenosen beobachtete Thrombozytopenie zur Schwere der Autoimmunkrankheit beitragen, indem durch die geringe Thrombozytenzahl nur wenig Chondroitinsulfat zur Verfügung steht. Dadurch würde die Immobilisierung von RANTES auf Zelloberflächen kaum blockiert werden, und damit durch die gesteigerte RANTES Präsentation eine verstärkte Einwanderung von Leukozyten in das entzündliche Geschehen erklären.

Die Immobilisierung von Chemokinen auf Zelloberflächen ist in erster Linie vermittelt durch Glykosaminoglykane, die auf der Zelloberfläche exprimiert sind. Dies konnte gezeigt werden durch enzymatische Entfernung der Glykosaminoglykane, was zu einer verminderten Chemokinbindung führt [37,67]. Lösliche Glykosaminoglykane würden mit zellgebundenen Glykosaminoglykanen um die Chemokinbindung konkurrieren. Wir konnten zeigen, daß Chondroitinsulfat A direkt an RANTES bindet, und konnten die Möglichkeit ausschließen, daß im Serum oder im Überstand aktiverter Thrombozyten zusätzliche Faktoren (z.B. andere Chemokine) enthalten sind, die mit RANTES um die Bindung auf Zelloberflächen konkurrieren. Glykosaminoglykane können ubiquitär auf Zelloberflächen [47] und in der extrazellulären Matrix gefunden werden [42]. Entsprechend fanden wir, daß RANTES unter *in vitro* Bedingungen an eine Vielzahl von Zellen bindet wie z.B. Lymphozyten, Monozyten, CHO Zellen und Endothelzellen. Andererseits könnte die RANTES Immobilisierung *in vivo* im Vergleich dazu stark eingeschränkt sein, da der Großteil von RANTES als Komplex mit Glykosaminoglykanen vorliegen wird. Thrombozyten setzen RANTES aus α-Granula offensichtlich zusammen mit Chondroitinsulfat A frei und eine entsprechende Beobachtung wurde für T Zellen

beschrieben [90]. Im Gegensatz zu freiem RANTES kann der Komplex aus RANTES und Chondroitinsulfat A nicht an membranständige Glykosaminoglykane auf der Zelloberfläche binden. Eine Immobilisierung des Komplexes könnte aber trotzdem durch Bindung an spezifische Rezeptoren für Chondroitinsulfat A erfolgen. Bis jetzt wurden mindestens zwei Rezeptoren für Chondroitinsulfat A beschrieben. Dazu gehören die v6 und v7 Isoformen des Glykoproteins CD44 [82] und der Makrophagen Mannose Rezeptor [54], die beide auf Endothelzellen exprimiert sein können. Die Expression von CD44 und seiner Spaltvarianten wird durch inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1 α , IL-15 und TNF- α [25,28,34,62] gesteuert. Die Expression von Glykosaminoglykan-Rezeptoren auf Endothelzellen könnte die spezifische Bindung von Komplexen bestehend aus Chemokinen und Chondroitinsulfat A ermöglichen und so zur Lokalisierung von Chemokinen am Ort des entzündlichen Geschehens beitragen. Die Freisetzung von Chondroitinsulfat A erscheint als wichtiger Mechanismus, um die Rekrutierung von Leukozyten in einer sehr frühen Phase der Enzündungsreaktion zu steuern.

Für ein zukünftiges Projekt wäre es sehr interessant, den Einfluß der Komplex-Bindung von RANTES und Chondroitinsulfat A auf die RANTES-vermittelte Produktion und Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen zu untersuchen [43,55,74,95].

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt zum einen die Entwicklung von 18 NH₂-terminalen Modifikationen des Chemokins RANTES und deren Charakterisierung bezüglich Bindung und Aktivierung des Chemokinrezeptors CCR5. Gesucht wurde dabei einerseits nach Rezeptorantagonisten, die entweder die Aktivierung oder das Rezeptorrecycling verhindern, und andererseits nach geeigneten Linker-Strukturen für die Erzeugung von Fusionsproteinen mit RANTES als COOH-terminalen Partner zur gleichzeitigen Blockade der Rezeptoren CD4 und CCR5.

Die RANTES-cDNA wurde in einen OA-Vektor zur Expression im periplasmatischen Raum von E.coli kloniert. Durch Anfügen einer COOH-terminalen Kette aus sechs Histidinen wurde eine sehr effiziente einstufige Reinigung mittels Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA Agarose Säule ermöglicht. Es konnte demonstriert werden, daß periplasmatisch exprimiertes RANTES mit COOH-terminalen His-Tag die gleiche Funktion und Bindung an CCR5 zeigt wie RANTES aus drei anderen Expressionssystemen. Dazu wurden durchflußzytometrische Experimente zu Rezeptorinternalisierung und -recycling an PBMC und an stabil transfizierten CCR5-positiven CHO Zellen durchgeführt, die intrazelluläre Calcium-Mobilisation in CCR5⁺ CHO Zellen bestimmt und schließlich mit radioaktiv markiertem ¹²⁵I-RANTES die Bindung von RANTES aus verschiedenen Expressionssystemen an CCR5⁺ CHO Zellen verglichen.

Nachdem die volle Funktionalität von periplasmatisch exprimiertem RANTES gezeigt werden konnte, wurden durch geeignete Primer-Wahl mittels PCR NH₂-terminale RANTES-Modifikationen erzeugt. Durch Verdrängung von radioaktiv markiertem ¹²⁵I-RANTES wurde deren Bindung an CCR5⁺ CHO Zellen verglichen mit derjenigen von unmarkiertem periplasmatischem RANTES. Außerdem wurden wieder in durchflußzytometrischen Experimenten die Rezeptorinternalisierung und das -recycling an PBMC und an stabil transfizierten CCR5-positiven CHO Zellen untersucht. Dabei war bei den untersuchten RANTES Modifikationen eine starke Bindung an den Chemokinrezeptor CCR5 stets verknüpft mit einer entsprechend starken Internalisierung des Rezeptors bei ungestörtem Rezeptorrecycling. Umgekehrt zeigten die Modifikationen mit geringer Rezeptorinternalisierung auch eine deutlich schwächere Bindung. Ein Antagonist mit den oben geforderten Eigenschaften konnte also nicht gefunden werden. Für Fusionsproteine geeignete Linker-Strukturen wurden jedoch gefunden, z.B. durch Anfügen von Isoleucin-Glycin- an RANTES oder Isoleucin-Glycin-, Phenylalanin-Glycin- oder Methionin-Glycin- an Δ2-RANTES.

Da sich bei den Bindungsexperimenten und in der Durchflußzytometrie eine vom spezifischen Chemokinrezeptor unabhängige RANTES-Bindung an Oberflächen verschiedener Zellen zeigte, wurde im zweiten Teil der Arbeit diese Chemokinimmobilisierung untersucht. Die Sequestrierung von Chemokinen auf die Oberfläche von mikrovaskulärem Endothel ist ein frühes Ereignis bei der selektiven Rekrutierung von Leukozyten. Die Chemokinsequestrierung und –präsentation muß deshalb engmaschig kontrolliert sein, um die Rekrutierung der Leukozyten zu begrenzen und eine unkontrollierte Entzündungsreaktion zu verhindern. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob lösliche Moleküle, die unter physiologischen Bedingungen freigesetzt werden, durch Bindung an Chemokine die Chemokinimmobilisierung auf Zelloberflächen regulieren können. Es zeigte sich, daß humanes Serum ein Molekül enthält, das die RANTES-Bindung an Endothelzellen, PBMC und CHO Zellen unterdrückt. Mittels Thrombozyten-reichem und Thrombozyten-armem Plasma, gereinigten Thrombozyten und Serum von Patienten mit Thrombozythämie wurden Thrombozyten als die Quelle und Chondroitinsulfat A als das Chemokin-bindende

Molekül identifiziert. Gereinigtes Chondroitinsulfat A verhindert die RANTES-Bindung an Endothelzellen, PBMC und CHO Zellen mit einem IC₅₀ von 4,1 µg/ml. Ebenso unterdrückt es den RANTES-vermittelten Calcium-Einstrom in transfizierte CCR5-positive CHO Zellen, hat jedoch nur einen geringen Einfluß auf die Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5. Unter physiologischen Flußbedingungen blockiert Chondroitinsulfat A außerdem die RANTES-vermittelte feste Haftung von Monozyten an Endothelzellen. Zusammenfassend scheint Chondroitinsulfat A aus Thrombozyten ein wichtiges Molekül für die Steuerung der Zellantwort auf Chemokine zu sein.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Ali S, Palmer AC, Banerjee B, Fritchley SJ, Kirby JA: *Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans*. J Biol Chem. 2000 Apr 21;275(16):11721-7.
- [2] Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA: *CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1*. Science. 1996 Jun 28;272(5270):1955-8.
- [3] Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Rousset D, Clark-Lewis I, Loetscher P, Moser B, Baggolini M: *HIV blocked by chemokine antagonist*. Nature. 1996 Oct 3;383 (6599):400.
- [4] Bacon KB, Premack BA, Gardner P, Schall TJ: *Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES*. Science. 1995 Sep 22;269(5231):1727-30.
- [5] Baggolini M, Dewald B, Moser B: *Human chemokines: an update*. Annu Rev Immunol. 1997;15:675-705.
- [6] Baggolini M, Moser B: *Blocking chemokine receptors*. J Exp Med. 1997 Oct 20;186(8):1189-91.
- [7] Bardwell JC, Lee JO, Jander G, Martin N, Belin D, Beckwith J: *A pathway for disulfide bond formation in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Feb 1;90(3):1038-42.
- [8] Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif*. Nature 1997 Feb 13; 385(6617): 640-4
- [9] Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH: *Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment*. Science. 1988 May 20;240(4855):1041-3.
- [10] Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M: *Single-chain antigen-binding proteins*. Science. 1988 Oct 21;242(4877):423-6.
- [11] Brown TA: *Gentechnologie für Einsteiger*. Spektrum Verlag 1996
- [12] Burns JM, Gallo RC, DeVico AL, Lewis GK: *A new monoclonal antibody, mAb 4A12, identifies a role for the glycosaminoglycan (GAG) binding domain of RANTES in the antiviral effect against HIV-1 and intracellular Ca²⁺ signaling*. J Exp Med. 1998 Nov 16;188(10):1917-27.
- [13] Burns JM, Lewis GK, DeVico AL: *Soluble complexes of regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted (RANTES) and glycosaminoglycans suppress HIV-1 infection but do not induce Ca(2+) signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 7;96(25):14499-504.

- [14] Calvo JC, Radicella JP, Charreau EH: *Measurement of specific radioactivities in labelled hormones by self-displacement analysis*. Biochem J. 1983 May 15;212(2):259-64.
- [15] Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC: *Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions*. Science. 1998 Jan 16;279(5349):381-4.
- [16] Campbell JJ, Butcher EC: *Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing*. Curr Opin Immunol. 2000 Jun;12(3):336-41.
- [17] Clark-Lewis I, Schumacher C, Baggolini M, Moser B: *Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities*. J Biol Chem. 1991 Dec 5;266(34):23128-34.
- [18] Clark-Lewis I, Moser B, Walz A, Baggolini M, Scott GJ, Aebersold R: *Chemical synthesis, purification, and characterization of two inflammatory proteins, neutrophil activating peptide 1 (interleukin-8) and neutrophil activating peptide*. Biochemistry. 1991 Mar 26;30(12):3128-35.
- [19] Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B, Baggolini M, Sykes BD: *Structure-activity relationships of chemokines*. J Leukoc Biol 1995 May; 57(5): 703-11
- [20] Clark-Lewis I: *Synthesis of chemokines*. Methods Mol Biol. 2000;138:47-63.
- [21] Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P: *Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells*. Science. 1995 Dec 15;270(5243):1811-5.
- [22] Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhardt M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR: *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. Nature. 1996 Jun 20;381(6584):661-6.
- [23] Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Madden PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA: *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. Nature. 1996 Jun 20;381(6584):667-73.
- [24] Edgerton MD, Gerlach LO, Boesen TP, Allet B: *Expression of chemokines in Escherichia coli*. Methods Mol Biol. 2000;138:33-40.
- [25] Estess P, Nandi A, Mohamadzadeh M, Siegelman MH: *Interleukin 15 induces endothelial hyaluronan expression in vitro and promotes activated T cell extravasation through a CD44-dependent pathway in vivo*. J Exp Med. 1999 Jul 5;190(1):9-19.
- [26] Fauci AS: *Resistance to HIV-1 infection: it's in the genes*. Nat Med. 1996 Sep;2(9):966-7.

- [27] Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA: *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science. 1996 May 10;272(5263):872-7.
- [28] Fitzgerald KA, O'Neill LA: *Characterization of CD44 induction by IL-1: a critical role for Egr-1*. J Immunol. 1999 Apr 15;162(8):4920-7.
- [29] Gong JH, Clark-Lewis I: *Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH₂-terminal residues*. J Exp Med 1995 Feb 1; 181(2): 631-40
- [30] Gong JH, Uguccioni M, Dewald B, Baggolini M, Clark-Lewis I: *RANTES and MCP-3 antagonists bind multiple chemokine receptors*. J Biol Chem. 1996 May 3;271(18): 10521-7.
- [31] Graham GJ, MacKenzie J, Lowe S, Tsang ML, Weatherbee JA, Issacson A, Medicherla J, Fang F, Wilkinson PC, Pragnell IB: *Aggregation of the chemokine MIP-1 alpha is a dynamic and reversible phenomenon. Biochemical and biological analyses*. J Biol Chem. 1994 Feb 18;269(7):4974-8.
- [32] Gryniewicz G, BeMiller JN: *Aromatic and heterocyclic 1-C-substituted derivatives of 1,5-anhydro-D-glucitol*. Carbohydr Res. 1984 Aug 15;131(2):273-6.
- [33] Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY: *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. J Biol Chem. 1985 Mar 25;260(6):3440-50.
- [34] Haegel-Kronenberger H, de la Salle H, Bohbot A, Oberling F, Cazenave JP, Hanau D: *Adhesive and/or signaling functions of CD44 isoforms in human dendritic cells*. J Immunol. 1998 Oct 15;161(8):3902-11.
- [35] Hahn H, Falke D, Klein P (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie*. 2.Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1994
- [36] Hebert CA, Vitangcol RV, Baker JB: *Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding*. J Biol Chem. 1991 Oct 5;266(28):18989-94.
- [37] Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE, Borlat F, Clark-Lewis I, Power CA, Wells TN: *Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines*. Biochemistry. 1997 Nov 4;36(44):13570-8.
- [38] Howard OM, Ben-Baruch A, Oppenheim JJ: *Chemokines: progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents*. Trends Biotechnol. 1996 Feb;14(2): 46-51.
- [39] Huber AR, Kunkel SL, Todd RF 3rd, Weiss SJ: *Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8*. Science. 1991 Oct 4;254(5028):99-102.
- [40] Hunter WM, Greenwood FC. Nature. 1962; 194, 495

- [41] Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Bruccoleri RE, Haber E, Crea R, et al: *Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Aug;85(16):5879-83.
- [42] Iozzo RV: *Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function*. Annu Rev Biochem. 1998;67:609-52.
- [43] Johnatty RN, Taub DD, Reeder SP, Turcovski-Corrales SM, Cottam DW, Stephenson TJ, Rees RC. *Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes*. J Immunol 1997 Mar 1; 158(5): 2327-33
- [44] Kameyoshi Y, Dorschner A, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM: *Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils*. J Exp Med. 1992 Aug 1;176(2):587-92.
- [45] Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al: *Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine*. Science 1994 Nov 25; 266(5189): 1395-9
- [46] Klinger MH, Wilhelm D, Bubel S, Sticherling M, Schroder JM, Kuhnel W. *Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 alpha within human platelets and their release during storage*. Int Arch Allergy Immunol 1995 Aug; 107(4): 541-6
- [47] Kolset SO, Gallagher JT: *Proteoglycans in haemopoietic cells*. Biochim Biophys Acta. 1990 Dec 11;1032(2-3):191-211.
- [48] Koopmann W, Krangel MS: *Identification of a glycosaminoglycan-binding site in chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha*. J Biol Chem. 1997 Apr 11;272 (15): 10103-9.
- [49] Krensky AM, Nelson PJ: *Expression of chemokine RANTES and production of monoclonal antibodies*. Methods Enzymol. 1997;287:162-74.
- [50] Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, Rucinski D, Viksman MY, Kaplan AP: *RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils*. J Immunol. 1992 Jul 15;149(2):636-42.
- [51] Kuschert GS, Coulin F, Power CA, Proudfoot AE, Hubbard RE, Hoogewerf AJ, Wells TN: *Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses*. Biochemistry. 1999 Sep 28;38(39):12959-68.
- [52] Laurence JS, LiWang AC, LiWang PJ: *Effect of N-terminal truncation and solution conditions on chemokine dimer stability: nuclear magnetic resonance structural analysis of macrophage inflammatory protein 1 beta mutants*. Biochemistry 1998 Jun 30; 37(26): 9346-54

- [53] Laurence JS, Blanpain C, De Leener A, Parmentier M, LiWang PJ: *Importance of basic residues and quaternary structure in the function of MIP-1 beta: CCR5 binding and cell surface sugar interactions*. Biochemistry. 2001 Apr 24;40(16):4990-9.
- [54] Leteux C, Chai W, Loveless RW, Yuen CT, Uhlin-Hansen L, Combarious Y, Jankovic M, Maric SC, Misulovin Z, Nussenzweig MC, Feizi T: *The cysteine-rich domain of the macrophage mannose receptor is a multispecific lectin that recognizes chondroitin sulfates A and B and sulfated oligosaccharides of blood group Lewis(a) and Lewis(x) types in addition to the sulfated N-glycans of lutropin*. J Exp Med. 2000 Apr 3;191(7):1117-26.
- [55] Locati M, Deuschle U, Massardi ML, Martinez FO, Sironi M, Sozzani S, Bartfai T, Mantovani A. *Analysis of the gene expression profile activated by the CC chemokine ligand 5/RANTES and by lipopolysaccharide in human monocytes*. J Immunol 2002 Apr 1; 168(7): 3557-62
- [56] Luster AD, Greenberg SM, Leder P: *The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation*. J Exp Med. 1995 Jul 1;182(1):219-31.
- [57] Mack M, Riethmuller G, Kufer P: *A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jul 18;92(15):7021-5.
- [58] Mack M, Luckow B, Nelson PJ, Cihak J, Simmons G, Clapham PR, Signoret N, Marsh M, Stangassinger M, Borlat F, Wells TN, Schlondorff D, Proudfoot AE: *Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity*. J Exp Med. 1998 Apr 20;187(8):1215-24.
- [59] Mack M, Pfirsinger J, Weber C, Weber KS, Nelson PJ, Rupp T, Maletz K, Bruhl H, Schlondorff D: *Chondroitin sulfate A released from platelets blocks RANTES presentation on cell surfaces and RANTES-dependent firm adhesion of leukocytes*. Eur J Immunol. 2002 Apr;32(4):1012-20.
- [60] Mbemba E, Slimani H, Atemezem A, Saffar L, Gattegno L: *Glycans are involved in RANTES binding to CCR5 positive as well as to CCR5 negative cells*. Biochim Biophys Acta. 2001 Feb 9;1510(1-2):354-66.
- [61] Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A: *Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells*. Cell. 1997 Oct 31;91(3):385-95.
- [62] Mohamadzadeh M, DeGrendele H, Arizpe H, Estess P, Siegelman M: *Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion*. J Clin Invest. 1998 Jan 1;101(1):97-108.
- [63] Murphy PM: *The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors*. Annu Rev Immunol. 1994;12:593-633.
- [64] Nandi A, Estess P, Siegelman MH: *Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44*. J Biol Chem. 2000 May 19;275(20):14939-48.

- [65] Okayama M, Oguri K, Fujiwara Y, Nakanishi H, Yonekura H, Kondo T, Ui N: *Purification and characterization of human platelet proteoglycan*. Biochem J. 1986 Jan 1; 233(1):73-81.
- [66] Oravecz T, Pall M, Norcross MA: *Beta-chemokine inhibition of monocyte-tro-pic HIV-1 infection. Interference with a postbinding fusion step*. J Immunol. 1996 Aug 15; 157(4):1329-32.
- [67] Oravecz T, Pall M, Wang J, Roderiquez G, Ditto M, Norcross MA: *Regulation of anti-HIV-1 activity of RANTES by heparan sulfate proteoglycans*. J Immunol. 1997 Nov 1; 159(9):4587-92.
- [68] Pakianathan DR, Kuta EG, Artis DR, Skelton NJ, Hebert CA: *Distinct but overlapping epitopes for the interaction of a CC-chemokine with CCR1, CCR3 and CCR5*. Biochemistry. 1997 Aug 12;36(32):9642-8.
- [69] Parker CW: *Radiolabeling of proteins*. Methods Enzymol. 1990;182:721-37.
- [70] Pluckthun A, Skerra A: *Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in Escherichia coli*. Methods Enzymol. 1989;178:497-515.
- [71] Proudfoot AE, Power CA, Hoogewerf AJ, Montjovent MO, Borlat F, Offord RE, Wells TN: *Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist*. J Biol Chem. 1996 Feb 2;271(5):2599-603.
- [72] Proudfoot AE, Fritchley S, Borlat F, Shaw JP, Vilbois F, Zwahlen C, Trkola A, Marchant D, Clapham PR, Wells TN: *The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity*. J Biol Chem. 2001 Apr 6;276(14): 10620-6.
- [73] Van Riper G, Siciliano S, Fischer PA, Meurer R, Springer MS, Rosen H: *Characterization and species distribution of high affinity GTP-coupled receptors for human rantes and monocyte chemoattractant protein 1*. J Exp Med. 1993 Mar 1;177(3): 851-6.
- [74] Robinson SC, Scott KA, Balkwill FR. *Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha*. Eur J Immunol 2002 Feb; 32(2): 404-12
- [75] Rybak ME, Gimbrone MA Jr, Davies PF, Handin RI: *Interaction of platelet factor four with cultured vascular endothelial cells*. Blood. 1989 May 1;73(6):1534-9.
- [76] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A 1977 Dec; 74(12): 5463-7
- [77] Schall T: *Fractalkine--a strange attractor in the chemokine landscape*. Immunol Today 1997 Apr; 18(4): 147

- [78] Seet BT, Barrett J, Robichaud J, Shilton B, Singh R, McFadden G: *Glycosaminoglycan binding properties of the myxoma virus CC-chemokine inhibitor, M-T1*. J Biol Chem. 2001 Aug 10;276(32):30504-13.
- [79] Simmons G, Wilkinson D, Reeves JD, Dittmar MT, Beddows S, Weber J, Carnegie G, Desselberger U, Gray PW, Weiss RA, Clapham PR: *Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry*. J Virol. 1996 Dec;70(12):8355-60.
- [80] Simmons G, Clapham PR, Picard L, Offord RE, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Buser R, Wells TN, Proudfoot AE: *Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist*. Science. 1997 Apr 11;276 (5310):276-9.
- [81] Skelton NJ, Aspiras F, Ogez J, Schall TJ: *Proton NMR assignments and solution conformation of RANTES, a chemokine of the C-C type*. Biochemistry 1995 Apr 25; 34(16): 5329-42
- [82] Sleeman JP, Kondo K, Moll J, Ponta H, Herrlich P: *Variant exons v6 and v7 together expand the repertoire of glycosaminoglycans bound by CD44*. J Biol Chem. 1997 Dec 12; 272(50):31837-44.
- [83] Strieter RM, Standiford TJ, Huffnagle GB, Colletti LM, Lukacs NW, Kunkel SL: *"The good, the bad, and the ugly." The role of chemokines in models of human disease*. J Immunol. 1996 May 15;156(10):3583-6.
- [84] Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S: *T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta*. Nature. 1993 Jan 7; 361(6407): 79-82.
- [85] Tanaka Y, Fujii K, Hubscher S, Aso M, Takazawa A, Saito K, Ota T, Eto S: *Heparan sulfate proteoglycan on endothelium efficiently induces integrin-mediated T cell adhesion by immobilizing chemokines in patients with rheumatoid synovitis*. Arthritis Rheum. 1998 Aug;41(8):1365-77.
- [86] von Tscharner V, Deranleau DA, Baggolini M: *Calcium fluxes and calcium buffering in human neutrophils*. J Biol Chem. 1986 Aug 5;261(22):10163-8.
- [87] von Tscharner V, Prod'hom B, Baggolini M, Reuter H: *Ion channels in human neutrophils activated by a rise in free cytosolic calcium concentration*. Nature. 1986 Nov 27-Dec 3;324(6095):369-72.
- [88] Tsien RY: *New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures*. Biochemistry. 1980 May 27;19(11):2396-404
- [89] Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggolini M: *Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes*. Eur J Immunol. 1995 Jan;25(1):64-8.

- [90] Wagner L, Yang OO, Garcia-Zepeda EA, Ge Y, Kalams SA, Walker BD, Pasternack MS, Luster AD: *Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans*. Nature. 1998 Feb 26;391(6670):908-11.
- [91] Wang JM, McVicar DW, Oppenheim JJ, Kelvin DJ: *Identification of RANTES receptors on human monocytic cells: competition for binding and desensitization by homologous chemotactic cytokines*. J Exp Med. 1993 Mar 1;177(3):699-705.
- [92] Webb LM, Ehrengruber MU, Clark-Lewis I, Baggolini M, Rot A: *Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Aug 1;90(15):7158-62.
- [93] Weber C, Weber KS, Klier C, Gu S, Wank R, Horuk R, Nelson PJ: *Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells*. Blood. 2001 Feb 15;97(4):1144-6.
- [94] Wells TN, Power CA, Lusti-Narasimhan M, Hoogewerf AJ, Cooke RM, Chung CW, Peitsch MC, Proudfoot AE: *Selectivity and antagonism of chemokine receptors*. J Leukoc Biol 1996 Jan; 59(1): 53-60
- [95] Xia M, Leppert D, Hauser SL, Sreedharan SP, Nelson PJ, Krensky AM, Goetzl EJ. *Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane*. J Immunol 1996 Jan 1; 156(1): 160-7
- [96] Yamagata T, Saito H, Habuchi O, Suzuki S: *Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases*. J Biol Chem. 1968 Apr 10;243(7):1523-35.
- [97] Zhang L, Huang Y, He T, Cao Y, Ho DD: *HIV-1 subtype and second-receptor use*. Nature. 1996 Oct 31;383(6603):768.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Prof. Schlöndorff für seine unablässige Förderung: Die regelmässigen Diskussionen über den Fortschritt der Arbeit erbrachten viele wertvolle Anregungen, ein hervorragendes Gutachten unterstützte meinen Antrag für ein Postgraduiertenstipendium, die Auslandsaufenthalte während des Studiums wurden durch seine Kontakte vermittelt. So stand meine ganze Ausbildung vom Physikum bis zum Ende der AiP-Zeit unter einem sehr forschungsfreundlichen Stern.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Matthias Mack, in dem ich neben einem Betreuer auch einen Freund gefunden habe. Seine spielerische Art bei der Bearbeitung seiner schier unerschöpflichen Ideen wird mir immer ein Vorbild bleiben.

Weiterhin danke ich:

Herrn Dr. Bruno Luckow für seinen Kampf gegen die Aanrchie und für die Schaffung bester Arbeitsbedingungen im Labor. Für meine vielen Fragen hatte er jederzeit ein offenes Ohr und eine fundierte Antwort bereit.

Herrn Prof. Horster, der nach meinem Physikum den Kontakt zu Prof. Schlöndorff hergestellt hat. In Zusammenarbeit mit Gregor Dittrich und Dr. Johannes Tschöpp aus Prof. Horsters Labor fand ein großer Teil der Messungen des Calcium-Einstroms statt.

Herrn PD Dr. Peter Nelson, in dessen Gruppe die Arbeit begann. Diese erste Zeit in seinem Labor hat mir durch die maximal mögliche Dichte an Menschen und Gedankenarbeit einen sehr schnellen und fruchtbaren Einstieg in die molekularbiologische Arbeit ermöglicht.

Frau Dr. Katrin Wagner für die besondere Freundschaft, die während der engen Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Mack entstanden ist.

allen weiteren Mitarbeitern der Klinischen Biochemie der Medizinischen Poliklinik für die kollegiale Atmosphäre.

Großer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer in jeder Hinsicht voll unterstützt haben, ohne die Geduld zu verlieren.

Diese Arbeit wurde von der Ludwig-Maximilians-Universität München mit einem Stipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses unterstützt, was den zeitlichen Umfang der Arbeit erst ermöglicht hat.

LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Jochen Pfärlinger
Geburtsdatum: 9. Juni 1968 in München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Bruderhofstraße 35
81371 München
Tel.: 089 7239188
email: jpfirstinger@hotmail.com

AUSBILDUNG

Sept. 1978 – Juni 1987 Besuch des Max-Planck-Gymnasiums in München-Pasing
Nov. 1987 – Dez. 1994 Physikstudium an der Technischen Universität München
Nov. 1994 – April 2001 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität
in München

EXAMINA

Juli 1987 Abitur (Note 1,1)
Febr. 1995 Physikdiplom (Note 1.9)
April 2001 Ärztliche Prüfung (Gesamtnote 2,33)
Juni 2003 Promotion

AUSLANDSAUFGENHALTE

März/April 1999 Famulatur in „infectious diseases“ am Mount-Sinai Medical Center, New York
April – August 2000 PJ-Tertial in Chirurgie am Hadassah Medical Center in Jerusalem im Rahmen des Austauschprogrammes der LMU mit der Hadassah Medical School

WISSENSCHAFTLICHE UND BERUFLICHE TÄTIGKEITEN

Dez. 1993 – Dez. 1994	Diplomarbeit in Experimentalphysik am IPP/Max-Planck-Institut für Plasmaphysik <i>Aufbau und Test eines schnellen Mikrostreifen-Gasdetektors für den Einsatz an einem hochauflösenden Röntgen Kristall-Spektrometer</i>
Mai 1995 – Febr. 1998	Wissenschaftliche Hilfskraft (reine Lehrtätigkeit) für die Betreuung des Physikpraktikums für Medizinstudenten an der Ludwig-Maximilians-Universität
Nov. 1996 – Mai 2000	Doktorarbeit am Institut für klinische Biochemie der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität <i>Modifiziertes rekombinantes humanes RANTES als Antagonist am Chemokinrezeptor CCR5</i>
Juni 1998 – Mai 2000	Postgraduierten-Stipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses für die Promotion
Juli 2001 – Dez. 2002	Arzt im Praktikum an der Medizinischen Poliklinik
seit April 2003	Assistanzarzt in der Abteilung für Hämatologie/Onkologie an der Uniklinik Regensburg

WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

Pfirsinger J., and Mack M., *Expression of Chemokines in the Periplasmic Space of E.coli*, Methods in Molecular Biology **138** (2000), 41-46

Mack M, Cihak J, Simonis C, Luckow B, Proudfoot AE, Plachy J, Bruhl H, Frink M, Anders HJ, Vielhauer V, Pfirsinger J, Stangassinger M, Schlondorff D., *Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice.* J Immunol. **166**(7) (2001), 4697-704.

Banas B, Wornle M, Berger T, Nelson PJ, Cohen CD, Kretzler M, Pfirsinger J, Mack M, Lipp M, Grone HJ, Schlondorff D., *Roles of SLC/CCL21 and CCR7 in human kidney for mesangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis.* J Immunol. **168**(9) (2002), 4301-7.

Mack M, Pfirsinger J, Weber C, Weber KS, Nelson PJ, Rupp T, Maletz K, Bruhl H, Schlondorff D., *Chondroitin sulfate A released from platelets blocks RANTES presentation on cell surfaces and RANTES-dependent firm adhesion of leukocytes.* Eur J Immunol. **32**(4) (2002), 1012-20.