



**Analyse der Interaktion der zellulären Proteine HLA-Cw4  
und TREM-1 mit dem HIV-1 Transmembranprotein gp41**

Bachelorarbeit

Von Michaela Schwager

Robert-Koch-Institut  
-Arbeitsgruppe P13-  
Retrovirus-induzierte Immunsuppression

- Berlin, September 2008 –

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig angefertigt sowie Literatur und Hilfsmittel angegeben zu haben.

Gutachter: Dr. Joachim Denner

Prof. Dr. rer. nat. Annett Fuchs

Für meine Familie

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	I
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	I
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	II
<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Entwicklung von HIV und AIDS</b> .....	1
1.1.1 Pathogenese einer HIV-Infektion.....	2
1.1.2 HIV - ein Retrovirus.....	3
1.1.3 Genomstruktur des HIV-1.....	4
1.1.4 Morphologie des HI-Virus.....	5
1.1.5 Replikationszyklus.....	6
1.1.6 Membranglykoproteine.....	7
1.1.6.1 Das transmembrane Hüllprotein gp41.....	8
1.1.6.2 Membranfusion.....	9
<b>1.2 Antiretrovirale Therapie und Impfstoffentwicklung</b> .....	10
<b>1.3 Retroviren induzierte Immunsuppression</b> .....	11
<b>1.4 Gp-41 Interaktionspartner</b> .....	12
<b>1.5 Haupthistokompatibilitätskomplex</b> .....	13
1.5.1 Genomstruktur und Aufbau von MHC-Klasse-I-Molekülen.....	13
1.5.2 Funktion von MHC-Klasse-I-Molekülen im Immunsystem.....	15
1.5.3 HLA-C.....	15
<b>1.6 TREM (triggering receptor expressed on myeloid cells)</b> .....	16
TREM-1.....	17
<b>2. Zielstellung</b> .....	18
<b>3. Materialien</b> .....	19
3.1 Chemikalien.....	19
3.2 Geräte.....	20
3.3 Verbrauchsmaterial.....	21
3.4 Antibiotika.....	21
3.5 Kommerzielle Kits.....	21
3.6 Enzyme.....	22
3.7 Stammlösungen.....	22
3.8 Primer.....	23
3.9 Peptide.....	23
3.10 Antikörper.....	23
3.11 Vektoren.....	24
3.12 Zellen.....	24
3.13 Nährmedien.....	24
<b>4. Methoden</b> .....	25
<b>4.1 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien und eukaryotischen Zellen</b> .....	25
4.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien.....	25
4.1.2 Wachstumsmessung.....	25
4.1.3 Transformation von Bakterien.....	26
<b>4.2 Kultivierung und Stammhaltung von eukaryotischen Zellen</b> .....	27
4.2.1 Das Auftauen der gefrorenen Zellen.....	27
4.2.2 Passagieren von Zellen.....	27
4.2.3 Einfrieren und Lagerung von Zellen.....	27
4.2.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	28
<b>4.3 Arbeiten mit DNA</b> .....	28

4.3.1 Plasmid-Mini-Präparation.....	28
4.3.2 PCR.....	29
4.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung .....	30
4.3.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA .....	30
4.3.5 Gelextraktion.....	31
4.3.6 Restriktion.....	31
4.3.7 Ligation .....	32
4.3.8 Sequenzierung von DNA.....	32
<b>4.4 Arbeiten mit Proteinen .....</b>	<b>33</b>
4.4.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
4.5.2 Coomassie-Färbung .....	34
4.5.3 Western Blotting.....	35
4.5.4 DAB-Färbung.....	36
4.5.5 Immunpräzipitation.....	36
4.5.6 GST- <i>pull down</i> - Interaktionsanalyse.....	37
4.5.7 <i>pull down</i> mit <i>Dynabeads</i> .....	39
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1 Potentielle Interaktionspartner von gp41 .....</b>	<b>40</b>
Deletionsmutanten für gp41 für die Analyse .....	41
<b>5.2 Analyse der Interaktion von HLA-Cw4 und gp41-Deletionsmutanten mittels GST-<i>pull down</i>-Analysen .....</b>	<b>42</b>
Etablierung der GST- <i>pull down</i> Methode für HLA-Cw4.....	42
GST- <i>pull down</i> zur Bestätigung der Interaktion von gp41 und HLA-Cw4.....	44
<b>5.3 Versuche zur Hemmung der Interaktion von gp41 mit HLA-Cw4 durch Peptid #23 .....</b>	<b>45</b>
<b>5.4. Analyse der Interaktion von TREM-1 und gp41-Deletions-mutanten mittels GST-<i>pull down</i>-Analysen und Koimmunpräzipitation.....</b>	<b>48</b>
GST- <i>pull down</i> Analyse mit Glutathion Sepharose <i>beads</i> 4B .....	49
<i>pull down</i> -Analyse mit <i>Dynabeads</i> ® Strepavidin M-280.....	50
Koimmunpräzipitation mit <i>Dynabeads</i> ® ProteinG.....	51
<b>5.5 Klonierungsversuche von HLA-Cw4-Verkürzungsmutanten .....</b>	<b>53</b>
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>55</b>
6.1 HLA-Cw4 als potentieller Interaktionspartner für die gp41-Ektodomäne .....	55
6.2 TREM-1 als potentieller Interaktionspartner für die gp41-Ektodomäne .....	60
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>63</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>64</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>66</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>77</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1:	Schematische Darstellung des 9,7 kb großen Provirus-Genoms von HIV-1	4
Abb.1.2:	Schematischer Aufbau eines HIV-Virions	5
Abb.1.3:	Replikationszyklus von HIV	6
Abb.1.4:	Schematischer Aufbau des transmembranen Hüllproteins gp41	8
Abb.1.5:	Schematische Darstellung der Konformationsänderung des HIV-1 Hüllproteins gp41 während der Fusion	9
Abb.1.6:	Schematischer Aufbau eines HLA-Klasse-I-Moleküls	14
Abb.5.1:	Schematische Darstellung der klonierten Verkürzungsmutanten der gp41 Ektodomäne	41
Abb.5.2:	Sequenzvergleich des isolierten Klons 231 mit der Volllänge-sequenz der Ektodomäne von HLA-Cw4	42
Abb.5.3:	Western Blot Ergebnisse der GST- <i>pull down</i> -Analyse	42
Abb.5.4 A, B:	Puffertest für GST- <i>pull down</i> mit HLA-Cw4	43
Abb.5.5:	Übersicht der in induzierten gp41-Fusionsproteine zur Aufnahme in NETN20-Puffer in einem 12%igem SDS-Gel	43
Abb.5.6:	Western-Blot Ergebnisse (A) sowie PVDF-Membran der GST- <i>pull down</i> -Analyse nach Proteinfärbung (B)	44
Abb.5.7:	Western-Blot Ergebnisse (A) sowie PVDF-Membran der GST- <i>pull down</i> Analyse nach Proteinfärbung (B)	45
Abb.5.8	Aminosäuresequenz der gp41-Ektodomäne	45
Abb.5.9:	Western-Blot Ergebnisse des Hemmversuches mit Peptid #23 (Expositionszeit 1 min)	46
Abb.5.10:	Western-Blot Ergebnisse des Hemmversuches mit Peptid #23 (GST-rgp4K)	47
Abb.5.11:	Sequenzvergleich von TREM-1, rsTREM-1 und TREM-1 Klon 95	48
Abb.5.12:	GST- <i>pull down</i> zur Analyse der Interaktion von rsTREM-1 mit gp41-Deletionsmutanten	49
Abb.5.13:	GST- <i>pull down</i> -Versuch zur Analyse der Interaktion von rsTREM-1 mit gp41-Deletionsmutanten, mit 5% Magermilchpulver abgesättigt	49
Abb.5.14:	Puffertest für GST- <i>pull down</i> -Analysen mit rsTREM-1	50
Abb.5.15:	<i>pull down</i> -Analyse von rsTREM-1 mit Dynabeads® Strepavidin M-280	50
Abb.5.16:	Immunpräzipitation zur Interaktion von rs-TREM-1 mit gp41-Deletionsmutanten	51
Abb.5.17:	Immunpräzipitation zur Analyse der Interaktion von rs-TREM-1 mit gp41-Deletionsmutanten	52
Abb.5.18:	Immunpräzipitation (rs-TREM-1 mit gp41-Deletionsmutanten)	52
Abb.5.19:	Schematische Darstellung des HLA-Cw4 Volllänge-proteins sowie davon abgeleitete Verkürzungsmutanten	53
Abb.5.20:	Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der HLA-Cw4-Konstrukte	54
Abb.6.1:	Natürliche Killerzell-Aktivierung unter Kontrolle von inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren	56
Abb.6.1:	Schematische Darstellung des Bindungsbereichs des HLA-Cw4-Bereichs mit gp41 am Beispiel des löslichen Teils von HLA Klasse I Molekülen	57
Abb.6.3:	Vorläuferpeptid von GP1 und GP2 des Ebola-Viruses	62

## Tabellenverzeichnis

Tab.4.1:	Temperatur und Zeitprofil der PCR	29
Tab.4.2:	Temperatur- und Zeitprofil der Sequenzierungsreaktion	32
Tab.4.3:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel	33
Tab.4.5:	Eingesetzte Fusionspuffer, zur Optimierung der GST- <i>pull downs</i>	38
Tab.5.1:	Induktionsbedingungen und Fragmentgrößen der GST-Deletionsmutanten	41
Tab.5.2:	Ansätze für GST- <i>pull down</i> von rgp-4K mit HLA-Cw4	47
Tab.5.3:	Primerzusammensetzung für PCR der HLA-Cw4-Verkürzungsmutanten	53

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CART	<i>Combined Anti-Retroviral Therapy</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>center for disease control and prevention</i>
CHR	C-heptead Region
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
env	<i>Envelope</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
g	Erdbeschleunigung, Gramm
gag	<i>group antigen</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GST	Gluthathion-Sepharose-Transferase(
FACS	fluorescence activated cell sorting
FIV	Felines Immundefizienz Virus
FKS	Fötale Kälberserum
h	Stunde
HAART	<i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HTLV	humanes T-Zell-Leukämie-Virus
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISU	immunsuppressiv
KAR	Killerzellaktivierende Rezeptoren
kDa	Kilodalton
KIR	Killerzellinhibierende Rezeptoren
LAV	Lymphadenopathie-assoziiertes Virus
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	<i>long terminal repeats“</i>
μ	Mikro
min	Minute(n)
Mio.	Million
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMP-1	Matrix Metalloprotease 1
MPER	Membranproximale Region
MSD	<i>membrane spanning domain</i>
MuLV	Murines Leukämie-Virus
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NHR	N-heptead Region
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame

---

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PERV	Porcines endogenes Retrovirus
pol	<i>polymerase</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
nef	<i>negative factor</i>
rev	<i>regulator of expression of virion protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations / rounds per minute</i>
RPMI	<i>Rosswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	<i>Transporter associated with Antigen Processing</i>
tat	<i>transactivator of transcription</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranes Hüllprotein
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TREM-1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
vif	<i>viral infectivity factor</i>
vpr	<i>viral protein rapid</i>
Vpu	<i>viral protein out</i>
v/v	Volumenanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
w/v	Gewichtsanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
z.B.	zum Beispiel

### Einbuchstabencodes für Aminosäuren

A	Alanin
B	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
X	Beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin
Z	Glutamin oder Glutaminsäure



## 1. Einleitung

Das *Acquired Immune Deficiency Syndrom* (AIDS) ist die vierthäufigste Todesursache weltweit. 2007 belief sich die Zahl der Neuinfektionen nach dem Aidsprogramm UNAIDS der Vereinten Nationen in Genf trotz verstärkter Aufklärung und Vorbeugung global auf 2,5 Mio. Menschen, was Ende 2007 eine HIV-Infizierten-Zahl von schätzungsweise 33,2 Millionen ausmachte. 67,7% der Gesamtinfizierten stammen aus Gebieten südlich der Sahara, wobei sich in diesem Gebiet mehr als zwei Drittel aller Neuinfektionen ereigneten, was auf den geringen Wissenstand und die ungenügende Aufklärung über das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) bzw. AIDS in den Drittländern zurückzuführen ist. Laut des epidemiologischen Bulletin 47/2007 des Robert-Koch-Instituts wurden Ende 2007 in Deutschland insgesamt 2.752 neu diagnostizierte HIV-Infektionen registriert sowie rund 1100 neue AIDS-Erkrankungen und circa 650 Todesfälle bei HIV-Infizierten verzeichnet.

Diese Zahlen verdeutlichen, wie wichtig es ist einen präventiven Impfstoff gegen HIV sowie weitere Therapiemöglichkeiten von AIDS zu entwickeln, um die HIV-Pandemie eindämmen. Daher ist es unumgänglich, die Pathogenese der HIV-Infektion aufzuklären, die durch eine HIV ausgelöste Immunsuppression und den Verlust an CD4-positiven T-Helferzellen im Krankheitsverlauf charakterisiert ist. In der Arbeitsgruppe P13 des Robert-Kochinstituts Berlin steht besonders die Entwicklung eines Impfstoffes auf der Basis breit neutralisierender Antikörper und die Funktion des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1 bei der Infektion und Pathogenese im Vordergrund.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die potentiellen gp41-Interaktionspartner HLA-C, sowie TREM-1, die in einem *yeast two hybrid-screen* detektiert werden konnten, auf ihre Interaktion mit dem transmembranen Hüllprotein gp41 mittels *GST-pull down* Analysen getestet, um so möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion von gp41 bei immunsuppressiven Prozessen ziehen zu können.

### 1.1 Entwicklung von HIV und AIDS

1981 wurden erstmals in den USA AIDS-typische Symptome wie *Pneumocystis carinii*-Infektionen, die nahezu ausschließlich bei immunsupprimierten Menschen auftreten, und folgend schwere Lungenentzündungen bei einer Gruppe männlicher Patienten beobachtet. Nach weiteren Berichten von Patienten der gleichen Klinik sowie Meldungen aus anderen amerikanischen Städten von Patienten mit opportunistischen Erkrankungen, wurden die auftretenden Symptome 1982 als eigenständiges Krankheitsbild AIDS zusammengefasst, wobei dieses als eine Kombination von verschiedenen, opportunistischen Markerinfektionen mit überwiegend tödlich Ausgang deklariert wurde (Marx 1982; CDC 1981). Nach intensiven Forschungen konnte im selben Jahr das AIDS-auslösende Virus von einer französischen Arbeitsgruppe um Luc Montagnier im Institut Pasteur in Paris isoliert und beschrieben werden (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Folgend wurde die Entdeckung von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Gallo *et al.*, 1983; Popovic *et al.*, 1984), wobei das Virus anfänglich als Lymphadenopathie-assoziiertes Virus (LAV) (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983), später als humanes T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV-III) bezeichnet wurde (Gallo *et al.*, 1984) und 1986 einheitlich vom *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) die Bezeichnung HIV-1 erhielt. 1986 konnte eine zweite HI-Virus-Form aus Blutlymphozyten eines afrikanischen AIDS-Patienten isoliert werden, welche die Bezeichnung HIV-2 bekam (Clavel *et al.*, 1986).

Der Ursprung des HI-Virus wird auf den in verschiedenen Affenarten vorkommenden Affen-Immundefizienzvirus SIVcpz (*simian immunodeficiency virus*) zurückgeführt, welcher aus einer Rekombination von mindestens 2 älteren SIV-Stämmen entstanden war. Durch die Untersuchung der genetischen Verwandtschaft von HIV zu SIV konnte man bestimmen, dass mehrere unabhängige Übertragungen von Affen-Immundefizienzviren aus ihren natürlichen Wirten auf den Menschen stattgefunden hatten, was sich in den so entstandenen Typen M (*major*), der wiederum die Subtypen A-H umfasst, O (*outlier*), und N (*new*) von HIV-1 (Gutler *et al.*, 1994, Simon *et al.*, 1998) und den Subtypen A-E von HIV-2 (Gao *et al.*, 1994) widerspiegelt. Dabei wurde weiterhin herausgefunden, dass HIV-1 von dem in Rotkopfmangaben vorherrschenden SIV-Typ SIVrcm und HIV-2 von dem in Rauchgrauen Mangaben vorkommenden SIV-Typ SIVsm abstammt (Silvestri, 2005), wobei die HIV-Formen höhere Homologien mit ihren ursprünglichen SIV-Formen aufweisen. Beide HIV-Formen zeigen untereinander nur eine 55%ige Homologie in ihrer RNA-Sequenz auf (Guyader *et al.*, 1987). Weiterhin ist HIV-2, welches besonders in Zentral- und Westafrika lokalisiert ist (Kanki *et al.*, 1987; De Cock *et al.*, 1993), deutlich weniger virulent und schlechter übertragbar als das weltweit verbreitete HIV-1 (Markowitz *et al.*, 1993).

### 1.1.1 Pathogenese einer HIV-Infektion

Die Übertragung von HIV erfolgt über Sexualverkehr, infiziertes Blut bzw. Blutprodukte, infizierte Injektionsnadeln und Instrumente sowie Mutter-zu-Kind-Übertragung. Das *center for disease control and prevention* (CDC) legt drei Kategorien A bis C fest, welche nach Symptomen eingeteilt sind. Kategorie A definiert das asymptomatische Stadium der HIV-Infektion, Kategorie C Patienten mit AIDS und Kategorie B alle anderen Patienten, die nicht asymptomatisch sind aber sich noch nicht im AIDS-Stadium befinden. Weiterhin nimmt das CDC eine Einteilung anhand der Laborwerte der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten/ $\mu$ l Blut vor (CD = *cluster of differentiation*), in der die Kategorie 1  $\geq 500$  CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten/ $\mu$ l, Kategorie 2 200–499 CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten/ $\mu$ l und Kategorie 3  $< 200$  CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten/ $\mu$ l umfasst (CDC, 1993b). Der Krankheitsverlauf allgemein verläuft in 3 Stadien von der primären HIV-Infektion über die Latenzphase bis hin zum AIDS-Stadium. Die primäre HIV-Infektion (PHI) wird in der Mehrzahl der Fälle nicht diagnostiziert, da in dieser Phase oft nur grippeähnliche Symptome zu beobachten und noch keine HIV-1-spezifischen Antikörper nachweisbar sind. Im Zeitraum von ein bis zwei Wochen nach der Infektion kommt es zu einer hohen Virusvermehrung, bei der mehr als 100 Millionen Kopien HIV-1-RNA/ml Blut auftreten können. Diese Phase wird deshalb als Virämie bezeichnet. Dabei sind besonders unspezifische Symptome wie Fieber, allgemeine Abgeschlagenheit oder Lymphknotenschwellungen bzw. Lymphknotenadenopathie gehäuft zu beobachten (Kahn und Walker, 1998), welche mit einer Abnahme der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl einher geht. Zeitlich verzögert setzt nach 2 bis 4 Wochen die primäre Immunantwort ein, bei der es zu einem Anstieg der CD8<sup>+</sup>-Zellen im Organismus kommt. Durch Serokonversion werden bindende Antikörper gebildet, welche die hohe Viruslast im Körper bis unter die Virusnachweisgrenze zurückdrängen, jedoch die Viren nicht ganz aus dem Körper eliminieren, da durch die hohe Mutationsrate des Virus die Antikörper zum Ende des ersten Stadium kaum noch neutralisierend wirken. Parallel hierzu kommt es nach einiger Zeit zu einem Wiederanstieg der CD4<sup>+</sup>-, die aber ohne antiretrovirale Therapie nicht wieder ihre Ausgangswerte erreicht.

Die darauf folgende Latenzphase, welche Monate bis Jahre andauern kann, zeichnet sich vor allem durch ihren relativ symptomfreien Verlauf aus, wobei sich aber das Gleichgewicht zwischen Virusneubildung

und CD-Zellzahl mit der Zeit zugunsten des Virus verschiebt. Es ist weiterhin bekannt, dass während dieser Phase das Virus eine Konformationsänderung im Membranprotein gp120 durchmacht. Dabei kommt es zur Ausbildung des virulenteren und schneller replizierenden X4-Stammes, der den Korezeptor CXCR4 nutzt, wohingegen in der primären Phase vorrangig der weniger infektiöser R5-trope Stamm vorherrscht, welcher den Korezeptor CCR5 erkennt. Dadurch kann es in der späten Latenzphase zu Ausbildungen von Krankheiten der Kategorie B wie Diarrhoe, Herpes Zoster oder periphere Neuropathien kommen.

Bei Erreichen einer  $CD4^+$ -Lymphozyten-Konzentration unter 200 Zellen/ $\mu$ l, kann das Immunsystem kaum noch aufrecht erhalten und das Endstadium AIDS kommt zum Ausbruch, bei dem eigentlich harmlose Krankheitserreger nicht mehr abgewehrt werden können. Dadurch werden spezielle AIDS-definierende Erkrankungen ausgelöst, wobei neben einer Vielzahl von Infektionskrankheiten wie Pilzbefall, HIV-Enzephalopathie, *Pneumocystis-Carinii*-Pneumonie, *Herpes simplex*-Infektionen, CMV-Infektionen und Tuberkulose, sich auch verschiedene AIDS-spezifische Krebsformen wie das Zervixkarzinom, sowie das Kaposi-Sarkom ausbilden. Diese Kombination von opportunistischen Erkrankungen führt in den meisten Fällen nach 1,5 bis 3 Jahren zum Tod.

### 1.1.2 HIV - ein Retrovirus

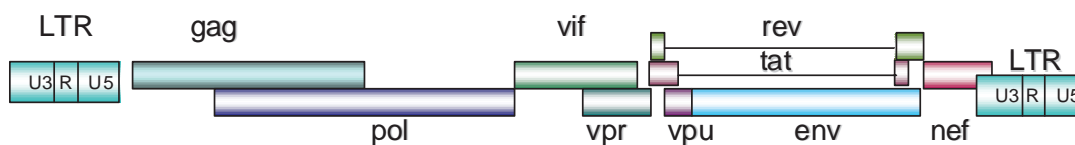
HIV gehört neben FIV (Felines Immundefizienz-Virus), SIV und PERV (porzines endogenes Retrovirus) zur Familie der *Retroviridae*. Diese unterscheiden sich von anderen Viren dadurch, dass sie befähigt sind, ihre virale Einzelstrang-RNA in einen DNA-Doppelstrang umzuschreiben und diesen in das Genom der Wirtszelle zu integrieren. Dieser Schritt wird von dem Enzym Reverse Transkriptase katalysiert, welches 1970 unabhängig voneinander von den Wissenschaftlern Howard Temin und David Baltimore beschrieben wurde (Baltimore 1970, Temin *et al.*, 1970). Retrovirale Krankheiten waren schon im 19. Jahrhundert bekannt, jedoch erstmals von Wilhelm Ellermann und Oluf Bang 1908 in Zusammenhang mit Hühnerleukämie näher beschrieben. 1911 zeigte dann Peyton Rous, dass durch ein Ultrafiltrat eines Hühnersarkoms bei gesunden Hühnern ein Tumorwachstum hervorrufen werden konnte.

Eine Einteilung von Retroviren wurde durch das ICTV vorgenommen, bei der sie sich auf morphologische, sowie genetische Unterschiede bezogen. Dabei wurden die Retroviren in die Unterfamilien der Orthoretroviren mit den 5 Genera  $\alpha$ -(Rous-Sarkom-Virus),  $\beta$ -(Maus-Mammatumovirus),  $\gamma$ -(Felines Leukämie-Virus, PERV),  $\delta$ - (Humane T-Zell-Leukämie-Virus) und  $\epsilon$ -Retroviren (Zander-Hautsarkom-Virus) den Lentiviren, zu denen HIV-1, HIV-2 und FIV gehören, und den Spumaretroviren (Foamyvirus) untergliedert (Van Regenmortel *et al.*, 1998). Zusätzlich können Retroviren als exogen oder endogen eingestuft werden, wobei exogene Retroviren (ERV), im Genom somatischer Zelle verankert sind und endogene Retroviren (XRV) im Genom von Keimbahnzellen, sowie somatischer Zellen vorkommen.

### 1.1.3 Genomstruktur des HIV-1

HIV gehört zu den exogenen Retroviren und kann somit sein Genom in allen Zellen des menschlichen Körpers, die HIV-spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche beinhalten, integrieren. Die Organisation des ca. 9,7kb langen in zweifacher Ausführung vorliegenden RNA-Genoms ist dem von anderen Retroviren sehr ähnlich. Die RNA wird am 3'-Ende polyadenyliert und enthält am 5'-Ende eine charakteristische „Cap-Struktur“. Durch Umschreibung der einzelsträngigen RNA, sowie Integration des produzierten DNA-Strangs entsteht die provirale DNA (Abb.1.1), die aus 9 verschiedenen Leserahmen besteht. Im Wirtszellen-Genom wird die kodierende provirale DNA-Region von Wiederholungssequenzen, sogenannten LTR (*long terminal repeats*) flankiert, welche aus den U3- (*unique*), R- (*redundant*) und U5-Regionen bestehen und für die Initiation und die Termination der Transkription verantwortlich sind.

Neben den in jedem Retrovirusgenom vorhandenen Genabschnitten *gag* (*group spezific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*), beinhaltet das HIV-Genom weiterhin den Genabschnitt für die regulatorischen Proteine Tat (*transactivator of transcription*) und Rev (*regulator of expression of virion proteins*). Tat agiert im Replikationszyklus als Transkriptionsaktivator, erst nach Bildung des Tat-Proteins wird die Produktion viraler RNA um den Faktor 100 gesteigert. Rev ist als *Shuttle*-Protein für RNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma zuständig und beeinflusst so die Translation der RNA maßgebend. Weitere Genabschnitte kodieren für die akzessorischen Proteine Nef (*negativ factor*), Vif (*viral infectivity factor*), Vpu (*viral protein out*) und Vpr (*viral protein rapid*). Diese Vielzahl von Genen sind Spleißvarianten und kommen durch überlappende DNA-Abschnitte im HIV-Genom zustande. Durch Transkription des *gag*-Genes wird das 55 kDa große Vorläuferprotein pr55 gebildet, welches durch virale Proteasen im Zuge der Virusreifung in die Matrix-, Capsid-, Nukleokapsid- und Linkproteine gespalten wird. Durch das Überlappen des offenen Leserahmens (ORF *open reading frame*) des *gag* und des *pol*-Gens kommt es bei circa 5 % der Translation des *gag*-Gens durch Überlesen des *gag*-Stoppcodons zu einem Wechsel des Leserahmens, wobei das Gag/Pol-Vorläuferprotein Pr160 exprimiert wird (Jacks *et al.*, 1988). Durch Spaltung dieses Proteins entstehen die Reverse Transkriptase, die Integrase und die virale Protease. Das *env*-Gen kodiert für das 856 Aminosäuren große Vorläuferprotein gp160, das durch zelluläre Proteasen in die Oberflächenproteine gp120 und gp41 gespalten wird.

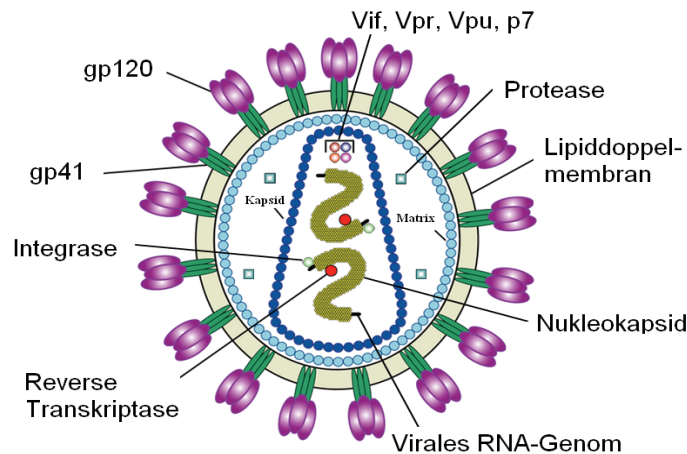


**Abb.1.1: Schematische Darstellung des 9,7 kb großen Provirus-Genoms von HIV-1**

Flankierende Wiederholungssequenzen LTR (*long terminal repeats*); Strukturproteingene *gag* (*group spezific antigen*), *pol* (*polymerase*), *env* (*envelope*); Genabschnitte der regulatorische Proteine Rev (*regulator of expression of virion protein*) und Tat (*transactivator of transcription*); Genabschnitte akzessorischer Proteine Nef (*negative factor*), Vif (*viral infectivity factor*), Vpr (*viral protein rapid*), und Vpu (*viral protein out*)

### 1.1.4 Morphologie des HI-Virus

HIV-1 ist das Lentivirus bei dem die Morphologie am besten aufgeklärt ist (Abb.1.2). Es hat einen Durchmesser von rund 100 nm und ist außen von einer Lipid-Doppelschicht umlagert, die ihren Ursprung in der Membran der Wirtszelle hat. In diese Membran ist das transmembrane Hüllprotein gp41 eingelagert, das nicht kovalent mit dem Oberflächenprotein gp120 assoziiert ist.



**Abb.1.2: Schematischer Aufbau eines HIV-Virions**

Lipidmembran mit heterodimeren Komplex aus Membranglykoproteinen gp41 und gp120; Matrix bestehend aus Matrixproteinen p17; Kapsid bestehend aus Kapsidproteinen p24; Ribonukleoproteinkomplex bestehend aus Nukleokapsidprotein p7, Reverse Transkriptase, viralem RNA-Genom und Integrase; akzessorische Proteine Vif, Vpr, Vpu, Nef; Linkerprotein p6 und Protease (Quelle: <http://www.cdc.gov/hiv/topics/basic/>)

Das 17 kDa große Matrixprotein p17 ist aminoterminal über angefügte Myristinsäurereste mit der Lipiddoppelmembran assoziiert (Gelderblom *et al.*, 1991) und bildet im Inneren der Membran einen Ring aus in dem das konische Kapsid liegt. Das Kapsid, gebildet aus dem 24 kDa großen Kapsidprotein p24, enthält zwei einzelsträngige, identische RNA-Moleküle, die jeweils über das 6 kDa große Nukleokapsidprotein p7, welches für die Verpackung der RNA zuständig ist, gebunden sind und zusammen mit der Reversen Transkriptase und der Integrase einen Ribonukleoproteinkomplex bilden. Die Reverse Transkriptase, eine DNA-Polymerase, wandelt virale RNA in doppelsträngige DNA um, wobei es oft zu einer fehlerhaften Ablesung der viralen RNA kommt und somit zum Einbau von falschen Basen in die provirale DNA. Dadurch entstehen bei einer Fehlerquote von  $1:10^3-10^4$  Basen gehäuft unterschiedliche Fluchtmutanten von HIV (Preston *et al.*, 1988). Die Integrase ist zum einen eine Endonuklease, die die Enden der provirale DNA an der LTR scheidet und zum anderen eine Ligase die die Integration der proviralen DNA durch Knüpfung einer kovalenten Bindung bewirkt.

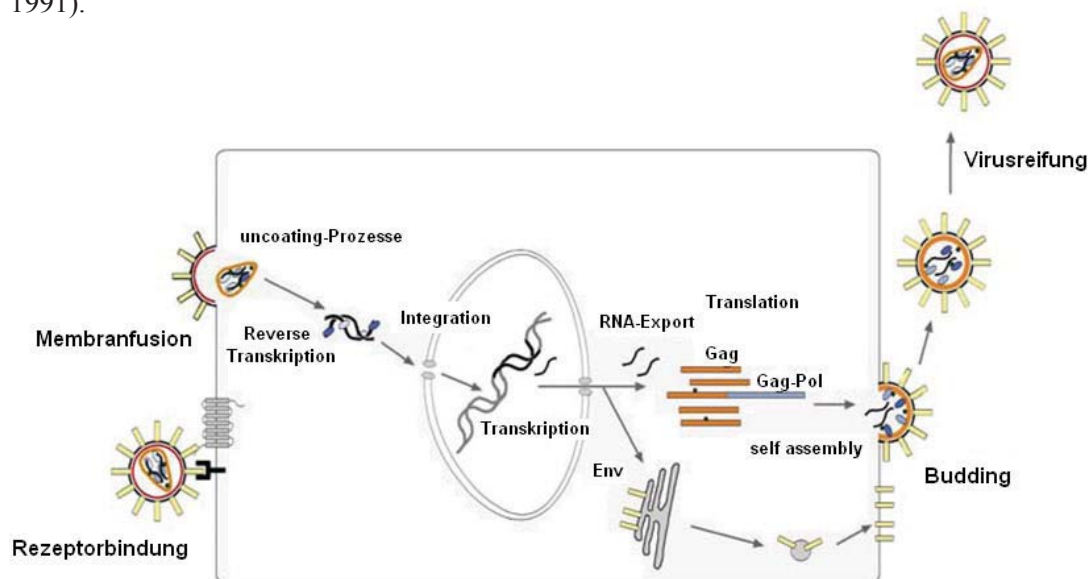
Weiterhin befindet sich im Kapsid das 27 kDa große Nef-Protein, sowie das 192 Aminosäuren große Vif (*viral infectivity factor*), das 81 Aminosäuren große Vpu (*viral protein out*) und das 96 Aminosäuren große Vpr (*viral protein rapid*). Nef gehört zu den Proteinen die als erstes in der Zelle nachzuweisen sind, seine Funktion ist neben der Herabregulation von CD4 auf der Zelloberfläche (Guy *et al.*, 1987) die Erhöhung der Replikationsrate und der Pathogenität von HIV (Rhee und Marsh, 1994). Auch hat Nef einen Einfluss auf die Anzahl von HLA-Klasse I-Moleküle HLA-A und HLA-B auf der Zelloberfläche, welche durch Nef-Einwirkung abnimmt, und interagiert weiterhin mit bis zu 10 Kinasen, welche die Signaltransduktion in der Zelle beeinflussen. Die Funktion der anderen 3 akzessorischen Proteine Vif, Vpu und Vpr ist noch teilweise unklar (Frankel und Young, 1998). Man weiß aber, dass sie einen Einfluss



auf den Präintegrationskomplex haben. Dabei leitet z.B. Vpr den Präintegrationskomplex in den Zellkern. Bei Vpu wurde herausgefunden, dass es die Interaktion des Env-Proteins mit CD4 durch Degradation von CD4-Molekülen unterbinden kann. Vif scheint für eine hohe Infektiosität der Viren wichtig zu sein, da durch Mutation im Vif-Gen instabile HIV-Partikel entstehen (Hope, 1997; Cohen *et al.*, 1996).

### 1.1.5 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus verläuft bei allen Retroviren auf die gleiche Weise (Abb.1.3). Nachdem das Virus im Organismus eingedrungen ist, wird es von Zellen der unspezifischen Immunabwehr erkannt und in den nächsten Lymphknoten transportiert. Dort werden alle Zellen, die einen CD4-Rezeptor vorweisen, vom Virus infiziert. Dabei handelt es sich insbesondere um Makrophagen, T-Lymphozyten sowie Eosinophilen, Dendritischen Zellen, Monozyten und Mikrogliazellen (Dalglish *et al.*, 1984; Clapham *et al.*, 1991).



**Abb.1.3: Replikationszyklus von HIV**

(Quelle: [www.molecular-virology.uni-hd.de/edu/pdf/ss06/ss06\\_09\\_rekombination.pdf](http://www.molecular-virology.uni-hd.de/edu/pdf/ss06/ss06_09_rekombination.pdf))

Nach der Erkennung der für gp120 spezifischen Rezeptoren und anschließender durch gp41 vermittelter Fusion der Wirtsmembran mit viralen Doppellipidmembran (1.1.6.2) kann das Kapsid in die Wirtszelle überführt werden, wobei durch *uncoating*-Prozesse die virale RNA freigelegt und die daran gekoppelte Reverse Transkriptase diese in doppelsträngige cDNA umwandeln kann. Der entstandene Präintegrationskomplex wird nun durch Vpr in den Zellkern transportiert. Über die Integrase, die die DNA an ihren LTR-Enden beschneidet, kann diese dann kovalent ins Wirtszellgenom als Provirus eingebaut werden. Dabei erfolgt die Integration der viralen DNA nicht zufällig, sondern in Bereichen aktiver Gene (Schröder *et al.*, 2002). Das Ablesen und Transkription der viralen DNA erfolgt über die Polymerase der aktiven Wirtszelle, dabei werden zuerst die Gene der regulatorischen sowie akzessorischen Proteine abgelesen. Durch Rev wird die Bildung von gespleißter und ungespleißter RNA beeinflusst, wobei die ungespleißten genomischen RNAs später in das Kapsid verpackt werden. Ferner kommt es zur Expression des Env-Vorläuferproteins gp160 im ER. Die Spaltung sowie Glykosylierung der Spaltprodukte gp120 und gp41 wird im Golgi-Apparat durchgeführt. Nach Transport der Proteine zur Zellmembran bilden sie dort einen heterodimeren Komplex aus, der durch den transmembranen Bereich von gp41 in der Zellmembran verankert wird. Die *gag*-Translation und die *gag/pol*-Translation erfolgt durch Leserahmenverschiebung.

Die so entstandenen Matrix-, Kapsid und Funktionsproteine werden durch *self-assembly* zum Kapsid zusammengebaut, in dem die zwei einzelsträngigen, ungespleißten RNAs in den Ribonukleoprotein-komplexen eingebettet sind. Nachdem das Kapsid an die Zelloberfläche transportiert worden ist, wird es durch *budding*-Prozesse mit einem Teil der Wirtsmembran, der die gp120/gp41-Komplexe enthält, als unreifes Partikel abgespalten. In der Reifungsphase des HIV-Partikels wird die Proteolyse der Gag und Gao/Pol-Vorläuferproteine durch virale Proteasen durchgeführt und es kommt zum reifen infektiösen Virus (Zündorf und Dingermann, 2001).

### 1.1.6 Membranglykoproteine

Der *env*-Genabschnitt, der die Membranglykoproteine gp120 und gp41 kodiert, wird zuerst als 160 kDa großes Vorläuferprotein gp160 am Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Nach Transport von gp160 in den Golgi-Apparat wird es durch zelluläre Furinproteasen in die beiden Proteine gespalten (Freed *et al.*, 1989) und mittels Mannoseoligosachariden N-glykosyliert. Dabei erfolgen 80% der N-Glykosylierung im der gp120-Aminosäuresequenz, was 50% des Molekulargewichts des Proteins ausmacht (Leonard *et al.*, 1990, Poignard *et al.*, 2001). Gp41 wird mit 5 Glykosylierungsstellen nur gering glykosyliert. Weiterhin folgen noch weitere Modifikationen der Glykosylierungen, sowie Ausbildung von Disulfidbrücken zur korrekten Faltung des Proteins (Wyatt und Sodrowski, 1998).

Nach der Einlagerung der Membranglykoproteine in die Wirtsmembran bilden diese einen nicht kovalent gebundenen, heterodimeren Komplex aus (Kowalski *et al.*, 1987), der aus je drei gp120-Molekülen und je drei gp41-Molekülen besteht. Elektronenmikroskopisch sind die gp120/gp41-Komplexe als sogenannte *spikes* auf der Zelloberfläche sichtbar (Gelderblom *et al.*, 1987) und sind dort über die Transmembrandomäne von gp41 in der Lipiddoppelmembran verankert. Die Funktion des gp120/gp41-Komplexes beruht auf der Erkennung der Wirtszelle, sowie Fusion dieser mit dem HI-Virus. Die Erkennung des HIV-spezifischen CD4-Rezeptors bzw. dem Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 erfolgt über gp120.

Das Glykoprotein gp120 besteht aus einer inneren und einer äußeren Domäne, die beide über eine aus 4  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta$ -*Bridging-Sheet*) bestehende Brücke verbunden sind. Die äußere Domäne, setzt sich aus 5 über Disulfidbrücken stabilisierte, variable Schleifen V1-V5 sowie mehreren konstanten Regionen C1-C4 zusammen (Arthos *et al.*, 1989), außerdem befinden sich die meisten Glykosylierungsstellen auf dieser Domäne, die nach außen exponiert ist, was die Bindung von Antikörpern an diesen Teil erschwert bzw. verhindert (Kwong *et al.*, 1998). Die CD4-Rezeptorbindungsstelle ist in der C3-Region lokalisiert (Lasky *et al.*, 1987), die Chemokinrezeptorbindungsstelle hingegen in der V3-Region (Hartley *et al.*, 2005). An die innere Domäne, die aus zwei Helices sowie mehreren variablen Schleifen besteht, binden vorwiegend nicht neutralisierende Antikörper.

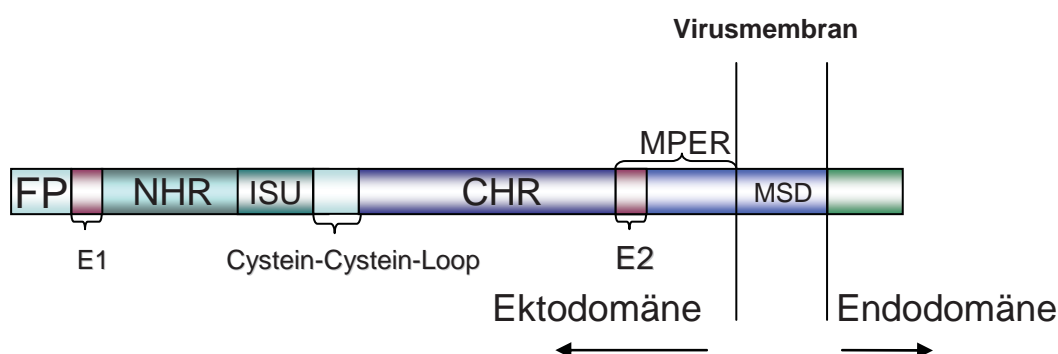
### 1.1.6.1 Das transmembrane Hüllprotein gp41

Das Glykoprotein gp41 besteht aus einer extraviralen Region, als Ektodomäne bezeichnet, einem Transmembranbereich (MSD *membrane spanning domain*) und der im Virus befindlichen Endodomäne (Abb.1.4). Dieser Aufbau weist strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen transmembranen Hüllproteinen wie Hämagglutinin 2 des Influenzavirus oder Protein G des Vesiculären Stomatitis Virus auf (Sangeeta *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 1998). Die 175 Aminosäure lange Ektodomäne untergliedert sich in ein 16 AS langes glyzinreiches, hydrophobes Fusionspeptid (Freed *et al.*, 1992, 1992) am N-terminalen Ende, einer N-terminalen  $\alpha$ -Helixregion (NHR), welche eine immunsuppressive Domäne ISU enthält (Ruegg *et al.*, 1989, Denner *et al.*, 1994), und einer carboxyterminalen  $\alpha$ -Helixregion CHR (Gallaher *et al.*, 1987), die beide durch einen Cystein-Cystein-Loop von einander getrennt sind (Abb.1.4). Weiterhin befindet sich nach der CHR der membranproximale externe Bereich MPER, welche die einzig von gp120 nicht verdeckte Region von gp41 darstellt und am stärksten konserviert ist (Gaschen *et al.*, 2002).

Bei Studien mit den transmembranen Hüllproteinen von porzinen endogenen Retroviren (PERV) konnten neutralisierenden Antikörper gewonnen werden, die ein Epitop benachbart zum Fusionspeptid (Epitop E1) und ein Epitop in der membranproximalen externen Region (MPER) (Epitop E2) erkennen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass gp41 ebenfalls eine E1- bzw. eine E2-Domäne besitzt, die im gefalteten Protein in Opposition zu einander stehen. E1 kann selbst keine Antikörper induzieren, jedoch wird vermutet, dass es die Antikörperbildung gegen E2 positiv beeinflusst. E2 umfasst bestimmte Epitopabschnitte, die Bindungsstellen für die neutralisierenden monoklonalen Antikörper, 2F5 (Muster *et al.*, 1993) und 4E10 (Zwick *et al.*, 2001) darstellen. 2F5 bindet an die lineare Sequenz ELDKWA (E1). Das Epitop für 4E10 WNWFNIT (E2) ist 3 Aminosäuren abwärts des 2F5 Epitops.

Über die Transmembrandomäne, die aus ca. 25-30 überwiegend hydrophoben Aminosäuren besteht, ist der gp120/gp41-Komplex in der Membran verankert. Die sich anschließende circa 150 AS lange Endodomäne setzt sich aus 3 amphipatischen Helixes zusammen (Gallaher *et al.*, 1987; Cao *et al.*, 1993). Durch Deletionsversuche an der Endodomäne, wurde herausgefunden, dass diese einen negativen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit des Virus hatten (Dubay *et al.*, 1992; Freed und Martin, 1995).

Die Membranfusion vermittelnde Funktion von gp41, wird durch Eindringen des Fusionspeptids (Freed *et al.*, 1995, Pereira *et al.*, 1997) in die Wirtsmembran, sowie anschließender Konformationsänderung eine Fusion der Wirtszelle und dem Virus initiiert (1.1.6.2) (Stein *et al.*, 1987)



**Abb.1.4: Schematischer Aufbau des transmembranen Hüllproteins gp41**

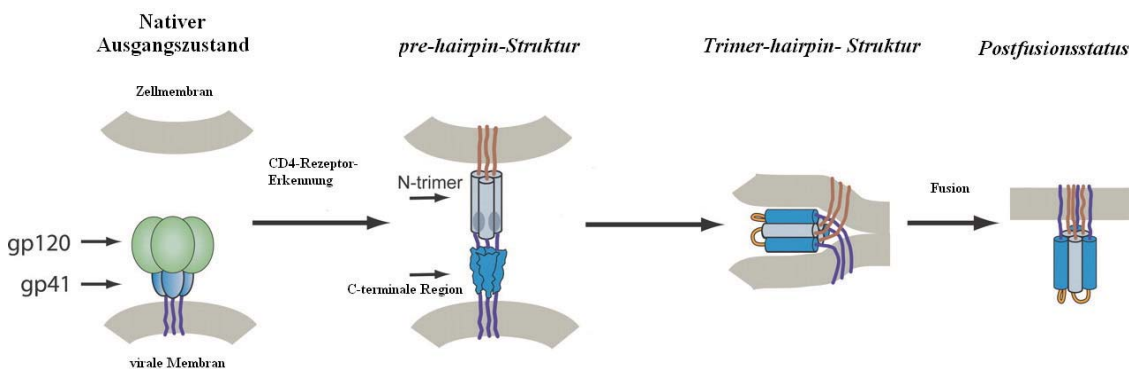
Fusionspeptid (FP), aminoterminaler Heptad Region (NHR), ISU Immunsuppressive Domäne Cystein-Cystein-Loop, CHR carboxyterminale HR (*heptad region*) Subdomäne, E1 E1-Region, E2 E2-Region, MPER membranproximaler externer Bereich, MSD *membrane spanning domain*, Transmembrandomäne



### 1.1.6.2 Membranfusion

Die Initiation der Membranfusion erfolgt mit der spezifischen Erkennung des zur Immunglobulinsuperfamilie gehörenden CD4-Rezeptors durch die C3-Region von gp120 (*attachment*) (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzman *et al.*, 1984), wobei es zu einer strukturellen Veränderung des Oberflächenproteinkomplexes kommt, wobei die Bindungsstelle des spezifischen Chemokinrezeptors CCR5 bei Makrophagen (Alkhatib *et al.*; 1996; Deng *et al.*; 1996; Dragic *et al.* 1996) bzw. CXCR4 bei T-Lymphozyten (Feng *et al.*, 1996) im V3-Bereich freigelegt wird (Este und Telementi, 2007). Die Bindung zwischen dem Korezeptor und gp120 löst eine Destabilisierung der nicht kovalenten Bindung aus, bei der sich gp120 aus dem gp120/gp41-Komplex entweder über *shedding* löst oder aber nur durch Konformationsänderung gp41 freilegt.

So kann das freigewordenen hydrophobe Fusionspeptid von gp41 mit 20-30 N-terminalen Aminosäuren in die Wirtsmembran (Freed 1990) eindringen, wodurch es zur Ausbildung einer haarnadelförmigen Zwischenstruktur (*pre-hairpin-intermediate*) kommt (Jones *et al.*, 1998, Gallo *et al.*, 2003). Durch Abknicken des Cystein-Cystein-Loops bildet sich eine durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisierte (Weissenhorn *et al.*, 1997) trimere Sechshelix-Konformation (*six-helix-bundle*). Dabei lagern sich die 3 C-terminale Helices von außen antiparallel in die Furchen der als „coiled-coil“-Struktur vorliegenden 3 N-terminalen Helices an (Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997, Sackett *et al.*, 2003). Diese Struktur bringt die Wirts- und Virusmembran in unmittelbare Nähe zueinander, was die Fusion beider möglich macht. Durch einen bisher ungeklärten Mechanismus kann sich eine Fusionspore (White, 1992) ausbilden, durch die das Kapsid in das Zellinnere integrieren kann. In der nachfolgenden Abbildung ist die Membranfusion, die im Organismus circa 15 min dauert, schematisch dargestellt.



**Abb.1.5: Schematische Darstellung der Konformationsänderung des HIV-1 Hüllproteins gp41 während der Fusion** (Chan und Kim, 1998)

## 1.2 Antiretrovirale Therapie und Impfstoffentwicklung

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte noch keine Therapie entwickelt werden, bei der das HI-Virus vollständig aus dem Organismus verdrängt werden konnte. Deshalb wird aktuell eine Kombinationstherapie, die als HAART (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*), bzw. CART (*Combined Anti-Retroviral Therapy*) bezeichnet wird, eingesetzt, welche als Mehrfachkombination von Medikamenten unterschiedlicher Wirkungsklassen verabreicht wird und den Krankheitsverlauf einer HIV-Infektion verlangsamen sowie die Lebensqualität eines HIV-Infizierten verbessern kann. Dabei handelt es sich um Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs), Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs), Protease-Inhibitoren (PIs), Entry-Inhibitoren (Korezeptorantagonisten und Fusions-Inhibitoren) und Integrase-Inhibitoren, die hemmend auf den Replikationszyklus eines HI-Virus wirken. Als Fusionsinhibitoren können z.B. die Peptide T21 (DP107), welches den gp41 Abschnitt 558-595 umfasst, und T20 (DP178), das homolog zum gp41-Abschnitt 638-673 ist, eingesetzt werden, die beide in der *Coiled-Coil*-Peptidstruktur während des Fusionsprozesses binden und so die Ausbildung des Sechshelix-Bündels unterbinden (Wild *et al.*, 1994, Lawless *et al.*, 1996). Durch die schnelle Ausbildung von HIV-1-Fluchtmutanten muss jedoch die Medikamentenzusammensetzung bei einem Patienten vielfach angepasst werden, um die optimale Wirkung zu erreichen. Neben diesen Medikamenten werden weiterhin auch Medikamente eingesetzt, die die auftretenden opportunistischen Erkrankungen behandeln sollen.

Die hohe Mutationsrate, sowie die Subtypenheterogenität von HIV stellt auch bei der Impfstoffentwicklung ein großes Problem dar. Deshalb wird versucht, monoklonale Antikörper mit einem großen Neutralisationsspektrum zu induzieren, die solche Mutanten weiträumig abdecken können. Besonders werden Antikörper gegen die transmembranen Hüllproteine gp120 und gp41 gesucht, da beide für den Infektionsbeginn sowie Infektion von neuen Zellen essentiell sind. Dabei konnten in der letzten Jahren schon mehrere neutralisierende monoklonale Antikörper gegen HIV-1 Hüllproteine aus Patienten isoliert werden. So wurde 2G12 gefunden (Trkola *et al.*, 1996), welches sein Epitop in der C4/V4-Region von gp120 besitzt und die gp120-Interaktion mit dem Korezeptor CCR-5 vermindert. Weiterhin konnten die zwei Antikörper 1b12 (Burton *et al.*, 1994), welche ihr Epitop in der CD4-Rezeptorbindungsstelle von gp120 hat, und 17b (Thali *et al.*, 1993), dessen Epitop erst durch Konformationsänderung von gp120 nach der Rezeptorerkennung freigelegt wird, gefunden werden, die beide Isolate unterschiedlicher Subtypen neutralisieren können. Die schon im Abschnitt 1.1.6.1 erwähnten Antikörper 2F5 und 4E10 haben ihr Epitop im C-terminalen Abschnitt der Ektodomäne des gp41-Proteins. In Kombination wurden 2F5 und 2G12 bereits in einer klinischen Studie (Phase I) durch passive Immunisierung im humanen System eingesetzt (Stiegler *et al.*, 2002, Armbruster *et al.*, 2004). Bis jetzt bieten diese Antikörper aber noch keine sterilisierende Immunität, da sie nur die Viruslast reduzieren können, um so dem Immunsystem Zeit verschaffen, eine zelluläre Immunantwort auszubilden. Von der Gabe eines lebenden HI-Virus, dessen Pathogenität abgeschwächt wurde, wird abgesehen, da man im Versuch mit nicht pathogenen SI-Viren an Makaken, zwar die Tiere vor der Infektion schützen konnte (Daniel *et al.*, 1992), jedoch bei einem Nef deletierten SIV der Rückgang zu eines infektiösen SI-Virus nachträglich beobachtet werden konnte (Whatmore *et al.*, 1995). Als Nahziel in der Impfstoffentwicklung wird deshalb weiterhin das Auffinden weiterer wirkungsvoller Epitope gesehen, die als Vakzine eine möglichst umfassende Immunreaktion bewirken, die nicht nur die zelluläre sondern auch die humorale Immunantwort auslösen können, da eine dauerhafte medikamentöse Behandlung, die mit starken Nebenwirkungen, sowie einer ständigen Resistenzentwicklung der HIV-Stämme gekoppelt ist, keine Lösung darstellt.

### 1.3 Retroviren induzierte Immunsuppression

Retrovirale Infektionen sind mit einer Immunsuppression gekoppelt, durch die wie z.B. bei AIDS auftretenden opportunistischen Erkrankungen (1.1.1) unweigerlich zum Tod führen. Dabei versteht man unter dem Begriff der Immunsuppression die Unterdrückung des Immunsystems, die durch Krankheiterreger sowie Medikamente initiiert werden kann.

Retroviren haben eine Möglichkeit entwickelt, modulierend auf das zellulären sowie humorale Immunsystem zu wirken und so eine Immunsuppression auszulösen, jedoch sind die Mechanismen, bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt. So wurden Versuche mit aktiven Viren wie FeLV (Cotter *et al.*, 1975) oder dem murinen Leukämievirus (MuLV) (Dent *et al.*, 1972) durchgeführt, welche beide eine immunsuppressive Wirkung auf ihre Wirte haben. Durch Versuche mit inaktiven Viren wurde später darauf geschlossen, dass nicht das aktive Virus selbst sondern Bestandteile des Virus eine Immunsuppression auslösten. *In vitro*-Versuche zeigten weiter, dass retrovirale TM-Proteine Immundysfunktionen auslösen können (Denner *et al.* 1986, Oostendorp *et al.* 1993), wobei der Einfluss dieser Proteine auf Lymphozyten gemessen wurde. Dabei wurden eine Hemmung der Mitogen-induzierten T- und B-Lymphozytenproliferation (Denner *et al.*, 1986, 1996), sowie eine Modulation der Zytokinproduktion festgestellt. Es wurde auch postuliert, dass diese Effekte auf einem gemeinsamen, hochkonservierten Merkmal basierten (Denner *et al.*, 2000). Im Zusammenhang mit der Expression von Env-Proteinen endogener Retroviren wurde auch gezeigt, dass diese ein Tumorwachstum bei Mäusen durch Suppression des Immunsystems, induzieren können und der Tumor so vor der Erkennung des Immunsystems geschützt wird (Mangeny und Heidmann, 1998, 2001).

Um den Effekte von TM-Proteinen von HIV auf das Immunsystem zu untersuchen, wurden dafür zuerst Modellversuche mit dem transmembranen Hüllprotein p15E von  $\gamma$ -Retroviren durchgeführt, wobei dort gezeigt wurde, dass p15E inhibierend auf das Immunsystem wirkte (Haraguchi *et al.*, 1997). So konnte 1985 Cianciolo ein Konsensuspeptid CSK-17 aus einem 17 Aminosäuren langen hoch konservierten Bereich der Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins p15E von FeLV synthetisieren. Dieses Peptid hatte wie p15E eine immunsuppressive Wirkung auf das Immunsystem des Organismus (Mitani *et al.*, 1987; Rugg *et al.*, 1989). Dabei wurden inhibierende Effekte auf die alloantigen-stimulierende Proliferation und Differentiation von Lymphozyten, auf die Aktivität von NK-Zellen und auf die IL2-abhängige Proliferation von muriner zytotoxischer T-Zellen (Cianciolo *et al.*, 1985, Harris *et al.*, 1987) beschrieben. Sequenzhomologien konnten auch im transmembranen Hüllprotein von HTLV-I, HTLV-II, an Rezeptorbindungsstellen von IFN $\alpha$ , am Nef-Protein von HIV-1 (Colette *et al.*, 1996), sowie im LMP des Epstein-Barr-Virus gefunden werden (Dukers *et al.*, 2000). Trotz geringer Sequenzhomologie zwischen CSK-17 und einem gp41-Bereich, welcher zwischen dem Cysteinloop und dem NHR-Bereich lokalisiert ist, wurde dieser Bereich als immunsuppressive (ISU-) Domäne bezeichnet (Denner *et al.* 1994, 1996).

Abgeleitete Peptide von gp41 bewirkten in *in vitro*-Versuchen mit Mäusen die Hemmung der Proliferation von Lymphozyten (Denner *et al.*, 1994). Weiterhin konnte eine Inhibition des cytopatischen Effekts auf humane MT4 Zellen durch das ISU-Peptid von HIV-1 nachweisen werden (Denner *et al.*, 1994), da die von gp41 abgeleiteten Peptide wie T20 an die *Coiled-Coil*-Struktur von gp120 binden konnten und so die Membranfusion inhibierten. Zudem konnte gezeigt werden, dass ISU von HIV (Denner *et al.*, 1996), das Konsensuspeptid CSK-17 und p15E von PERV die Typ 1- und Typ 2-Cytokinproduktion von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) modulieren (Denner 1998, Tacke

*et al.*, 2000). Dabei konnten für CKS-17 inhibierende Effekte auf die Expression von IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  und stimulierende Effekte auf die IL-10 und IL-6-Expression nachgewiesen werden (Kleinermaier *et al.*, 1987, Haraguchi *et al.*, 1995). Auch für gp41 konnte ein hemmender Einfluss auf die Expression von IL-2 und TNF- $\alpha$ , sowie ein Anstieg der IL-6- und IL-10-Expression bei Monozyten durch rekombinantes gp41 gezeigt werden (Takeshita *et al.*, 1996), was in dieser Arbeitsgruppe in einem Mikroarray für IL-6 bestätigt werden konnte. IL-10, welches von Th-2 Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und aktivierten B-Zellen exprimiert wird (Fiorentino *et al.*, 1991), besitzt ebenso immunsuppressive Eigenschaften. So wirkt eine Erhöhung der IL-10-Expression, wie bei HIV-Patienten zu beobachten (Denis *et al.*, 1994), inhibierend auf die Funktion von Monozyten/Makrophagen, T Zellen und NK Zellen (Berkmann *et al.*, 1995) sowie auf die Produktion von Zytokinen wie IL-1, IL-5, IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  (Borish, L. *et al.*, 1996; Armstrong *et al.*, 1996). Für gp120 konnte eine Auswirkung auf die Apoptoseinduktion (Müller *et al.*, 1992) und die Induktion von T-Zell-Anergie gezeigt werden (Faith *et al.*, 1992, Schols *et al.*, 1996).

## 1.4 Gp-41 Interaktionspartner

Im Vergleich zu den intensiven Rezeptor-Studien für gp120, konnte noch ein spezifischer Rezeptor bzw. ein spezifisches Protein für gp41 gefunden werden, das durch die Interaktion mit der Ektodomäne von gp41 immunsuppressive Effekte initialisieren kann. Beschrieben aber nicht vollständig charakterisiert wurden aber einige Interaktionspartner für gp41, dessen Funktion im bei der HIV-Pathogenese aber noch nicht geklärt ist. So konnten mehrere Proteine von Lysaten aus der B-Zelllinie Raji, der humanen Monozytenzelllinie U937, sowie aus der T-Zelllinie H9 detektiert werden, welche eine Größe von 37, 45, 49, 50, 62, 92 und 100 kDa aufwiesen (Chen *et al.*, 1998; Denner *et al.*, 1993; Qureshi *et al.*, 1990; Henderson *et al.*, 1993). Außerdem konnten für das 45 kDa große Protein P45 und das 62 kDa große Protein P62 Bindungsbereiche auf der Ektodomäne von gp41 identifiziert werden (Chen *et al.*, 1999), welche auch für das gp36 Protein von HIV-2 bestätigt werden konnten (Chen *et al.*, 1995). Als ein potentieller Interaktionspartner für gp41 wurde Hsp60 identifiziert (Speth *et al.*, 1999). Dieses Protein könnte eine Rolle bei der Initiation von pathogenen Signalkaskaden oder bei der Bindung von gp41 an einen transmembranen Rezeptor spielen. Ferner wurden auch Calciumbindende Bereiche auf der Ektodomäne von gp41 gefunden (Ebenbichler *et al.*, 1996). Calcium geht zahlreichen Funktionen bei der Apoptose, Zellproliferation, sowie bei der Exozytose von Zellen nach. Das Calciumbindende Protein Calmodulin wurde neben  $\alpha$ -Catenin und p115-RhoGEF als Bindungspartner des zytoplasmatischen Anteil von gp41 ausgemacht (Kim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2002). Der Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Komplex reguliert verschiedene Enzyme wie die Phosphodiesterase CaM-PDE (Srinivas *et al.*, 1993; Beary *et al.*, 1998), die bei Inhibition eine Apoptose von Zellen initiieren kann (Ishikawa *et al.*, 1998).  $\alpha$ -Catenin gehört zur Gruppe von Proteinen, die eine Komponente im Zelladhäsionskomplex darstellen. Durch diese Proteine werden Zelloberflächenproteine an das Zytoskelet gebunden. p115-RhoGEF wirkt als Effektor bei der zytoskeletalen Neuordnung von Zellen durch seine GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*)-Aktivität, durch die G-Proteine beeinflusst werden. In Verbindung mit einer Coexpression von gp41 wirkt p115-RhoGEF nicht aktivierend auf die RhoA GTPase, was wiederum zur Inhibierung der T-Zellaktivierung und der Entstehung von Streßfibrillen führt (Zang *et al.*, 1999).

In einem *yeast two-hybrid-Screen* welcher im Rahmen meiner Praxisarbeit durchgeführt wurde, konnten mehrere putative Interaktionspartner für das transmembrane Hüllproteine gp41, darunter HLA-C und

TREM-1, detektiert werden. Durch unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Antonio Siccardi, Department of Biology and Genetics, University of Milan, Italy, wurde in ersten FACS-Analysen gezeigt, dass eine Deletionsmutante des Fusions-vermittelnden transmembranen Hüllproteins gp41 an HLA-Cw4 bindet und möglicherweise eine entscheidende Rolle während der Fusion von Virus und Wirtszelle spielt. Für TREM-1 konnte in vorangegangenen Microarrays eine Hochregulation der TREM-1 mRNA infolge einer Behandlung von humanen peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) mit Peptiden, abgeleitet von der immunsuppressiven Domäne von gp41 gezeigt werden. Aufgrund dieser Fakten wurden in dieser Arbeit die zwei membranständigen Proteine auf Interaktion mit gp41 untersucht.

## 1.5 Haupthistokompatibilitätskomplex

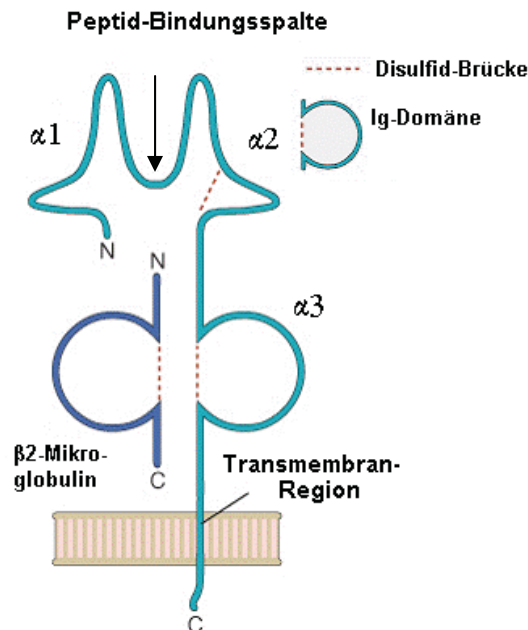
Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, *major histocompatibility complex*) ist in allen Vertebraten ab den Knorpelfischen zu finden und umfasst eine Gruppe von Genen, welche auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert ist. Diese Gene kodieren Proteine, die beim Menschen als HLA-Moleküle (*human leukocyte antigen*) bezeichnet werden und eine wichtige Rolle bei der Immunerkennung, der Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) bei Transplantationen und der immunologischen Individualität spielen. Dabei sind sie bei Transplantationen für mögliche Abstoßungsreaktionen verantwortlich. Die klassische Unterteilung der HLA-Moleküle beschreibt 2 Klassen: HLA-Klasse I (HLA-A, -B, -C) und HLA-Klasse II (HLA-DR, -DQ, -DP), die als Teil des erworbenen Immunsystems zählen. Als nicht-klassische Moleküle werden der Klasse I weiterhin HLA-E, F und G sowie der Klasse II LMP, TAP zugeordnet. Neben den klassischen MHC-Klassen existiert noch eine 3. Klasse der MHC-Moleküle, welche zum angeborenen Immunsystem gehört und Plasmaproteine wie Lymphokine (z.B. TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , LT), C-Komponenten (z.B. C2, C4, Bf) und die 21-Hydroxylase beinhaltet (Trowsdale *et al.* 1993). Diese Proteine besitzen nur z.T. Funktionen im Immunsystem und unterscheiden sich in ihren strukturellen Eigenschaften deutlich von den ersten zwei Klassen. Daher wird die 3. HLA-Klasse nicht zum eigentlichen (klassischen) HLA-System gerechnet.

### 1.5.1 Genomstruktur und Aufbau von MHC-Klasse-I-Molekülen

Der gesamte MHC-Genkomplex auf Chromosom 6 (Abschnitt 6p21.2-6p21.3) ist rund 4000 kb groß, wobei die HLA-Klasse I-Region ca. 2000 Kb umfasst. Diese Region codiert aber nur für die  $\alpha$ -Ketten der klassischen und der nicht klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle. Das Protein  $\beta$ 2-Mikroglobulin, welches in der Struktur der HLA-Klasse-I-Moleküle verankert ist, wird auf Chromosom 15 codiert und ist kaum polymorph. Um eine große Anzahl an verschiedenen Peptiden präsentieren zu können weist der HLA-Komplex neben seiner Polygenität einen hohen Polymorphismus auf Exon 2 und Exon 3 auf. Einige spezifische Allele sind auch mit Krankheiten wie zum Beispiel Typ I Diabetes, Narkolepsie, rheumatische Arthritis oder Psoriasis, bei der HLA-C eine dominierende Rolle spielt, assoziiert. Zum jetzigen Zeitpunkt sind beispielsweise ca. 1000 unterschiedliche HLA-Klasse-I-Allele bekannt. Dabei besitzt HLA-A 303 Allele, HLA-B 559 und HLA-C 150 Allele (Begemann 1982). Da eines der beiden Allele für HLA-A B und C von einem Elternteil geerbt und kodominant exprimiert wird, kann eine einzelne Zelle bis zu sechs unterschiedliche HLA-Allele exprimieren. HLA-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer polymorphen, schweren Kette (ca. 44kDa), welche sich aus 3 Domänen,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3, zusammensetzt und einer monomorphen, leichten Kette (ca. 12 kDa),  $\beta$ 2Mikroglobulin ( $\beta$ 2m), die nicht kovalent angelagert ist und keinen Kontakt mit der Zelloberfläche aufnimmt (Abb.1.6). Die schwere Kette ist mit einem 25



Aminosäuren langen hydrophoben transmembranen Abschnitt in der Membran verankert und mit ihrem zytoplasmatischen Abschnitt circa 30 Aminosäuren ins Zellinnere ragt (Bjorkman *et al.*, 1987). Durch die Struktur des extrazellulären Abschnitts der schweren Kette zählen die HLA-Klasse-I-Moleküle zur Immunglobulinfamilie. Durch die  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ -Domänen wird eine längliche Spalte ausgebildet, welche zu allen Seiten durch die  $\alpha$ -Helices und am Boden durch 4 gegenläufige Stränge parallel angeordneter  $\beta$ -Faltblätter der beiden  $\alpha$ -Domänen begrenzt, gebildet wird. Diese Spalte dient als Bindungsstelle für 8-10 Aminosäure lange Peptide (Giuliet *et al.*, 1986; Hillig *et al.*, 2001), die den T-Zell-Antigen-Rezeptoren präsentiert werden. Die Bindung dieser Peptide erfolgt über circa 6 unterschiedliche Bindungstaschen, wobei die Verankerung durch Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt und die Enden der Peptide in den Spalten versteckt werden. Durch die unterschiedlichen Bindungstaschen können die Peptide auch einen geknickten Verlauf haben und aus der Spalte herausragen. Diese, in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz des Peptids eingenommene spezifische Konformation des MHC I-Moleküls, ist die Basis der Erkennung durch  $CD8^+$ -T-Lymphozyten und die Unterscheidung zwischen „Selbst“ oder „Fremd“. Die weniger polymorphe  $\alpha 3$ -Domäne dient zur Interaktion mit dem  $CD8$ -Korezeptor auf  $CD8^+$ -T-Zellen. Die Verankerung in der Zellmembran erfolgt über eine Transmembran-Region der  $\alpha 3$ -Domäne (Salter *et al.* 1989; Sun *et al.*, 1995).



**Abb.1.6: Schematischer Aufbau eines HLA-Klasse-I-Moleküls**

(<http://expneu.softimpulse.de/expneu2/lehre/biochemie/vorlesungen/regul/vortrag/Antigenpraesentation.pdf>)

In der Bindungstasche werden Peptide präsentiert, die vorab durch Proteolyse von nukleären, zytoplasmatischen und membranständigen Proteinen oder viralen Sequenzen in sogenannten Proteosomen produziert werden (Kloetzel, 2001). Das entstandene Peptid wird über ER-Zisternen ins ER integriert und in der Bindungstasche des Moleküls mit Hilfe von TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) gebunden (Howard *et al.*, 1995). Die Bindung des Peptids in der Bindungstasche ist oft abhängig von dessen Affinität zu den HLA-Komplexen. Bei einem Peptid mit höherer Affinität kann das schon gebundene Peptid verdrängt werden. Nach der Beladung des HLA-Klasse-I-Moleküls mit dem zu präsentierenden Peptid wird der vollständige HLA-Klasse-I-Peptid-Komplex nach Lösen der Chaperone sowie TAP über den sekretorischen Weg zur Zelloberfläche transportiert (Bodmer 1987).

## 1.5.2 Funktion von MHC-Klasse-I-Molekülen im Immunsystem

Die zentrale immunbiologische Funktion der klassischen HLA-Moleküle ist die Antigenpräsentation durch Bindung von Peptiden in der Antigen-Bindungsspalte. HLA-Klasse-I-Moleküle, die fast auf allen kernhaltigen Zellen (außer Spermien), sowie Thrombozyten zu finden sind, präsentieren bevorzugt Peptide von endogen synthetisierten zellulären oder viralen Proteinen auf der Zelloberfläche. So wird eine antigenspezifische, T-Zell-Rezeptorvermittelte Erkennung durch den CD8-Rezeptor von zytotoxischen T-Zellen ermöglicht (Pamer und Cresswell, 1998). Die Erkennung fremder Peptide durch die T-Zelle ruft eine Apoptoseinduktion in der Zielzelle durch porenbildene Perforinmoleküle und eine anschließende DNA-Fragmentierung mittels der DNase Granzyme aus. Weiterhin kann die Apoptoseinduktion auch über Zytokinausschüttung der zytotoxischen T-Zellen wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  geregelt werden, die proinflammatorische Reaktion an der Zielzelle mit einer Überexpression von MHC I auslösen. Für eine direkte CD8+-T-Zell-Aktivierung werden auch nur wenige MHC-Komplexe zur Erkennung auf der Zielzelle benötigt, da sie IL-2 zur eigenen Aktivierung selbst herstellen können.

Weiterhin werden HLA-Klasse-I-Moleküle von Rezeptoren (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) natürlicher Killer-Zellen (NK), die auch auf Subpopulationen von T-Zellen vorkommen, erkannt, welche sich in aktivierende und inhibierenden Rezeptoren unterteilen lassen. Bei der Erforschung der NK-Zell-Funktion konnte anfänglich eine verstärkte NK-Aktivität bei Tumorzellen mit fremden oder fehlenden MHC-Antigenen festgestellt werden, wobei der Grund dafür noch unklar war (Kiessling *et al.*, 1975), 1981 postulierte Kärre dann über den Mechanismus der "Missing-Self"-Erkennung. Dabei erkennen NK-Zellen durch Killerzellinhibierende Rezeptoren (KIR) speziell Peptide die von HLA-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von Zielzellen präsentiert werden und empfangen so ein inhibitorisches Signal, dass zur Dephosphorylierung sogenannter *Immunoreceptor-Tyrosine-Based-Inhibitory-Motive* (ITIM) führt und die Zielzellyse unterdrückt wird.

Exprimiert eine Zelle keine oder als fremd erkannte HLA-Klasse-I-Antigene oder werden noch unbekannte Zielzellrezeptoren durch Killerzellaktivierende Rezeptoren (KAR) erkannt so kommt es konsekutiv zur Zytolyse durch NK-Zellen. Diese wird wie bei den zytotoxischen T-Zellen durch Perforin und Granzymen initiiert (Lieberman, 2003) Weiterhin können NK-Zellen proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  erzeugen (Biron, 1999; Chuang *et al.*, 2001), IL2 für die Aktivierung von T Zellen freisetzen und mit dendritischen Zellen interagieren (Degli-Esposti and Smyth, 2005; Moretta *et al.*, 2002). Als Liganden für einzelne KIR-Rezeptoren konnten mittlerweile definierte HLA-Klasse-I Moleküle identifiziert werden, worauf in Bezug auf HLA-C im nächsten Abschnitt weiter eingegangen wird. Die Liganden für KAR sind nicht sehr gut dokumentiert, allerdings wird postuliert, dass sie die gleichen HLA-B oder HLA-C Moleküle binden wie ihre verwandten inhibitorischen Rezeptoren.

## 1.5.3 HLA-C

Das HLA-C-Genabschnitt ist zwischen dem HLA-A-Genlocus und dem HLA-B-Genlocus lokalisiert. Es weist eine hochkonservierte Helix in der  $\alpha 1$ -Domäne auf und hat eine Größe von 40 kDa aufweist, wird besonders auf Lymphozyten exprimiert und weist im Gegensatz zu den anderen 2 HLA-Klasse-I-Molekülen HLA-A und -B eine 10fach geminderte Expression und somit auch eine geringere Präsenz auf der Zelloberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle auf (Zemmour *et al.*, 1992). Weiterhin ist die Peptidbindungsfähigkeit von HLA-C sehr begrenzt. Man geht davon aus, dass diese Besonderheiten

durch die schwache Bindung des  $\beta$ -Microglobulins an die schwere Kette hervorgerufen werden, da dadurch keine stabile Struktur des Moleküls gewährleistet ist.

Die Arbeitsgruppe um Colonna fand 1995 heraus, dass HLA-C als Ligand für den NK-Zell-Rezeptor KIR2D fungiert. Dabei differenziert KIR2D durch seine unterschiedlichen Allele zwischen auftretenden Polymorphismen auf Position 77 und 80 der schweren Kette von HLA-C. So können HLA-C-Alelle in 2 unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. HLA-C-Gruppe 1 (Allele Cw1, Cw3, Cw7, Cw8) die auf Position 77 ein Serin und auf Position 80 ein Asparagin enthalten, wird durch KIR2DL2, KIR2DL3 KIR2DS2 erkannt (Colonna *et al.*, 1993). Die HLA-C-Gruppe 2 (Cw2, Cw4, Cw5, Cw6, Cw15) besitzt auf Position 77 ein Arginin und auf Position 80 ein Lysin. Sie wird durch KIR2DL1 und KIR2DS1 erkannt (Biassoni *et al.*, 1997, Qing *et al.*, 1999).

Allgemein wird angenommen, dass HLA-C die gleiche biologische Funktion wie HLA-A und B hat. Es konnte *in vitro* sowie *in vivo* nachgewiesen werden, dass es zu einer Erzeugung von zytotoxischen T-Zellen gegen HLA-C kommt (Grunnet *et al.*, 1976, Malissen *et al.*, 1981).

Ferner ist HLA-C mit Autoimmunkrankheiten assoziiert, wobei z.B. der Anstieg der Häufigkeit von HLA-Cw4 mit dem Auftreten von Typ 2 Diabetes korreliert (Groop *et al.*, 1983). Weiterhin kann bei HLA-Cw6-positiven Patienten ein 10fach höheres Risiko beobachtet werden, an Psoriasis zu erkranken, als bei HLA-Cw6-negativen (Tiilikainen *et al.*, 1980; Mallon *et al.*, 1999). Auch können definierte KIR Genotypen mit Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis (Danielli *et al.*, 2006), sowie mit einer verlangsamten Progression einer AIDS-Erkrankung in HIV-infizierten Patienten beobachtet werden (Altfeld *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Allel HLA-Cw4 für Interaktionsanalysen verwendet. Für HLA-Cw4 konnte eine Interaktion mit dem NK-Rezeptor KIR2DL1 nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 1997), wobei Fan und Wiley 1999 die bindende Region (QYDDAVYKL) von HLA-Cw4 für KIR2DL1 identifizieren konnten (Fan und Wiley, 1999).

## 1.6 TREM (triggering receptor expressed on myeloid cells)

Die TREM-Proteine, welche zur Familie der Immunglobuline zählen, sind eine Gruppe von Rezeptoren auf der Oberfläche von myeloiden Zellen, zu denen unter anderem Makrophagen, Mikroglia, Granulozyten, dendritische Zellen, sowie Monozyten zählen (Bouchon *et al.*, 2001, 2000; Daws *et al.* 2001). 2003 wurde durch Allock *et al.* ein Gencluster auf dem Chromosom 6 (Abschnitt 6p21.1) identifiziert, welches sich zentromerwärts von dem HLA-Komplex befindet. Dieses Gencluster codiert für transmembrane Proteine, welche als TREM-1, TREM-2 bezeichnet werden, sowie für 4 *trem-like transkripts* (TREM1, TREM2, TREM3, TREM4), wobei TREM3 und TRML4 nur Pseudogene sind. Weiterhin konnte auf diesem Genabschnitt das Gen NCR2 identifiziert werden, welches für das Protein NKP44 codiert (6.1), das nur auf NK-Zellen exprimiert wird. Die Funktion der TREM-Proteine ist noch unklar, jedoch geht man davon aus, dass sie eine große Rolle im angeborenen sowie erworbenen Immunsystem spielen.



## TREM-1

Das humane 30 kDa glykosylierte große TREM-1 ist ein noch relativ unbekanntes Protein, welches speziell auf Neutrophilen, Monozyten und Lungenmakrophagen exprimiert wird (Bouchon *et al.*, 2000; Colonna *et al.*, 2003; Gingras *et al.*, 2002). Es besteht aus einer V-Typ Ig-ähnlichen Ektodomäne, in der 2006 Gattis *et al.* eine hochkonservierte Ligandenbindungsstelle identifizieren konnte, einer transmembranen Region mit einem positiv geladenen Lysinrest sowie einer kurzen zytoplasmatischen Region die aber keine Signalfunktion aufweist (Kelker *et al.*, 2004; Gattis *et al.*, 2006). Weiterhin sind 2 Formen, eine membranständige und eine lösliche Form, von TREM-1 bekannt. Bei der löslichen Form wird vermutet, dass diese entweder als Splice-Variante des transmembranen TREM-1 hervorgeht oder durch *shedding*-Prozesse an TREM-1 auf der Zelloberfläche entsteht (Kelker *et al.*, 2004; Radaev *et al.*, 2003; Gingras *et al.*, 2002) konnte in Bezug auf die Splice-Variante ein 17,5 kDa großes TREM-1-Protein in humanen Monozyten detektieren, das keine transmembrane oder zytoplasmatische Region aufwies.

Eine Bindung noch unbekannter Liganden, die z.B. während Entzündungsprozesse hochgeregelt werden (Colonna *et al.*, 2003), an TREM-1, kann zur Ausbildung eines TREM-1/DAP12-Komplex (DAP12 = *DNAX activation protein of 12 kDa*) führen. Neben TREM-1 assoziieren auch TREM-2 und NKp44 mit dem Signalmolekül DAP12, dessen cytoplasmatischer Teil aus einem aktivatorischem Signalmotiv (ITAM *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) besteht. Durch Phosphorylierung von ITAM kann die Tyrosinkinase Syk an diesen binden und es werden verschiedene Signalkaskaden ausgelöst (Tessarz und Cerwenka, 2008). Diese TREM-1/DAP12-Induktion initiiert die Sekretion von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 und MCP1 (*monocyte chemoattractant protein 1*). Außerdem steuert TREM-1 die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation und Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener Proteine, sowie teilweise die Mitogenaktivierte Proteinkinasen ERK1 and ERK2. Bei *in vivo*-Versuchen konnte eine starke Expression von TREM-1 auf Neutrophilen und Monozyten beobachtet werden, die in Geweben mit bakteriellen Infektionen vorkamen.

Bei der Funktion des löslichen TREM-1s wird vermutet, dass dieses (sTREM-1 s= *soluble*) als Antagonist für TREM-1 wirkt, in dem es mögliche Interaktionspartner von TREM-1 bindet und so die TREM-1 abhängige Zell-Aktivierung sowie die Signalkaskade beeinträchtigt.

Die Arbeitsgruppe um Haselmayer konnte 2007 eine synergistische Aktivierung von neutrophilen Effektorfunktionen durch TREM-1 und Toll-like-Rezeptor (TLR) hervorgerufen. Weiterhin erfolgt die Aktivierung der TREM-1-Expression über NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B), der wiederum von LPS, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  reguliert wird (Murakami *et al.*, 2007). Es wurde ferner berichtet, dass durch Metalloproteinase Inhibitoren die Menge an sTREM-1 reduziert und TREM-1 auf der Zelloberfläche stabilisiert wurde (Gomez-Pina *et al.*, 2007). Es konnte auch im Zusammenhang mit der Hemmung von TREM-1 bei Neutrophilen eine Produktionsinhibierung des proinflammatorischen Zytokins IL-8 beobachtet werden, was auf eine mögliche Ligandenbindungsstelle von TREM-1 auf Neutrophilen vermuten lässt (Haselmayer *et al.*, 2007).

## 2. Zielstellung

Ziel der vorliegenden Bachelorarbeit war es, die Interaktion zweier potentieller Partner mit dem transmembranen Hüllprotein gp41 zu untersuchen, die in einer durchgeführten *yeast two hybrid*-Analyse detektiert wurden. Dabei handelt es sich zum einen um das HLA-Klasse I Molekül HLA-C, welches mit der gp41-Deletionsmutante rgp, welche die Ektodomäne ohne Fusionspeptid darstellt, gefunden wurde und zum anderen um das mit der g41-Deletionsmutante NHR detektierte TREM-1.

Für HLA-C konnte unser Kooperationspartner Prof. Dr. Antonio Siccardi, Department of Biology and Genetics, University of Milan, Italy, in ersten FACS-Analysen zeigen, dass eine Deletionsmutante des transmembranen Hüllproteins gp41 an das HLA-C-Allel HLA-Cw4 bindet und möglicherweise eine Rolle während der Fusion von Virus und Wirtszelle spielt.

Für TREM-1 konnte in einem vorangegangenen Microarray eine Hochregulation der TREM-1 mRNA infolge einer Behandlung von humanen peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) mit dem ISU-Peptiden von HIV-1 im Vergleich zur Abnahme von TREM-1 mRNA im Medium gezeigt werden. So sollen Methoden des *GST-pull downs* und der Koimmunpräzipitation eingesetzt werden, mit deren Hilfe die Interaktion der beiden Proteine mit gp41 untersucht werden.

Weiterhin sollen Klonierungsversuche für HLA-Cw4-Verkürzungsmutanten durchgeführt werden, die in weiterführenden *yeast two hybrids* eingesetzt werden sollen, um die HLA-Cw4 Bindungsstelle für das transmembrane Hüllprotein gp41 einzugrenzen.

### 3. Materialien

#### 3.1 Chemikalien

5 x Sequenzierungspuffer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\beta$ -Mecaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Big Dye Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin BSA	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
Calciumchlorid $\text{CaCl}_2$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Complete <sup>TM</sup> EDTAfrei-Tablette	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G-250	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAB-Reagenz	Fluka Chemie AG, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTP-Mix, 10 mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Dithiothreitol DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dynabeads Protein G	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DYNABEADS <sup>®</sup> M-280 Streptavidin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>Eco</i> RI-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Elutions-Puffer (EB)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fötale Kälber-Serum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Gluthathion Sepharose <sup>TM</sup> B4	GE Healthcare Bioscience, Freiburg, Deutschland
Glyzin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glyzerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Wasserstoffperoxid $\text{H}_2\text{O}_2$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid IPTG	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	Sucofin TSI GmbH, Zeven, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid $\text{MgCl}_2$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid $\text{MgCl}_2$ , 25 mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Natriumchlorid NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid NaOH	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NEB-Puffer 1, 2, 3, 4	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
O'Gene Ruler , DNA Ladder Mix 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Orange G	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Page Ruler <sup>TM</sup> , Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PCR-Puffer x 10	Roche, Mannheim, Deutschland
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS) ultra pure	Roth, Karlsruhe, Deutschland

N,N,N,N'-Tetramethylethylamin (TEMED)	USB Cooperation, Cleveland, USA
T4-Ligase-Puffer	Roche, Mannheim, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween <sup>®</sup> 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasser (nukleasefrei)	Promega Cooperation, Madison, USA
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 3.2 Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Bio-Rad Mini-Sub Cell GT Gel System	BioRad, München, Deutschland
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Duomax 1030 (Schüttler)	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Entwicklermaschine Curix60	Agfa, Köln, Deutschland
Gel Doc 2000 (Quantity One Version 4.2.1)	Bio Rad, München, Deutschland
GFL 3016 Schüttelapparat	GFL, Burgwedel, Deutschland
Innova 4330 Inkubator	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Intelli-Mixer RM-2	ITL Labortechnik, Wasseburg, Deutschland
Kühlzentrifuge 5804R q	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge Centrifuge 5403	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mastercycler epigradient S	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Mikroskop ID 03	Zeiss, Westgermany
Mikrowelle Micro-Chef FM B930	Moulinex, Deutschland
Minifuge RF	Heraeus, Sepatech
NanoDrop <sup>®</sup> Spectrophotometer ND-1000	PeQLab, Erlangen, Deutschland
pH Meter MP 220	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Picofuge <sup>™</sup>	Stratagene, La Jolla, USA
Picozentrifuge	Neo Lab, Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipetus <sup>®</sup> akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Power Pac Basic, 200 bzw. 300	BioRad, München, Deutschland
Reax 2 Überkopfschüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sterilgrad Class II Type A B3	Baker Company, Sanford Maine, USA
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Thermostat Plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Trans-Blot SD <sup>®</sup> Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
VF2 (Vortexer)	Janke&Kunkel, IKA <sup>®</sup> Labortechnik, Staufen, Deutschland
Vortex Genie 2 <sup>™</sup>	Bender und Hobei AG Zürich, Switzerland
Waage Sartorius Excellence E2000D	Sartorius Iso Cal, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Avanti Beckmann Coulter

### 3.3 Verbrauchsmaterial

PVDF-Membran	Millipore Bedford, USA
CL-XPosure™ Clear Blue X-Ray Film	Thermo scientific, Rockford, USA
Eppendorf Standard Reaktionsgefäß 3810X	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Extra Thick Blot Paper 19 x 18.5 cm, 30 sheets	BioRad, München, Deutschland
Parafilm®	M Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
PCR SoftStrip 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe plus, Gesellschaft für medizinische und labortechnische Einmalartikel mbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Plastibrand® Einmal-Küvetten	PS Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Plastibrand® Reaktionsgefäße, 1,5/2 ml	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten à 1, 5, 10 und 25 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Sterilfilter FP30/0,45µm CA-S	Rotring Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Corning® Costar® Stripette® plastic	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zellkulturflasche Standard, 75cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup>	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen, PP, 15 und 50 ml	TPP (Techno Plastic Products AG), Trasadingen, Schweiz

### 3.4 Antibiotika

<i>Antibiotika</i>	<i>Hersteller</i>
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
G418 (Geneticin)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Hig B (Hygromycin B)	Invitrogen, Carlsbad Deutschland
Zeomycin	Invitrogen, San Giuliano Milanese, Italy

### 3.5 Kommerzielle Kits

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>
Bio 101 Systems Miniprep Express Matrix	Qiagen GmbH, Hilden
Quiaquick® Gel Extraction Kit – 250	Qiagen GmbH, Hilden
Invisorb® Spin DNA Extraction Kit	Invitek GmbH, Berlin Deutschland
B-Per GST Fusion Protein Spin Purification Kit	Pierce, Rockford, USA
BigDye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems Foster City, USA
Gel-Dry™ Drying Solution (1X)	Invitrogen, Carlsbad, Deutschland
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

### 3.6 Enzyme

#### Ligasen

T4-Ligase *E.coli*

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

#### Polymerasen

Ampli-Taq-Polymerase

Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Haus Taq-Polymerase

von Arbeitsgruppe selbst hergestellt

#### Restriktionsenzyme

<i>Restriktionsenzyme</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Herkunft</i>
<i>Nco</i> I	5'...CCATGG...3' 3'...GGTACC...5'	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
<i>Xho</i> I	5'...CTCGAG...3' 3'...GAGCTC...5'	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
<i>Xcm</i> I	5'...CCANNNNNNNNNTGG...3' 3'...GGTNNNNNNNNNACC...5'	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland

### 3.7 Stammlösungen

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
10 X PBS	1370 mM NaCl 27 mM KCl 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH auf 7,4 einstellen
50 x TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
10 x Ladepuffer	50 % ( v/v) Glycerin 2 % (v/v) 1 x TAE 1 Spatelspitze Orange G
10 x Laufpuffer	2 M Glycin 0,25 M Tris 20 % SDS
4 x Probenpuffer	10 ml Glycerin 2g SDS 1 ml 1%ige Lösung 8 ml 1M Tris/HCl 6 ml H <sub>2</sub> O 5 % β-Mecaptoethanol

### 3.8 Primer

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>
Fish for	CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC
Fish rev	GTGAACTTGC GGGGTTTTTCAGTATCTACGAT
1A HLA-Cw for	TTCCATGGAGCGGGTCATGGCGCCC
163A HLA-Cw for	TTCCATGGAGATCACCCAGCGCAAG
94A HLA-Cw for	TTCCATGGAGGCACAGGCTGACCGA
207A HLA-Cw for	TTCCATGGAGCACCCAAAGACACAC
HLA-Cw 320 rev	TTCTCGAGCTAGACAGCCAGGAC
HLA-Cw 162 rev	TTCTCGAGCTAAGCCGCCGTGCTCGC
HLA-Cw 233 rev	TTCTCGAGCTAGTAGAAGCCAGGGC
HLA-Cw 114 rev	TTCTCGAGCTAGTCCTCGCTCTG

Alle Primer sind von der Firma Sigma in Deisenhofen/Deutschland hergestellt.

### 3.9 Peptide

<i>Peptide</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Ursprung</i>
Peptid #23 (Deletionsmutante von gp41)	CTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWME	Department of Biology and Genetics, University of Milan, Italy
randomisiertes HIV-ISU	Bio-Ahx-Ahx-QQEKVAADKLRLIQYQLLR	Genaxxon Bioscience GmbH, Biebrach
HIV-ISU	Bio-Ahx-Ahx-KQLQARILAVEERYLKDQQL	Genaxxon Bioscience GmbH, Biebrach

### 3.10 Antikörper

<i>Primärantikörper</i>	<i>Protein</i>	<i>Eingesetzte Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
L31	$\alpha$ -1-Domäne des Proteins HLA-C	1:1000	De Santis C, Borghi O, Lopalco L, Meroni PL, Siccardi AG, Beretta A; Department of Biology and Anti-HLA antibodies in AIDS patients, <i>Int Conf AIDS</i> . 1992 Jul 19-24
Anti humanes TREM-1 mAb	TREM-1	1:1000	Dr. Phillip Haselmayer, Mainz, Deutschland
Monoclonal $\alpha$ -GST-antibody	GST-Protein	1:1000	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
<i>Sekundärantikörper</i>			
Polyclonal Rabbit Anti-mouse Immunglobulin/HRP	Mouse- Antikörper	1:2000	Dako, Hamburg, Deutschland



### 3.11 Vektoren

<i>Vektor</i>	<i>Größe</i>	<i>Nutzen</i>	<i>Herkunft</i>
pACT 2	8,1 kb	Prey-Vektor	Clontech, Heidelberg, Deutschland
pSSTA-ITLN2	3580 bp	Übergangs-Vektor	AG Denner, RKI, Berlin
pZeoSV2 (+)	3,5 kb	Expressionsvektor	Invitrogen, San Giuliano Milanese, Italy

Vektorkarten sind im Anhang einzusehen.

### 3.12 Zellen

<i>Bakterien</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Referenz</i>
DH5α <i>E. coli</i> K 12	<i>F</i> -, <i>F80d lacZ M15, recA1, endA, hsdR17, supE44, gyrA96, thi, rel A, 1sup E44</i>	Hanahan 1983
BL21 <i>E. coli</i> (DE3)	<i>B, F</i> -, <i>ompT, gal, [dcm], [lon], hsdSB(rB-mB-), galλ(DE3)</i>	Studier und Moffat 1986
<i>Eukaryotische Zelllinie</i>	<i>Phänotyp</i>	<i>Herkunft</i>
B-Zelllinie 271.221 Cw4	Expression von HLA-Cw4	Department of Biology and Genetics, University of Milan, Italy

### 3.13 Nährmedien

<i>Nährmedium</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Zellen</i>
2YT-Medium/Agar	16 g Pepton (tryptisch verdaut) 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl ggf. 15 g/l Agar ad. 11 H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> autoklavieren	Bakterien
LB-Medium	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ggf. 15 g/l Agar ad. 11 H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> autoklavieren	Bakterien
RPMI-Medium	Grundmedium: RPMI 1640 1x Supplemente 10 % (v/v) FKS 2 % (v/v) Glutamin 1 % (v/v) HEPES 1 % (v/v) Penicillin / Streptomycin	Eukaryotische Zellen



## 4. Methoden

### 4.1 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien und eukaryotischen Zellen

#### 4.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

Für Klonierungsversuche wurde der *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$ , für die Überexpression von Proteinen der *E.coli*-Stamm BL21 verwendet. Die Anzucht dieser Stämme erfolgte entweder als Suspensionskultur in 2YT-Medium oder auf 2YT-Agarplatten. Für die Suspensionskultur wurden dafür 5 ml 2YT-Medium mit Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur oder durch Picken einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft und bei 37°C auf einem Rundschtüttler (230 rpm) über Nacht inkubiert. Die Anzucht einer Reinkultur eines transformierten Bakterienstammes erfolgte durch Zugabe eines spezifischen Selektionsmarkers zum Medium, wie Ampicillin (100 $\mu$ g/ml) oder Kanamycin (35 g/ml), für die das transformierte Plasmid ein Resistenzgen besaß. Durch Agarplatten mit Selektionsmarker konnten positiv transformierte Klone selektiert werden. Diese wurden wieder bei 37°C auf einem Rundschtüttler (230 rpm) über Nacht inkubiert.

Die Lagerung der Suspensionskulturen sowie Agarplatten erfolgte für mehrere Monate bei 4°C und Parafilmversiegelung. Zur Stammhaltung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt, die in Kryotubes bei -20°C bzw. -80°C gelagert wurden.

<b><i>Glycerinkultur</i></b>	
• 850 $\mu$ l Baktierumsuspension	} Gründlich vortexen
• 150 $\mu$ l Glycerin	

#### 4.1.2 Wachstumsmessung

Zur Abschätzung der Wachstumsphase, der in Suspension vorliegenden Bakterien, wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch bestimmt. Das Prinzip besteht darin, dass die Eigenabsorption der Zellen gemessen und als Vergleich (*blank*) das Medium allein herangezogen wird. Anhand der OD kann dann mittels Lambert-Beerschen Gesetz die Zellzahlkonzentration ermittelt werden.

<b><i>Lambert-Beersche Gesetz:</i></b>	$\Delta E = c \cdot d \cdot e$
c ... Konzentration (Zellen/ml)	e ... molarer Extinktionskoeffizient
d ... Schichtdicke der Küvette (cm)	$\Delta E$ ...Extinktionskoeffizient
Die Schichtdicke der Küvette betrug 10 mm.	

### 4.1.3 Transformation von Bakterien

Der Vorgang der Transformation ist ein zentraler Punkt bei einem Klonierungsexperiment, sowie bei der Vervielfältigung von Plasmid-DNA. Dabei werden DNA-Moleküle von einem Wirtsorganismus aufgenommen und können dann stabil weitergegeben werden. Als Wirtsorganismus werden besonders Bakterienstämme wie *E.coli* eingesetzt, welche aber nicht über eine natürliche Transformationseffizienz verfügen. Um eine gesteigerte Transformationseffizienz zu erreichen, müssen die Bakterien daher über chemische oder physikalische Methoden kompetent gemacht werden.

#### Herstellung kompetenter Bakterien

In dieser Arbeit wurde der Bakterienstamm *E.coli* DH5 $\alpha$  eingesetzt und mittels Calciumchloridmethode kompetent gemacht. Hierfür wurden 5ml 2YT-Medium mit einer DH5 $\alpha$ -Bakterienstammkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 230 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 500 ml 2YT-Medium mit der frischen ÜN-Kultur 1/100 angeimpft und bis zu einem OD<sub>600</sub> von circa 0,6 inkubiert. Nach einer Inkubation der Suspensionskultur auf Eis für 15 min erfolgte dann die Abzentrifugation des Mediums bei 2000g und 4°C für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde wieder 15 min unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung, sowie 400  $\mu$ l Glycerin (1/100), als Gefrierschutz, aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 100  $\mu$ l Aliquots hergestellt und diese bei -80 °C eingefroren, wo die Lagerung für circa ein halbes Jahr erfolgt.

#### Transformation

Nach Zugabe von 1-5 ng Plasmid-DNA oder eines gesamten Ligationsansatzes zu einem 100 $\mu$ l Aliquot kompetentgemachter DH5 $\alpha$ , wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert, wobei es hier schon zur Anlagerung von DNA-Molekülen an die Bakterienzellen kommt. Anschließend wurde der Ansatz einer Hitzeschockbehandlung, welche entweder bei 37 °C für 5 min oder bei 42 °C für 1 min erfolgte, unterzogen. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis wurde dem Ansatz 150  $\mu$ l 2YT-Medium zugesetzt und dieser dann für 45 min bei 37 °C bei 230 rpm inkubiert. In dieser Inkubationszeit wird den Bakterien Zeit gegeben, um ihre Antibiotika-Resistenz auszubilden. Zur Selektion der positivtransformierten Bakterien, wurde

folgend der Ansatz auf Agarplatten mit entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag konnten die gewachsenen Klone gepickt und eine Suspensionskultur angefertigt werden, die wiederum über Nacht bei 37°C und 230 rpm inkubierte. Anschließend wurde die DNA isoliert und die Transformation mittels Sequenzierung (4.4.8), PCR (4.4.2) oder Restriktion (4.4.6) kontrolliert. Bei positiven Klonen erfolgte das Anlegen einer Glycerinkultur (4.1.2).

## 4.2 Kultivierung und Stammhaltung von eukaryotischen Zellen

Die hier verwendete nicht adhärenzte B-Zelllinie 721.221-Cw4 wurde von Prof. Dr. Antonio Siccardi, Department of Biology and Genetics, University of Milan, Italy zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung dieser Zelllinie erfolgte in Zellkulturflaschen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank. Als Medium wurde RPMI verwendet welches wie folgt supplimentiert wurde:

### *Medium für B-Zelllinie 721.221 Cw-4*

260 ml RPMI-Medium  
6 ml Glutamin  
3 ml Penicillin/Streptavidin  
3 ml HEPES  
10% FKS (fötale Kälberserum)  
1,8 ml G418 (Genteticin)  
0,9 ml Hig B (Hygromycin B)

Das nicht-supplimentierte Medium, sowie die PBS-Lösung wurden vor Beginn der Arbeit im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Arbeiten in der Zellkultur erfolgte stets steril unter dem Abzug.

### 4.2.1 Das Auftauen der gefrorenen Zellen

Das Auftauen der eingefrorenen Zellen wurde zügig im Wasserbad bei 37°C durchgeführt. Danach wurden die Zellen in ein Falcontube mit 3 ml vorgewärmten Medium überführt und 4min bei 1300 rpm und RT abzentrifugiert, so dass das Einfriermedium, welches das für eukaryontische Zellen toxisch wirkende DMSO enthielt von den Zellen abgetrennt wurde. Nach einem Waschschriff des Pellets mit 1x PBS wurde dieses in 5ml supplimentiertes RPMI-Medium aufgenommen und in eine kleine Kulturflasche, in welche 5ml RPMI-Medium vorgelegt wurde, überführt. Die Anzucht erfolgte wie unter 4.3 angegeben im Brutschrank.

### 4.2.2 Passagieren von Zellen

Nach Erreichen einer 100%-igen Konfluenz der Suspensionskultur, wurden die Zellen für das Passagieren von der Kulturflasche in Falcontubes überführt und bei 37°C für 4 min und 1300 rpm abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und wieder abzentrifugiert. Nach Aufnahme der Zellen in frisches Medium konnten diese dann in entsprechender Verdünnung in neuen Kulturflaschen angezogen werden. Das Passagieren erfolgte aller 2-3 Tage in Abhängigkeit der Konfluenz.

### 4.2.3 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Als Einfriermedium wurde FKS mit 10% DMSO verwendet. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen bei 37°C, 4min und 1300 rpm abzentrifugiert und mit 1x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in FKS aufgenommen und tropfenweise DMSO, welches eine Porösität der Zellen hervorruft und so Kristallbildung beim Einfrieren vermeidet, hinzugefügt. 1,4 ml der Suspension wurden in ein Kryotube überführt und mittels Stratacooler im -80°C-Kühlschrank herunterkühlen. Anschließend erfolgte eine Überführung in einen Stickstofftank in dem die kryokonservierten Zellen mehrere Jahre lagern können.

#### 4.2.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurde das Medium einer herangezogenen Zellkultur abzentrifugiert und die Zellkultur mehrmals mit 1x PBS gewaschen. Anschließend konnte das Zellpellet in 1ml IPA-Puffer aufgenommen werden, welches Complete als Proteasehemmer-Cocktail enthielt.

Die Zellsuspension wurde für 1h bei 4°C und 16000 x g abzentrifugiert, um eine exakte Trennung der Proteine von den Zellrückständen zu gewährleisten. Der Überstand konnte dann abgenommen und aliquotiert werden, wobei die Lagerung des Gesamtzellextrakt bei -80°C erfolgte.

***IPA-Puffer = pull down-Puffer***

10 mM	Tris pH 7,4
150 mM	NaCl
1 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	CaCl <sub>2</sub>
0,2%	Triton x 100
1 x	Complete

### 4.3 Arbeiten mit DNA

#### 4.3.1 Plasmid-Mini-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mittels Plasmid-Mini-Präparation. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der alkalischen Extraktion von DNA (Birboim und Doly 1979; Birboim, 1983). Dabei werden Bakterienzellen durch Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgeschlossen (Lösung 1), wobei durch Zugabe von NaOH (Lösung 2) alle Proteine denaturiert werden. Im nachfolgenden Schritt wird die Plasmid-DNA in einer Neutralisationsreaktion (Lösung 3) renaturiert. Die chromosomale DNA wird wegen ihrer enormen Größe dabei nicht renaturiert und bleibt weiterhin ausgefällt.

In dieser Arbeit wurde das Bio 101 Systems Miniprep Express Matrix Kit benutzt und dazu das vom Hersteller (Qiagen) bereitgestellte Protokoll verwendet, wobei die Aufreinigung der DNA über eine Matrix durchgeführt wurde. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von Elutionspuffer und anschließender Abzentrifugation der DNA von der Matrix. Die im Elutionspuffer enthaltene DNA wurde folgend in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und es wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

<b><i>Lösung 1</i></b>	150 mM Glucose 250 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0
<b><i>Lösung 2</i></b>	0,2 M NaOH 1 % SDS
<b><i>Lösung 3</i></b>	60 ml 5 M KAc, pH 5,5 11,5 ml Eisessig 28,5 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

### 4.3.2 PCR

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ermöglicht es, durch ihren zyklischen Ablauf (Tab.4.1) definierte DNA-Bereiche *in vitro* zu amplifizieren (Mullis *et al.*, 1986). Anhand von zwei Primern, zwei gegenläufigen Oligonukleotiden, die eine Homologie zum rechten und linken Ende des Zielabschnittes der DNA (*template*) aufweisen, wird der zu vervielfältigende Teil festgelegt. Nach einem Denaturierungsschritt der DNA bei 94°C, in der 2 einzelsträngige DNA-Matrizen entstehen, können sich die Primer im Folgenden bei der Hybridisierungsreaktion (*annealing*) an die DNA-Matrizen anlagern. Dabei variiert die Annealingtemperatur in Abhängigkeit der eingesetzten Primer im Bereich von 50-70°C. Anschließend kommt es bei einer Arbeitstemperatur von 72°C durch die hitzestabile DNA-Polymerase des *Thermus aquaticus* zu einer Kettenverlängerung (*elongation*) beginnend bei den eingesetzten Primern durch Anlagerung von dNTPs. Somit kommt es pro Zyklus zu je einer Verdopplung eines Templatestrangs und so auch zu einer exponentiellen Amplifikation des Zielabschnittes.

<b>PCR-Ansatz</b>	
1-5 µg	Template-DNA
2 µl	10 x PCR-Puffer
1,25 µl	MgCl <sub>2</sub>
1 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1 µl	Primer 1
1 µl	Primer 2
0,3 l	Taq-Polymerase (5U/µl)
add. µl H <sub>2</sub> O → Σ 30µl	

**Tab.4.1: Temperatur und Zeitprofil der PCR**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
1. Denaturierung	94 °C	10 min	} x 34
2. Denaturierung	94°C	1 min	
3. Primeranlagerung	50-70°C	1 min	
4. Primerverlängerung	72°C	2 min	
5. Pause	72 °C	5 min	
6. ∞	4°C	∞	

Die Aufreinigung des amplifizierten DNA-Abschnitts erfolgte durch Auftrennung des PCR-Ansatzes mittels Gelelektrophorese(4.4.4) und Isolation mit Hilfe des Qiaquick Extraction Kits bzw. Invisorb<sup>®</sup> Spin DNA Extraction Kits (4.4.5).

## Gradienten-PCR

Um die optimale Anlagerungstemperatur der in einer PCR eingesetzten Primer zu bestimmen, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt, bei der die Anlagerungstemperaturen steigend um eine bestimmte Gradzahl zunahm. Bei einer Temperaturspanne von 55-65°C entstand dabei folgender Gradient: 55,2°C > 55,8°C > 56,7°C > 57,8°C > 59,1°C > 60,4 °C > 60,7°C > 62,9 °C > 63,9°C > 64,6 °C > 64,9°C. Nach der PCR wurden die Ansätze mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromid sichtbar gemachten Banden in ihrer Intensität verglichen. Die Anlagerungstemperatur bei der die intensivste Bande zu sehen war, war somit auch die optimale Arbeits-Temperatur der 2 Primer.

### 4.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Anhand von photometrischen Messungen kann die Konzentration sowie die Reinheit von DNA (4.1.2) bestimmt werden. Dabei wird das Absorptionsmaximum der DNA-Probe einmal bei 260 nm für die Ermittlung der DNA-Absorption, und zur Bestimmung der Reinheit bei 280 nm für die Ermittlung der Protein-Absorption, gemessen. Bei einem Koeffizient dieser beiden Wellenlängen von 1,8 kann die DNA-Probe als rein bezeichnet werden. Als Leerwert (*blank*) wurde Elutions-Puffer eingesetzt.

### 4.3.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese gehört zu den Standardmethoden in der DNA-Analyse. Unter Einsatz von elektrischer Spannung kommt es dabei zur größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem dreidimensionalen engmaschiges Netz, welche aus Agarose, zusammengesetzt aus D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose, besteht ((Reisfeld *et al.*, 1962; Ornstein, 1964)).

Im dieser Matrix wandert die durch das Zucker-Phosphat-Rückgrat negativ geladene DNA im elektrischen Feld von Katode zu Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen DNA-Fragmente von deren Molekulargewicht und von der Trenngröße des Gels, welche durch die Agarosegelkonzentration beeinflusst wird, abhängt. Je größer das Fragment ist, desto langsamer läuft es im Gel. Anhand eines mitlaufenden Längenstandards, hier O`Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (siehe Anhang), kann durch die umgekehrte Proportionalität zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und der Mobilität der Fragmente im Agarosegel die Größe des DNA-Fragments bestimmt werden. Die hier verwendete Spannung variierte je nach Gelgröße zwischen 80 und 120V. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer genutzt. Zum Beschweren der DNA wurde diese vor der Elektrophorese mit Orange G versetzt, weiterhin konnte so auch die Lauffront sichtbar gemacht werden. Durch Inkubation des Gels nach der Elektrophorese in einem Ethidiumbromidbad konnten die DNA-Banden unter UV-Bestrahlung mittels BioRad GelDoc 2000 sichtbar und somit dokumentiert werden. Da Ethidiumbromid zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert, bewirkt eine Anregung mit UV-Licht die Fluoreszenz der DNA im Gel.

<b>Orange G (6-fach konzentriert)</b>	0,25 % Orange G 30% Glycerin
<b>Ethidiumbromidbad</b>	50µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) add. 1l H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

### 4.3.5 Gelextraktion

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit bzw. das Invisorb<sup>®</sup> Spin DNA Extraction Kit eingesetzt. Nach dem Ausschneiden der Gelstücke wurden diese durch Pufferzugabe bei 50°C verflüssigt und folgend die DNA mit Isopropanol ausgefällt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte über Säule, nach Angaben des Herstellers. Danach wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (4.4.3) und für weitere Experimente eingesetzt.

### 4.3.6 Restriktion

Als Restriktion wird der Verdau von DNA-Molekülen unter Einsatz von Restriktionsenzymen bezeichnet, die zur Gruppe der Endonukleasen gehören. Hierbei werden die Restriktionsenzyme der Klasse 2 eingesetzt, die einen palindromen Sequenzbereich besitzen, der 4-8 Basenpaare umfasst. Sie erkennen spezifische Basensequenzen der DNA, an denen durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung des DNA-Doppelstrangs dieser aufgespalten wird, wobei es zu einer Linearisierung der DNA kommt. Bei dieser Spaltung entstehen entweder glatte (*blunt*) oder klebrige (*sticky*) Enden. Im Rahmen von Klonierungsexperimenten werden Vektor und Insert oft gleichzeitig mit 2 Restriktionsenzymen geschnitten. Weiterhin findet die Restriktion ihren Einsatz als Kontrolle von Klonierungen.

Der Restriktionsansatz wurde, wie im folgenden Pipettierschema zu sehen, zusammenpipettiert, wobei darauf zu achten war, dass die vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Puffer verwendet wurden.

<b><i>Standard-Restriktionsansatz</i></b>	
1 – 5 µg	DNA
0,5 µl	Restriktionsenzym 1
0,5 µl	Restriktionsenzym 2
3 µl	Puffer
<u>3 µl</u>	<u>BSA</u>
add. µl H <sub>2</sub> O -->Σ 30 µl	

Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C. Nach der Restriktion wurden die geschnittene DNA mittels gelelektrophoretischer Auftrennung (4.4.4) und anschließender Gelextraktion mit dem QIAquick Extraction Kit bzw. Invisorb<sup>®</sup> Spin DNA Extraction Kits (4.4.5) isoliert.



### 4.3.7 Ligation

Durch Ligation können die mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen DNA-Inserts und Vektoren verbunden werden. Dafür wurde die T4-Ligase eingesetzt, welche die ATP-abhängige Ausbildung von 3', 5'-Phosphordieesterbindungen zwischen zwei DNA-Ketten katalysiert. Diese Ligase, die von T4-Phagen synthetisiert wird, ist befähigt, klebrige, sowie glatte Enden miteinander zu verbinden. Grundsätzlich sollte das Insert im Ligationsansatz in 3fachen Überschuss zu dem Vektor vorliegen. Der folgende Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Zur Kontrolle einer Religation wurde weiterhin ein Ansatz ohne Insert mitgeführt.

<i>Ligationsansatz</i>	
15 µl	Insert
5 µl	Vektor
0,5 µl	T4-Puffer
3 µl	T4-Ligase
add. µl H <sub>2</sub> O --> Σ 30 µl	

### 4.3.8 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung dient zur Aufklärung der Nukleotid-Sequenz eines unbekanntes DNA-Abschnittes. Durch Anlagerung eines Primers an diesen DNA-Abschnitt kann sich folgend durch Einbau von Nukleotiden eine Kette aufbauen, dabei werden Nukleotide mit und ohne Hydroxygruppe verwendet. Durch den zufälligen Einbau eines Nukleotides ohne Hydroxygruppe kommt es zum vorzeitigen Abbruch der Kette (Sanger *et al.*, 1977). Dieses Prinzip beruht auf der so genannten Sanger-Reaktion und ist genauso zyklisch aufgebaut wie die unter 4.4.2 beschriebene PCR.

In dieser Arbeit wurde das Big Dye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit eingesetzt, welches das Vorhandensein von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ausnutzt mit denen die unterschiedlichen Nukleotide ausgestattet sind. Nach der Sequenzierung wurde die Fluoreszenz mittels Kapillarelektrophorese vom hauseigenen Labor analysiert und dann über Laser Gene SeqMan ausgewertet.

<i>Sequenzierungsansatz</i>	
1 µl	DNA
0,5 µl	Primer
2 µl	Big Dye reactions mix 3.1
1 µl	5x ABI-Puffer
add. 10 µl H <sub>2</sub> O	

**Tab.4.2: Temperatur-und Zeitprofil der Sequenzierungsreaktion**

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
1. Aufheizen	96 °C	2 min	} x 25
2. Denaturierung	96°C	10 sec	
3. Primeranlagerung	50°C	5 sec	
4. Primerverlängerung	60 °C	4 min	
5. ∞	4°C	∞	



## 4.4 Arbeiten mit Proteinen

### 4.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Dieses Trennverfahren ist eine grundlegende Methode der Biochemie bei der Proteine bzw. Proteinextrakte anhand ihres Molekulargewichts in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgrund eines elektrischen Gleichspannungsfeldes aufgetrennt werden. Hierbei wird ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet, welches auf die Methode von Laemmli zurückgeht (Laemmli 1970).

Dabei spielt das anionische Detergens SDS eine wichtige Rolle, welches bei der Bindung an hydrophobe Teile der Proteine deren Eigenladung überdeckt und somit alle Proteine eine gleichstarke negative Ladung aufweisen. Dadurch wandern die Proteine ladungsunabhängig aber molekulargewichts-abhängig unterschiedlich schnell im Gel, wobei schwere Proteine eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen als leichtere. Eine weitere wichtige Chemikalie bei der SDS-PAGE ist das Mecaptoethanol, welches neben SDS im Probenpuffer enthalten, eine denaturierende Wirkung auf Proteine hat, in dem es die vorhandenen Disulfidbrücken zerstört, und somit auch die Tertiärstruktur.

Das verwendete Gel besteht aus einem Sammelgel (2cm x 8,5 cm), in dem die aufgetragenen Proben auf eine schmale Bande konzentriert werden, und aus einem Trenngel (5,5 cm x 8,5 cm) in dem es zur molekulargewichtsabhängigen Auftrennung der Proteine kommt. Als Trägermatrix wird bei dieser Methode Polyacrylamid verwendet, welches durch Polymerisation aus Acrylamid und N, N'-Methylenbisacrylamid entsteht.

Die SDS-PAGE wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe einer vertikalen Gelelektrophoresekammer der Firma Biorad durchgeführt. Dabei wurde als Reaktionsbeschleuniger für die Auspolymerisation der Gele TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin) und Ammoniumpersulfat (APS) eingesetzt. Weiterhin konnte durch Variation der Acrylamid-Konzentration (10%, 12%) die Porengröße und somit die Trennleistung des Trenngels beeinflusst werden. Die Konzentration von Polyacrylamid im Sammelgel war 5%. In der folgenden Tabelle ist das Pipettierschema zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel nach Laemmli zu sehen.

**Tab.4.3: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel (für 5-6 Gele)**

<i>Komponenten</i>	<i>Sammelgel 5%</i>	<i>Trenngel 10%</i>	<i>Trenngel 12%</i>
H <sub>2</sub> O	7ml	3,7ml	2,2ml
30%AA/0,8%BisAA	1,67ml	7,5ml	9ml
1,5 M Tris pH 8,8	-	11,2ml	11,2ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,25ml	-	-
20 % SDS	50µl	113µl	113µl
APS	50µl	158µl	158µl
TEMED	10µl	13µl	13µl

Die hergestellte Trenngellösung wurde zwischen zwei saubere Glasplatten gegossen, die seitlich 2 Spacer (1mm bzw. 1,5 mm) einschlossen, und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Auspolymerisation des Trenngels wurde das restliche Isopropanol abgewaschen und die Sammelgellösung aufgetragen, in die der

Kamm (10 bzw. 15 Taschen) direkt eingeführt wurde. Das fertige SDS-Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese vollständig mit Laufpuffer befüllt.

Um die Denaturierung der Proteine zu unterstützen, wurden die Proben in SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 10 min bei 95°C abgekocht, danach 5 min zentrifugiert und in die vorbereiteten Taschen des Gels aufgetragen. Zum Beschweren der Probe im Gel enthält der Probenpuffer Glycerin. Das Auftragevolumen der Proben variierte in Abhängigkeit von den Taschengrößen, sowie Dicke der Spacer zwischen 10 und 40 µl. Als Größenstandard wurden 6 µl des PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas (siehe Anhang) verwendet. Die eingesetzte Spannung hatte eine Voltzahl zwischen 100 und 180 V. Sobald die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Das Gel konnte anschließend in Western Blot-Analysen eingesetzt oder mit Coomassie (4.5.2) oder Silberlösung angefärbt werden.

<b>1 x Laufpuffer</b>	200 ml 10 x Laufpuffer (3.7) 10 ml 20 % SDS Add. 2 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>2x Probenpuffer</b>	1000 µl 4 x PP (3.7) 900 µl H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 100 µl β-Mecaptoethanol

#### 4.5.2 Coomassie-Färbung

Nach der Elektrophorese können die Proteinbanden mittels einer Coomassie-Färbelösung angefärbt werden. Dabei wurde das Gel 10 min mit der Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert und danach zur Reduzierung der Hintergrundanfärbung mehrmals mit Entfärberlösung I 30 min und danach einmal mit Entfärber II für 30 min geschüttelt. Nach dem Färben kann das Gel mittels Gel-Dry™ Drying Solution getrocknet und zwischen 2 Folien fixiert werden.

<b>Entfärber I</b>	100 ml Essigsäure 450 ml Methanol 450 ml H <sub>2</sub> O
<b>Entfärber II</b>	100 ml Essigsäure 100 ml Methanol 1800 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

### 4.5.3 Western Blotting

Bei der Methode des Blottens werden Proteine von einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran (Kyshe-Anderson, 1984; Towbin *et al.*, 1989) überführt und danach einer für das Protein spezifischen Nachweisreaktion unterzogen. Im hier angewendeten „*semi-dry*“-Blotverfahren (Gültekin und Heermann, 1988) mittels Trans-Blot SD® Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München, Deutschland) wurde die PVDF-Membran für 30 sec in 100% Methanol und anschließend in Blotpuffer 2 gelegt. Weiterhin wurden 2 Blotpapiere in Blotpuffer 1, 1 Blotpapier in Blotpuffer 2 und 1 Blotpapier in Blotpuffer 3 äquilibriert. Als Blotpapier wurde Whatmanpapier eingesetzt. Die Schichtung des Blots erfolgte zwischen einer Graphitkatode und einer Graphitanode einer *semi-dry*-Kammer von Biorad geschichtet wurde. Die Stromstärke betrug  $1\text{mA}/\text{cm}^2$  und wurde konstant für 1 h angelegt. Nach dem Blotten wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der PVDF-Membran für 30min in einer 5% Milchpulverlösung bei RT oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  abgeblockt. Anschließend wurden die über Sepharose-*beads* immobilisierten Proteine auf der Membran mit einem spezifischen Primäantikörper (Konzentration siehe 3.1) für 1h bei RT rotierend in 3ml 5%iger Milchpulverlösung in Folie eingeschweißt, inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen für 5 Minuten im Waschpuffer wurde der Zweitantikörper (Konzentration siehe 3.1) auf die Membran gegeben, welche an eine Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden ist. Die Inkubation erfolgte für 30min unter den gleichen Bedingungen wie bei dem Primäantikörper. Zur Detektion der Immunreaktion diente ein Chemilumineszenz-Substrat des ECL TM Western Blotting Detection Systems der Firma Ge Healthcare. Nach Waschen der Membran wurde diese mit der ECL-Lösung für 30 sec inkubiert und anschließend leicht getrocknet. Nach Auflegen eines CL-Xposure™ Clear Blue X-Ray Autoradiografie-Films auf die PVDF-Membran in einer Röntgenkassette (Kodak) konnte der Blot in der Entwicklermaschine Curix60 entwickelt werden. Die Expositionszeit betrug zwischen 10 sec bis zu 10 min. Die mit Comassie angefärbte PVDF-Membran, sowie die entwickelten Western Blot-Filme wurden dann mittels GelDoc2000 (BioRad) abfotografiert bzw. eingescannt.

<b>5%ige Milchpulverlösung</b>		1 x PBS 1% Tween 5% Magermilchpulver
<b>Waschpuffer</b>	<b>PBS-T</b>	100 ml 10 x PBS 1% Tween 900 ml H <sub>2</sub> O
	<b>oder TBS-T</b>	100mM Tris (pH 7,4) 150 mM KCl 0,1 % Tween 20
<b>Blotpuffer 1</b>		200 ml Methanol 36,05 g Tris Add. 1l H <sub>2</sub> O
<b>Blotpuffer 2</b>		200 ml Methanol 3,025 g Tris Add. 1 l H <sub>2</sub> O
<b>Blotpuffer 3</b>		200 ml Methanol 3,025 g Tris Add 1l H <sub>2</sub> O 5,24 g 6-Aminohexansäure

---

#### 4.5.4 DAB-Färbung

Als weitere Deletionsmethode kann die DAB (Diaminobenzidin)-Färbung eingesetzt werden, da das Protein auf der PVDF-Membran mit einem Sekundärantikörper markiert ist, welcher an Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden ist. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid bildet dieser mit der Meerrettichperoxidase einen Komplex, wobei DAB als elektronenspendendes Chromogen fungiert.

Die gewaschene Membran wurde 10min in 25mM TrisHCl (pH 8,2) gewaschen und anschließend mit 20 ml der 25 mM TrisHCl-Lösung und 50µl 30%igem Wasserstoffperoxid sowie einer Spatelspitze DAB versetzt. Nach Sichtbarwerden der Banden, wurde die Reaktion durch Waschen der PVDF-Membran mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gestoppt. Nach Trocknung der Membran konnte diese mit der GelDoc2000 (BioRad) abfotografiert bzw. eingescannt werden.

#### 4.5.5 Immunpräzipitation

Die Koimmunpräzipitation, welche hier zu Interaktionsstudien herangezogen wurde, dient der Isolation eines Antigens durch Bildung eines Immunkomplexes mit seinem spezifischen Antikörper, der an eine sedimentierbare Matrix gekoppelt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Matrix *Dynabeads*® Protein G der Firma Invitrogen verwendet, wobei Protein G mit der Fc-Region des IgG eine Bindung eingeht.

10 µl *Dynabeads* (250µg Ab/ml *Dynabeads*) wurden mit 2,5 µg eines spezifischen Antikörpers bei 4°C für 1h im Überkopfschüttler vorinkubiert. Nach gründlichem Waschen der *Dynabeads* erfolgte die Kopplung des Proteins an den Antikörperkomplex unter gleichen Inkubationsbedingungen. Die *beads* wurden wieder gewaschen und mit einem Zellysate oder einem aufgereinigten Fusionsprotein 1h bei 4°C inkubiert, welches einen möglichen Interaktionspartner enthielt. Nach anschließendem Waschen der *beads* und Aufnahme dieser in 25 µl 2x SDS-Probenpuffer erfolgte das Abkochen bei 96°C für 10 min. Danach wurde abzentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Folgend konnte die Interaktion mittels Western Blot analysiert werden. Dabei wurde als Primärantikörper ein für den Interaktionspartner spezifischer Antikörper verwendet. Als Sekundärantikörper wurde wieder ein mit HRP gekoppelter Antikörper benutzt.

### 4.5.6 GST-pull down - Interaktionsanalyse

Für Protein-Protein-Interaktionen können neben der Koimmunopräzipitation auch GST-pull down Experimente eingesetzt werden (Guan und Dixon, 1991). Dabei handelt es sich um eine *in vitro*-Bindungsanalyse. Bei dieser Methode bindet ein Fusionsprotein mit einem Gluthathion-Sepharose-Transferase(GST)-Tag an eine Matrix aus Glutathion-Sepharose *beads* und wird somit fixiert. Durch Zugabe eines Zellysates mit dem möglichen Interaktionsprotein kann es zu einer Interaktion der beiden Proteine kommen, welche dann anhand eines Western Blots detektiert werden kann. Bei allen verwendeten Puffern wurde 1 x Complete als Proteasehemmer-Cocktail hinzugegeben.

#### 4.5.6.1 Expression der GST- Fusionsproteine

Die Überexpression von GST-Fusionproteinen erfolgte im Bakterienstamm BL21. Dafür wurden pGex-Vektoren verwendet, die einen *tac*-Promotor enthielten, der wiederum durch Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert wurde. IPTG ist ein Strukturanalogon des natürlichen Induktors Allolaktose und bindet an den *lac*-Repressor, was zu dessen Inaktivierung führt, so dass die Transkription des Fusionsproteingens erfolgen kann.

Für die Überexpression eines Fusionsproteins wurden 10 ml LB-Amp-Medium mit dem entsprechenden Bakterienstamm BL21 angeimpft und über Nacht angezogen. Am darauf folgenden Tag wurden 500ml LB-Amp-Medium mit 5ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einem OD von 0,5 herangezogen. Danach wurde die Kultur mit den vorher bestimmten Induktionsbedingungen, welche in eingesetzter IPTG-Menge, Temperatur und Zeit variierten, inkubiert. Die Bestimmung der Induktionsbedingungen erfolgte vorab in unserer Arbeitsgruppe (Diplomarbeit Kati Scharf, 2008). Nach der Induktion wurde die Suspension in einer Beckman-Zentrifuge für 15min bei 4°C und 8000rpm abzentrifugiert. Die Lagerung des Pellets erfolgte bei -80°C, sofern nicht sofort aufgeschlossen wurde.

#### 4.5.6.2 Aufarbeitung des Bakterienpellets

Das gewonnene Bakterienpellet wurde entweder direkt nach der Induktion oder nach Lagerung bei -80°C in Fusionspuffer aufgenommen (Tab.4.4). Die Suspension wurde dann in flüssigen Stickstoff schockgefrostet und wieder aufgetaut um einen besseren Zellaufschluss zu gewährleisten. Danach erfolgte die Ultraschall-Lyse, bei der die Suspension 4 x à 10s, einschließlich 30s Pause behandelt wurde. Das Baktierienlysate wurde folgend 30min mit 1% Triton X100 inkubiert, 1h bei 4°C abzentrifugiert und dann in 500 $\mu$ l Aliquots bei -80°C gelagert. Weiterhin wurde zur Aufarbeitung des Baktierienpellets das B-Per GST Fusion Protein Spin Purification Kit (Pierce) verwendet, um die Fusionsproteine von dem Zellysate zu isolieren. Das Protokoll wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt, wobei hier das chemische Aufschlussverfahren der Bakterien eingesetzt wurde, bei dem die Aufreinigung der Fusionsproteine über immobilisierte Gluthathione erfolgte.

Tab4.4: Eingesetzte Fusionspuffer, zur Optimierung des GST-pull downs:

<i>Fusionspuffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
<i>TIF-Puffer</i>	20 mM Tris pH8,0 150 mM NaCl 1mM MgCl <sub>2</sub> 0,1% NP-40 10% Glycerin
<i>NETN-20-Puffer</i>	20 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM KCl 1 mM EDTA 0,52% NP-40
<i>NETN-25-Puffer</i>	25 mM Tris/HCl pH 7,5 100 mM NaCl 0,2 mM EDTA 0,2% NP-40 0,1% DTT 1 µg / ml BSA
<i>NETN-50-Puffer</i>	50 mM Tris/HCl pH 8,0 120 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5% NP-40
<i>NETN Me-Puffer</i>	20 mM Tris pH 7,5-8,0 150 mM NaCl 1 mM β-Mecaptoethanol 3 mM EDTA 1 % NP-40
<i>SET-Puffer</i>	10 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 % NP-40
<i>TEN10-Puffer</i>	20 mM Tris pH 7,0 100 mM NaCl 0,1 mM EDTA
<i>HEPES-Puffer</i>	20 mM HEPES KOH pH 7,0 150 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,15 % NP-40 10 mM DTT
<i>1 x PBS + 1% Triton</i>	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH auf 7,4 einstellen 1% Triton



#### 4.5.6.3 Kopplung der GST-Fusionsproteine mit den Gluthathion Sepharose™ B4 –beads

Die Aufreinigung zum Einsatz der GST-Fusionsproteine erfolgte über durch eine Kopplung an GST-Sepharose-beads B4. Davor musste aber erst die Konzentration der GST-Fusionsproteine in den Bakterienlysaten bestimmt werden, um einen optimalen *pull down* zu gewährleisten. Dabei wurden 40µl einer nach Hersteller-Angaben aufbereiteten 25%igen Sepharose-bead-slurry mit 25µl, 50µl und 100µl des aufgearbeiteten Bakterienlysats (4.5.6.2), welches ein bestimmtes Fusionsprotein enthielt, für 1,5h bei 4°C inkubiert. Als Fusionspuffer (4.5.6.2) wurde dabei der Puffer verwendet, in dem das Bakterienpellet nach der Induktion aufgenommen wurde. Nach der Inkubation wurden die Sepharose-beads 4x mit dem entsprechenden Fusionspuffer gewaschen, wobei darauf zu achten war, dass das Abzentrifugieren des Puffers im unterem rpm-Bereich (~ 8000rpm) bei 30s ablief. Danach wurden die Sepharose-beads in 50µl 2x SDS-Probepuffer aufgenommen und für 10min bei 95°C abgekocht. Nach Abzentrifugation der Sepharose-beads für 5min bei voller Umdrehung wurde 1/5 des Überstandes auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Zum Vergleich lief BSA in den 3 unterschiedlichen Konzentrationen 300, 600 und 1200 ng mit. Nach der anschließenden Färbung des Gels mit Coomassie konnte die Konzentration der Fusionsproteine im Bakterienlysate durch Abgleich mit den BSA-Konzentrationen abgeschätzt werden.

#### 4.5.6.4 Inkubation mit Zellextrakten

Für den Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion wurden 10 µg des Fusionsproteins mit 40µl der 25%igen Sepharose-bead-slurry für 1½h bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Das Endvolumen der Reaktionslösung betrug 500 µl, wobei, mit dem entsprechenden Fusionspuffer ausgefüllt wurde. Nach viermaligem Waschen mit dem entsprechenden Fusionspuffer (4.5.6.2) wurde ein Zellextrakt mit dem möglichen Interaktionsprotein zugegeben und auf 500µl mit *pull down*-Puffer aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für ½ bis 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler. Danach wurden die *beads* mehrmals gründlich mit dem *pull down*-Puffer (4.3.4) gewaschen und anschließend in 25 µl 2x SDS-Probepuffer aufgenommen. Die Proben wurden dann für 10 min bei 95°C abgekocht, für 5 min abzentrifugiert und der gesamte Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen. Mittels Western Blot konnte dann die mögliche Interaktion mittels spezifischer Antikörper für den Interaktionspartner detektiert werden.

#### 4.5.7 *pull down* mit Dynabeads

Als weitere *pull down*-Variante können *Dynabeads* eingesetzt werden, die eine Separation der *beads* mit und ohne Protein von den Fusions- bzw. *pull down*-Puffern durch Magnetismus vereinfachen. Dafür wurde zur Trennung ein Magnetständer eingesetzt. In dieser Arbeit wurden die *Dynabeads*® M-280 Streptavidin der Firma Dynal eingesetzt, wobei die *Dynabeads* mit Streptavidin kovalent gebunden sind. Zu Beginn wurden 300µl *Dynabeads* mehrmals mit PBS gewaschen und folgend in 100 µl PBS + 1% Triton X100 aufgenommen. Für die Inkubation wurden 20 µl *Dynabeads-slurry* mit 10 µg biotinyliertes Peptid, welches in Vorarbeit von der Arbeitsgruppe hergestellt wurde, aufgefüllt mit PBS + 1% Triton X100 bei einem Endvolumen von 500 µl für 30 min bei RT im Überkopfschüttler gekoppelt. Anschließend erfolgten ein Waschschriff mit PBS + 1% Triton X100 und zwei mit PBS + 0,1% Triton X100, worauf ein 2. Inkubationsschritt des *Dynabead*/Peptid-Komplexes mit aufgereinigtem Protein für 1h bei RT im Überkopfschüttler erfolgte. Dabei wurde die Lösung mit *pull down*-Puffer auf 500µl Endvolumen aufgefüllt. Nach mehrmaligem Waschen mit dem *pull down*-Puffer wurden die Proben bei 95°C für 10min abgekocht und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion erfolgte in einem Western Blot mittels spezifischen Antikörpern.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Potentielle Interaktionspartner von gp41

Der essentielle Schritt der Membranfusion im Replikationszyklus eines HI-Virions stellt einen wichtigen Punkt im Ansatz zur Entwicklung von präventiven Impfstoffen und retroviralen Therapien dar. Daher ist es wichtig den Mechanismus der Fusion zwischen Virion und Wirtszelle aufzuklären, um diese gezielt durch neutralisierende Antikörper zu inhibieren und eine Ausbreitung von HIV im Organismus zu unterbinden. Einen weiteren wichtigen Untersuchungspunkt stellt die Pathogenese dar, insbesondere die AIDS-auslösende Immunsuppression, bei der man davon ausgeht, dass dabei das transmembrane Hüllprotein gp41, welches eine wichtige Rolle spielt.

In einer *yeast two hybrid* Analyse, welche ich im Rahmen meiner Praxisarbeit zum Thema "Identifikation eines potentiellen Interaktionspartners des HIV-1 Transmembranproteins gp41" durchführte, wurde mit der gp41-Deletionsmutante  $\Delta$ rpg (Abb.5.1) mit einer humanen Leukozyten-Genbank aus  $3,5 \times 10^6$  unabhängigen Klonen nach potentiellen Interaktionspartnern gescreent. Das Prinzip des *yeast two hybrid systems* zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen, sowie ihrer Charakterisierung *in vivo* beruht auf der Rekonstitution eines funktionellen Transkriptionsfaktors im Zellkern von Hefen (Fields und Song, 1989; Chien *et al.*, 1991), wobei Protein A die eine Hälfte und der potentielle Interaktionspartner, Protein B, die 2. Hälfte enthält.

Von den 600 gepickten positiven Hefeklonen konnten 248 in einem  $\alpha$ -Gal-Test positiv getestet werden. Nach Sequenzierung der Klone wurden 64 noch einmal mit den Deletionsmutanten  $\Delta$ rpg und  $\Delta$ NHR, zur weiteren Eingrenzung des interagierenden Bereichs auf Seiten von gp41, in die Hefe *S. cerevisiae* AH109 retransformiert. Neben RABEP2, STAT6 oder LAMP1 wurde der Klon 231 mit der gp41-Deletionsmutante  $\Delta$ rpg detektiert, welcher als Protein-Abschnitt von HLA-C-Molekülen identifiziert wurde.

Parallel zu diesem Screen wurde ein weiterer nur mit der Deletionsmutanten  $\Delta$ NHR durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden anschließend aus beiden *screens* die Proteine HLA-C und TREM-1 für weitere Verifizierungsanalysen ausgewählt, da sie als mögliche Rezeptoren für gp41 auf Zelloberflächen agieren könnten.

Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Interaktion von gp41 mit den im *yeast two hybrid-Screen* detektierten potentiellen Interaktionspartnern HLA-C, und TREM-1 mittels *GST-pull down*-Analysen und Koimmunpräzipitationen zu verifizieren.

## Deletionsmutanten für gp41 für die Analyse

Die GST-gp41-Fusionsproteine für die Verifizierungsversuche waren von der AG Denner hergestellt worden. Dafür hatte man unterschiedliche gp41-Deletionsmutanten in den Vektor pGEX-KG einkloniert (Abb.5.1).

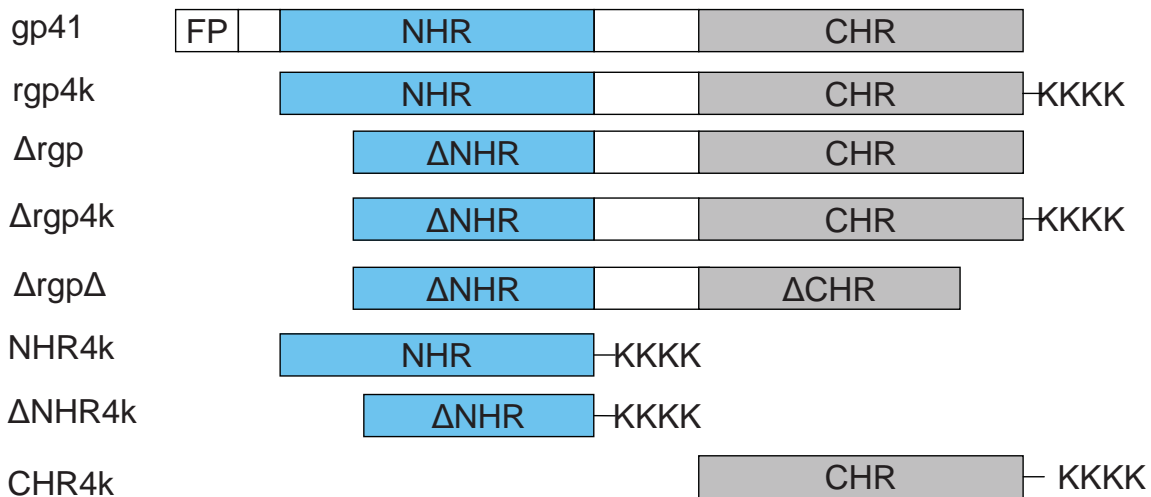


Abb.5.1: Schematische Darstellung der klonierten Verkürzungsmutanten der gp41 Ektodomäne

Nach Transformation der klonierten Fusionsprotein-Vektoren in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 wurden anschließend die optimalen Induktionsbedingungen wie Temperatur, IPTG-Menge sowie Induktionszeit der einzelnen Fusionsproteine bestimmt. Diese sind in Tabelle 5.2 zusammengestellt.

Tab.5.1: Induktionsbedingungen und Fragmentgrößen der GST-Deletionsmutanten

Deletionsmutanten	Fragmentgröße (kDa)	Induktionsbedingungen		
		Temperatur (°C)	Zeit (h)	IPTG-Menge (mM)
GST	26	4	3	0,1
NHR 4k	33,6	37	3	0,5
Δ NHR 4K	31,8	25	3	1
rgp 4k	44,3	4	3	0,1
GST-rgpΔ	38,1	15	ÜN	1
GST-ΔrgpΔ	36,3	15	ÜN	1
Δ rgp 4k	42,1	4	3	0,1
CHR 4k	35,7	25	3	0,1

## 5.2 Analyse der Interaktion von HLA-Cw4 und gp41-Deletionsmutanten mittels GST-pull down-Analysen

Für die Untersuchungen der gp41-HLA-Cw4 Interaktion stellte uns unser Kooperationspartner Dr. A. Siccardi das pZeoSV2(+) HLA-Cw4-Konstrukt zur Verfügung. In Abbildung 5.2 ist die Aminosäuresequenz sowie ein Vergleich der Vollängensequenz mit der Sequenz des isolierten Klons 231 dargestellt. Dies soll dazu dienen, dass der Interaktionsbereich im Molekül eingegrenzt werden soll.

### A HLA-Cw4 (Ektodomäne, 45 kDa)

```
MRVMAPRTLILLLSGALALTTETWAGSHSMRYFSTSVSWPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASPRGEPREPWEQE
GPEYWDRETQKYKRQAQADRVNLRKLRGYNQSEDSHTLQRMFGCDLGPDRLLRGYNQFAYDGKDYIALNEDLRSWT
AADTAAQITQRKWEAAAREAEQRRAYLEGTTCVEWLRRLRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEI
TLTWQWDGEDQTQDTELVEVTRPARDGTFQKWAAVVVPSEEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWKPSQPTIPIVGIVAGLA
V.
```

### B

```
HLA-Cw4 115      GSHTLQRMFGCDLGPDRLLRGYNQFAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAA
Klon 231 15      GSHTWQRMYGCDLGPDRLLRGYNQLAYDGKDYIA-NEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAA
                **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *
                **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *

HLA-Cw4 175      REAEQRRAYLEGTTCVEWLRRLRYLENGKETLQRA
Klon 231 74      REAEQLRAYLEGLCVEWLRRLRYLENGKETLQRA
                ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
```

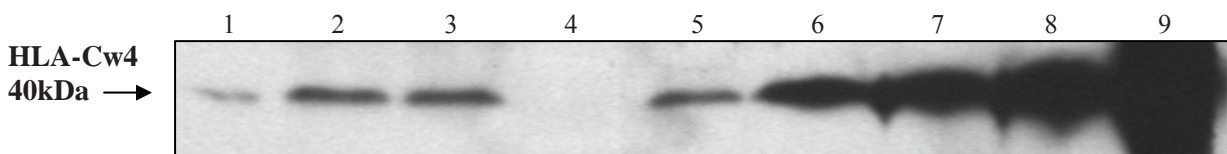
### Abb.5.2: Sequenzvergleich des isolierten Klons 231 mit der Vollängensequenz der Ektodomäne von HLA-Cw4

A: Aminosäuresequenz der HLA-Cw4-Ektodomäne ( $\alpha 2$ -Domäne) XM\_001717045

B Sequenzvergleich des 231 (XM\_001717045) mit der vollständigen Sequenz der Ektodomäne von HLA-Cw4 (Homologie zu 92,4% mit der  $\alpha 2$ -Domäne des Vollängenkonstruktes)

## Etablierung der GST-pull down Methode für HLA-Cw4

Für die GST-pull down Analyse wurde das Protein HLA-Cw4 aus der B-Zelllinie 271.221, die stabil Cw4 überexprimiert, gewonnen, welche uns von Prof. Dr. Antonio Siccardi (Department of Biology and Genetics, University of Milan, Italy), zur Verfügung gestellt wurde. Der erste GST-pull down-Versuch wurde nach Standard-Protokoll durchgeführt, bei dem als Fusionspuffer PBS + 1% Triton X100 eingesetzt wurde. Dabei erfolgte der 1. Inkubationsschritt zur Kopplung der Glutathion Sepharose TM 4B-beads mit 10  $\mu$ g des jeweiligen GST-Fusionsproteins GST-NHR4K, GST- $\Delta$ NHR4K, GST-CHR4K, GST- $\Delta$ rgp bzw. GST- $\Delta$ rgp für 1 ½ h bei 4°C. Danach wurden die Fusionsproteine für 2h mit 60 $\mu$ l B-Zellysat 271.221, welches circa 10  $\mu$ g HLA-Cw4 enthielt, in pull down-Puffer inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die beads allein sowie GST mit HLA-Cw4 inkubiert. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse zeigte unspezifische Bindungen des HLA-Cw4 mit den Negativkontrollen GST sowie mit den beads allein detektiert werden konnten, so dass die Pufferbedingungen geändert werden mussten (Abb.5.3).

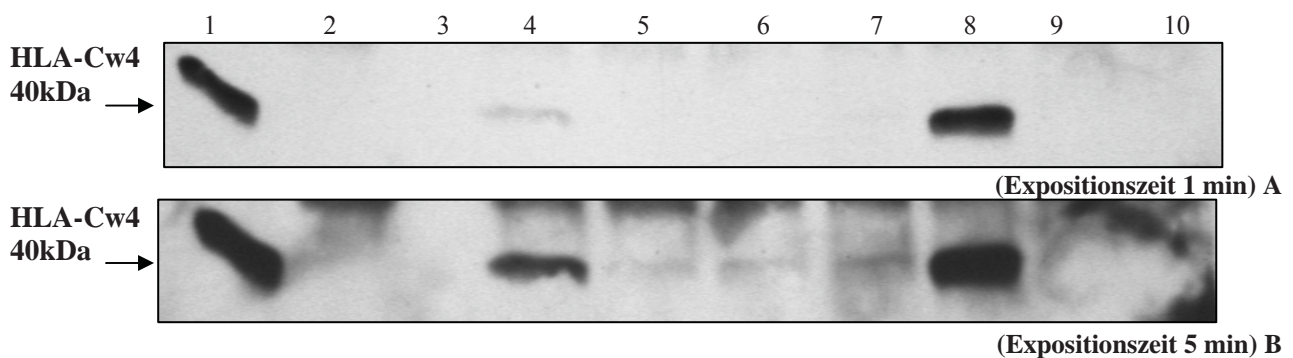


### Abb.5.3: Western Blot Ergebnisse der GST-pull down-Analyse

Ermittlung der Interaktion von gp41-Deletionsmutanten mit HLA-Cw4, Auftrennung der Proteine auf 10%igem SDS-Gel, Transfer auf eine PVDF-Membran, HLA-Cw4-Detektion mittels L31 (1:1000), Sekundärintikörper  $\alpha$ -mouse IgG/HRP (1:2000); **1:** beads + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **2:** GST-NHR 4K + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **3:** GST-  $\Delta$ NHR K + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **4:** Marker, **5:** GST -CHR 4K + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **6:** GST- $\Delta$ rgp + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **7:** GST $\Delta$ rgp $\Delta$  + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **8:** GST + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **9:** Positivkontrolle 4 $\mu$ g HLA-Cw4 (Expositionszeit 30s)

Um Konditionen zu finden, bei denen HLA-Cw4 nicht unspezifisch an die *beads* bindet, wurden anschließend 9 verschiedene Fusionspuffer (Tab.4.5) eingesetzt. Dafür wurden die Glutathion Sepharose™ 4B *beads* jeweils in den 9 Fusionspuffern für 1 ½ h bei 4°C vorinkubiert. Nach Waschen der *beads* erfolgte der 2. Inkubationsschritt, bei dem die *beads* mit 60µl HLA-Cw4-Zellysat in *pull down*-Puffer für 2 h bei 4°C inkubiert wurden.

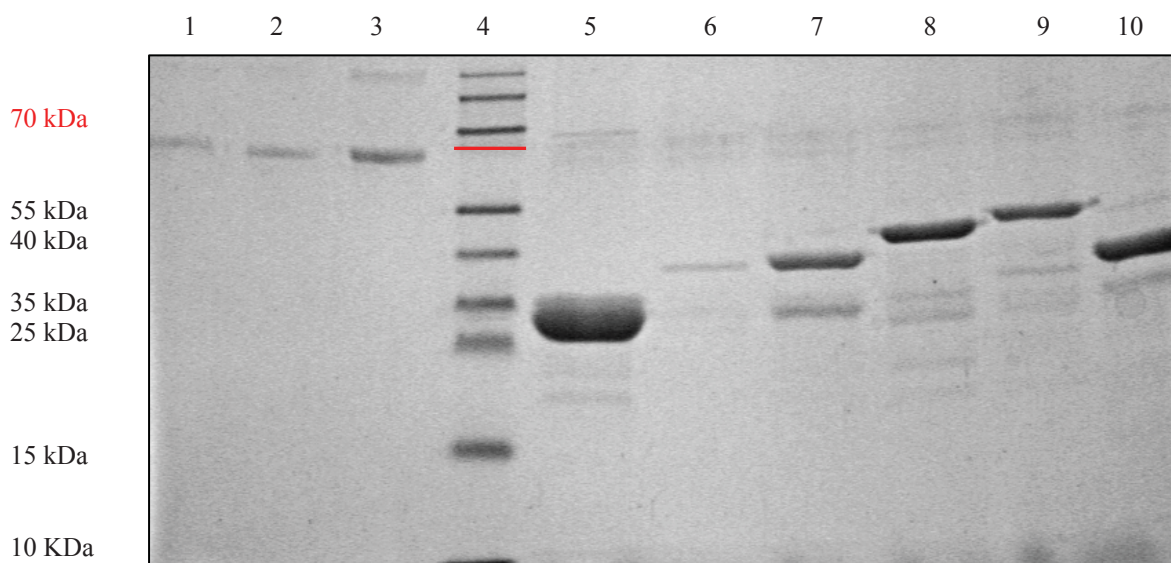
Die Western Blot-Analyse des Puffertests bei unterschiedlich langer Expositionszeit zeigt, dass neben dem TEN10-Puffer, wie zu erwarten der PBS Triton X100 Puffer unspezifische Bindungen bedingt. Neben dem NENT20-Puffer wurde auch bei dem TIF- sowie dem SET-Puffer keine unspezifische Bindung detektiert (Abb.5.4 A, B).



**Abb.5.4 A, B: Puffertest für GST-pull down mit HLA-Cw4**

Auftrennung der Proteine auf 10%igem SDS-Gel, Transfer auf eine PVDF-Membran, HLA-Cw4-Detektion mittels L31 (1:1000), Sekundärantikörper  $\alpha$ -mouse IgG/HRP (1:2000); **1:** PBS + 1% Triton, **2:** NETN20, **3:** Marker, **4:** NETN25, **5:** NETN50, **6:** NETNMe, **7:** HEPES, **8:** TEN10, **9:** TIF, **10:** SET

Zu weiteren GST-*pull down* Versuchen mit HLA-Cw4 wurden die GST-Fusionsproteine somit in NETN20-Puffer aufgenommen. Die Analyse der Expression der GST-Fusionsproteine nach Induktion zeigt nur eine geringe Expression von CHR4K, wohingegen GST allein sehr stark exprimiert wird (Abb.5.5). Ein geringer Abbau ist bei dem Konstrukten bei GST-NHR4K und GST-rgp4K erkennbar. Die Menge an GST-Fusionsprotein im Bakterienlysat konnte anhand des aufgetragenen BSA-Standards abgeschätzt werden.



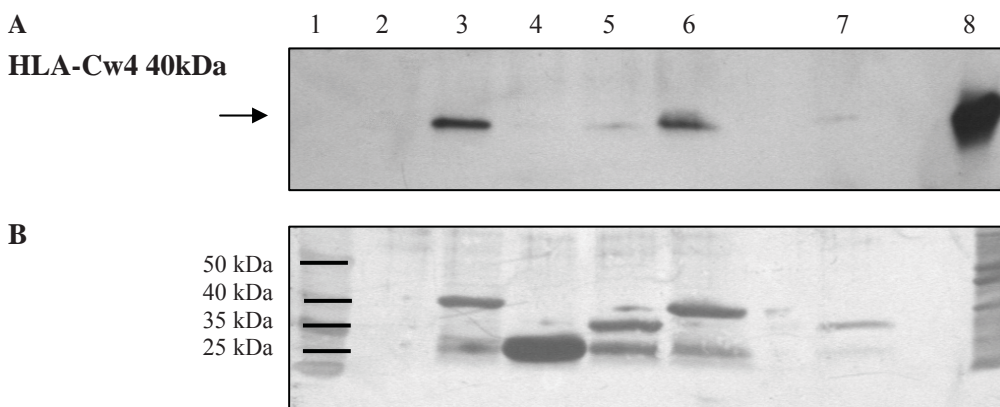
**Abb.5.5: Übersicht der in induzierten gp41-Fusionsproteine zur Aufnahme in NETN20-Puffer in einem 12%igem SDS-Gel**

**1-3:**BSA-Standard 400 mg, 800 mg und 1600 mg (66,4 kDa), **4:** Marker, **5:** GST (26 kDa), **6:** GST-CHR 4k (35,7 kDa), **7:** GST-NHR4K ( 33,6 kDa), **8:** GST- $\Delta$ rgp4K (44,3 kDa), **9:** GST- $\Delta$ NHR4K ( 31,8 kDa),**10:** GST-rgp4K ( 42,1 kDa)



### GST-pull down zur Bestätigung der Interaktion von gp41 und HLA-Cw4

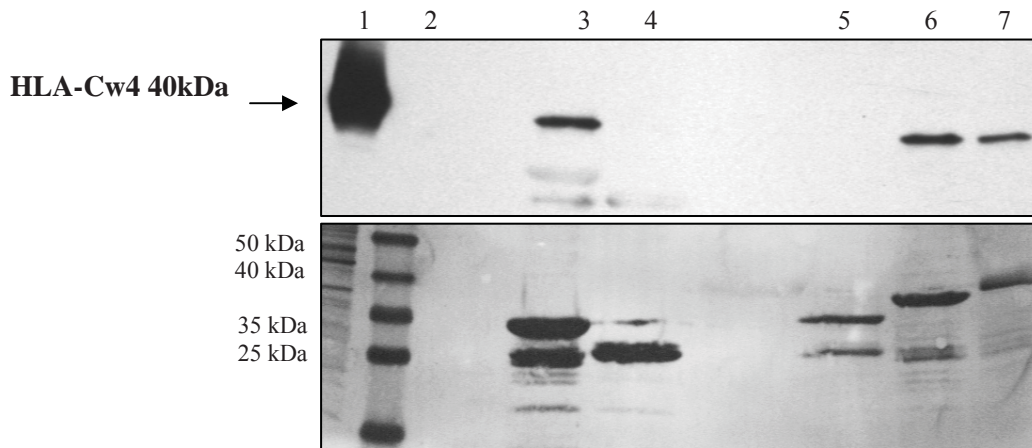
Der zweite GST-pull down Versuch wurde unter gleichen Bedingungen wie der erste mit den in NETN20-Fusionspuffer aufgenommenen Fusionsproteinen durchgeführt. Im Ergebnis der Western Blot-Analyse des durchgeführten GST-pull downs wurde hier keine unspezifische Bindung von HLA-Cw4 mit den Negativkontrollen *beads*, sowie GST detektiert (Abb.5.6). Die signifikante Detektion von HLA-Cw4 bei GST-rgp4K und G $\Delta$ rgp4K kann als eindeutiges Ergebnis gewertet werden und somit eine Interaktion von HLA-Cw4 mit gp41 bestätigen. Weiterhin wurde Hintergrund bei GST-CHR4K und GST-NHR4K detektiert.



**Abb.5.6: Western Blot-Ergebnisse (A) sowie PVDF-Membran der GST-pull down-Analyse nach Proteinfärbung (B)**

Ermittlung der Interaktion gp41-Deletionsmutanten mit HLA-Cw4, Auftrennung der Proteine auf 10%igen SDS-Gel, Transfer auf eine PVDF-Membran, HLA-Cw4-Detektion mittels L31 (1:1000), Sekundärantikörper  $\alpha$ -mouse IgG/HRP (1:2000); **1:** Marker, **2:** *beads* + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **3:** GST-rgp4K + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **4:** GST + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **5:** GST-NHR4K + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **6:** GST- $\Delta$ rgp4K + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **7:** GST-CHR4K + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **8:** Positivkontrolle 4 $\mu$ g HLA-Cw4 (Expositionszeit 30s)

Mögliche unspezifische Bindungen, die aufgrund einer zu ausgedehnten Inkubationszeit entstehen konnten, sollten folgend durch Verkürzung der HLA-Cw4-Kopplungszeit an die GST-Fusionsproteine von 2h auf eine  $\frac{1}{2}$  h, unterbunden werden. So erfolgte die Inkubation der *beads* mit den GST-Fusionsproteinen in NETN20-Puffer. Nach Waschen der *beads* folgte der 2. Inkubationsschritt der *beads* mit dem HLA-Cw4-Zellysat für  $\frac{1}{2}$  h bei 4°C in *pull down*-Puffer. Da sich die Bindung des GST-Fusionsproteins GST-CHR4K an die *beads* für schwierig erwies, wurde die doppelte Menge an Bakterienlysat im 1. Inkubationsschritt eingesetzt. Als Ergebnis der Western Blot-Analyse wurde keine unspezifische Bindung von HLA-Cw4 an die beiden Negativkontrollen verzeichnet (Abb.5.7). Durch die Detektion einer spezifischen Bindung von HLA-Cw4 mit  $\Delta$ rgp4K sowie rgp4K, konnte das Ergebnis des vorangegangenen *pull downs* bestätigt werden. Weiterhin wurde eine spezifische Bindung von HLA-Cw4 an CHR4K detektiert. Zwischen HLA-Cw4 und GST-NHR4K konnte keine Interaktion detektiert werden.



**Abb.5.7: Western-Blot Ergebnisse (A) sowie PVDF-Membran der GST-pull down Analyse nach Proteinfärbung (B)**

Ermittlung der Interaktion gp41-Deletionsmutanten mit der Ektodomäne von HLA-Cw4, Auftrennung der Proteine auf 10%igem SDS-Gel, Transfer auf eine PVDF-Membran, HLA-Cw4-Detektion mittels L31 (1:1000), Sekundärantikörper  $\alpha$ -mouse IgG/HRP (1:2000); **1:** Positivkontrolle 4  $\mu$ g HLA-Cw4, **2:** Marker, **3:** GST-CHR4K + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **4:** GST + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **5:** GST-NHR4K + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **6:** GST- $\Delta$ rgp4K + 10  $\mu$ g HLA-Cw4, **7:** GST-rgp4K + 10  $\mu$ g HLA-Cw4 (Expositionszeit 30 s)

### 5.3 Versuche zur Hemmung der Interaktion von gp41 mit HLA-Cw4 durch Peptid #23

In Studien der italienischen Arbeitsgruppe um A. Siccardi zur Eingrenzung der gp41-Bindungsregion mit HLA-Cw4, wurden mehrere überlappende Peptide eingesetzt, welche die Ektodomäne von gp41 abdeckten. Dabei konnte das für Peptid #23 (Abb.5.8), eine Bindung mit HLA-Cw4 transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin ist das 3S-Peptid dargestellt, auf das in der Diskussion ausführlich eingegangen wird. Das Ziel der folgenden Interaktionsstudien war, durch das Peptid #23, welches in DMSO aufgenommen wurde, eine Inhibierung der Bindung zwischen HLA-Cw4 und gp41 hervorzurufen, um dadurch eine nochmalige Bestätigung der Interaktion von HLA-Cw4 und gp41 zu erlangen.

AVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAV  
ERYLKDQQLLGIWGC**CSGKLICTTA**VPWNASWSNKSLEQIWNNMT**WME**WDREINNYTSLIHSLEESQNQQE  
KNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYI

**Abb.5.8: Aminosäuresequenz der gp41-Ektodomäne**

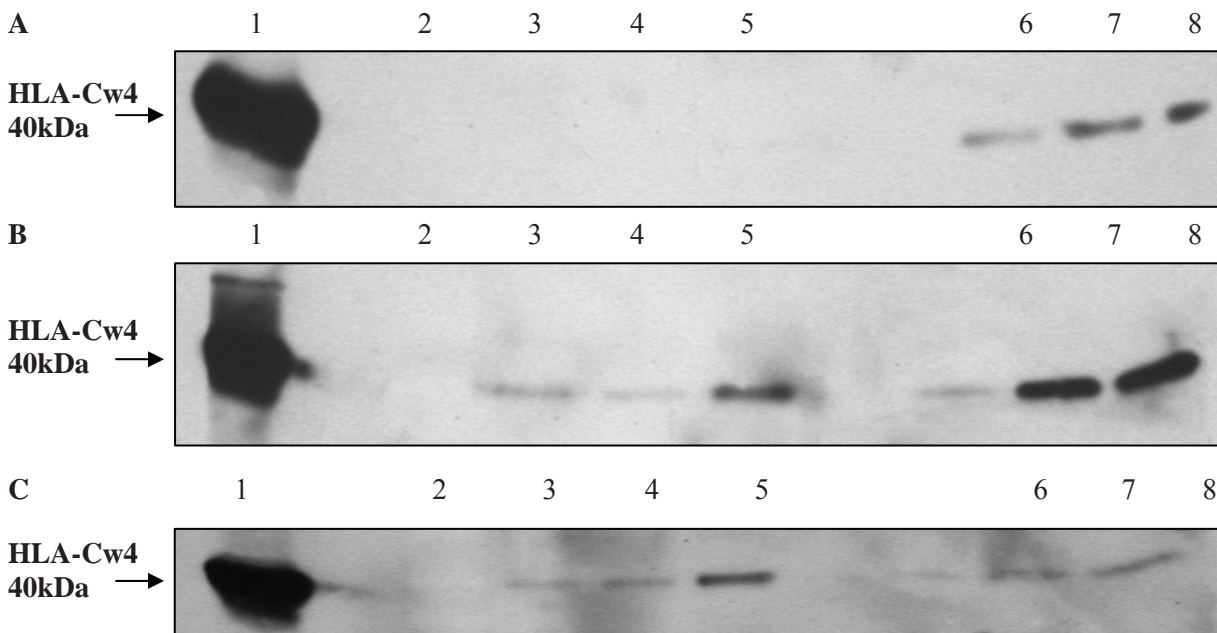
Grün dargestellt ist die Aminosäuresequenz von Peptid #23, 3S-Peptid ist unterstrichen (6.1), Cystein-Cystein-Loop ist rot gekennzeichnet, vor dem sich die NHR und dahinter die CHR befindet

Im folgenden Versuch wurden das GST-Fusionsprotein GST-rgp4K sowie GST allein an die GST-Sepharose-beads gekoppelt. Im 2. Inkubationsschritt erfolgte dann eine Inkubation der Fusionsproteine mit 60  $\mu$ l HLA-Cw4-Zellysate sowie gleichzeitig mit jeweils 3 unterschiedlichen Konzentrationen des Peptides #23 (10  $\mu$ g, 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g) für  $\frac{1}{2}$  h bei 4°C. Im Ergebnis der Western Blot-Analyse konnte keine Bindung zwischen GST und HLA-Cw4, jedoch Bindung von HLA-Cw4 mit GST-rgp4K trotz Vorhandensein von Peptid #23, detektiert werden (Abb.5.9 A). Die Steigerung der Konzentration von Peptid #23 führte zu einer Bindungszunahme von HLA-Cw4 an GST-rgp4K.



Zur Optimierung des Versuchs wurde anstelle der gleichzeitigen Zugabe von HLA-Cw4 und Peptid#23 zu den Fusionsproteinen, eine Vorinkubation des HLA-Cw4-Zellysates mit Peptid #23, jeweils wieder in 3 Konzentrationen vorliegend (10 µg, 25 µg und 50 µg), für 1h durchgeführt. Erst dann wurde der Reaktionsansatz im 2. Inkubationsschritt zu dem an die *beads* gekoppelten Fusionsproteinen GST, GST-rgp4K und GST-NHR4K gegeben.

Allerdings wurde wieder eine Zunahme der Bindung von HLA-Cw4 an GST-rgp4K mit Konzentrationssteigerung von Peptid #23 detektiert (Abb5.10 B). Weiterhin wurde diese Bindungszunahme auch bei GST, den *beads* allein und NHR4K beobachtet (Abb. 5.10 B, C).



**Abb.5.9: Western-Blot Ergebnisse des Hemmversuches mit Peptid #23 (Expositionszeit 1 min)**

Auftrennung der Proteine auf 10%igen SDS-Gel, Transfer auf eine PVDF-Membran, HLA-Cw4-Detektion mittels L31 (1:1000), Sekundärantikörper  $\alpha$ -mouse IgG/HRP (1:2000);

**A: (GST, GST-rgp4K)**

**1:** Positivkontrolle 4µg HLA-Cw4, **2:** Marker, **3:** GST + 10 µg HLA-Cw4, **4:** GST + 10 µg HLA-Cw4 + 25 µg Peptid #23, **5:** GST + 10 µg HLA-Cw4 + 50 µg Peptid #23, **6:** GST-rgp4K + 10 µg HLA-Cw4+ 10 µg Peptid #23, **7:** GST-rgp4K + 10 µg HLA-Cw4+ 25 µg Peptid #23, **8:** GST-rgp4K + 10 µg HLA-Cw4+ 50 µg Peptid #23

**B: (beads, GST)**

**1:** Positivkontrolle 4µg HLA-Cw4, **2:** Marker, **3:** beads + 10 µg HLA-Cw4+ 10 µg Peptid #23, **4:** beads + 10 µg HLA-Cw4+ 25 µg Peptid #23, **5:** beads + 10 µg HLA-Cw4+ 50 µg Peptid #23, **6:** GST + 10 µg HLA-Cw4 + 10 µg Peptid #23, **7:** GST + 10 µg HLA-Cw4 + 25 µg Peptid #23, **8:** GST + 10 µg HLA-Cw4 + 50 µg Peptid #23

**C: (GST-NHR4K, GST-rgp4K)**

**1:** Positivkontrolle 4µg HLA-Cw4, **2:** Marker, **3:** GST-NHR4K + 10 µg HLA-Cw4 + 10 µg Peptid #23, **4:** GST-NHR4K + 10 µg HLA-Cw4 + 25 µg Peptid #23, **5:** GST-NHR4K + 10 µg HLA-Cw4 + 50 µg Peptid #23, **6:** GST-rgp4K + 10 µg HLA-Cw4+ 10 µg Peptid #23, **7:** GST-rgp4K + 10 µg HLA-Cw4+ 25 µg Peptid #23, **8:** GST-rgp4K + 10 µg HLA-Cw4+ 50 µg Peptid #23

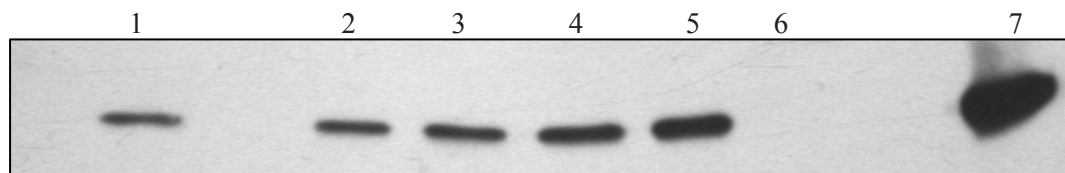
Da die unspezifischen Bindungen bei allen Fusionsproteinen mit Erhöhung der Peptid#23 zunahm, wurde ein separater Versuch für GST-rgp4K durchgeführt, bei dem der DMSO-Einfluss sowie die Inkubationsbedingungen wurden. Dabei wurden die *beads* mit den GST-Fusionsproteinen für 1 ½ h bei 4°C im NETN20-Puffer inkubiert. Parallel wurde HLA-Cw4 in verschiedenen Ansätzen vorinkubiert (Tab.5.2).

Im 2. Inkubationsschritt erfolgte dann die Inkubation der Fusionsproteine mit den Ansätzen 1-5, wobei mit Ansatz 3 nur die *beads* inkubiert wurden. Bei Ansatz 1 wurden 60 µl HLA-Cw4-Zellysat hinzugegeben, welches nicht für 1h bei 4°C im *pull down*-Puffer vorinkubierte.

**Tab.5.2: Ansätze für GST-pull down von rgp-4K mit HLA-Cw4**

Ansatz	
Ansatz 1	60 µl HLA-Cw4-Zellysat
Ansatz 2	60 µl HLA-Cw4-Zellysat für 1h in <i>pull down</i> -Puffer vorinkubiert
Ansatz 3	60 µl HLA-Cw4-Zellysat + 16,6 µl DMSO (entspricht dem DMSO-Volumen beim Einsatz von 25µg Peptid#23) in <i>pull down</i> -Puffer für 1h vorinkubiert
Ansatz4	60 µl HLA-Cw4-Zellysat + 25 µg Peptid #23 in <i>pull down</i> -Puffer für 1h vorinkubiert
Ansatz 5	60 µl HLA-Cw4-Zellysat + 50 µg Peptid #23 in <i>pull down</i> -Puffer für 1 h vorinkubiert

Die Western Blot-Ergebnisse der GST-*pull down* Analyse. Zeigten keinen Unterschied der Bindungsfähigkeit von HLA-Cw4 im vorinkubierten und nicht vorinkubierten Zustand (Abb.5.10). Bei Ansatz 4-5 ist wieder eine Steigung der HLA-Cw4-Bindung an rgp4K mit Zunahme der Peptid #23-Konzentration detektierbar. Eine Bindung von HLA-Cw4 unter Einfluss von DMSO an die *beads* konnte detektiert werden.



**Abb.5.10: Western-Blot Ergebnisse des Hemmversuches mit Peptid #23 (GST-rgp4K)**

(Auftrennung der Proteine auf 10%igem SDS-Gel, Transfer auf eine PVDF-Membran, HLA-Cw4-Detektion mittels L31 (1:1000), Sekundäntikörper  $\alpha$ -mouse IgG/HRP (1:2000); **1:** GST-rgp4K + 10 µg HLA-Cw4, **2:** GST-rgp4K + 10 µg HLA-Cw4 (1h bei 4°C mit rotiert); **3:** GST-rgp4K + 10 µg HLA-Cw4 + DMSO (16,6 µl), **4:** GST-rgp4K + 10 µg HLA-Cw4+ 25 µg Peptid #23, **5:** GST-rgp4K + 10 µg HLA-Cw4+ 50 µg Peptid #23, **6:** Marker, **7:** Positivkontrolle 4µg HLA-Cw4 (Expositionszeit: 1min)

Die durchgeführten Hemmversuche mit Peptid #23 führten zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen.

## 5.4. Analyse der Interaktion von TREM-1 und gp41-Deletions-mutanten mittels GST-pull down-Analysen und Koimmunpräzipitation

Mittels eines *yeast two hybrid screens* konnte TREM-1 als potentieller Interaktionspartner für gp41 detektiert werden. Dabei wurde eine Interaktion von TREM-1 mit beiden gp41-Deletionsmutanten  $\Delta$ NHR und  $\Delta$ rgp durch Hefeklonwachstum sowie anschließendem  $\alpha$ -Gal-Test bestätigt. Das sollte nun in weiteren Interaktionsanalysen mittels GST-pull down und Koimmunpräzipitation verifiziert werden.

Im Rahmen der Diplomarbeit von K.Scharf, AG Denner, wurden mehrere Versuche durchgeführt, um TREM-1 aus Zellysaten zu gewinnen. Da TREM-1 in der Zellmembran von Monozyten und Neutrophilen lokalisiert ist, sollte durch Zytosol-Membran-Fraktionierung aus THP-Zellen, eine humane monozytische Leukämiezelllinie, TREM-1 aufkonzentriert werden. Weiterhin wurden eine transiente Transfektion mittels  $\text{CaCl}_2$ -Methode bzw. Lipofectamin® von 293 T-Zellen und HeLa-Zellen durchgeführt. Jedoch blieben alle Versuche erfolglos.

Deshalb wurden die folgenden Analysen mit rekombinanten löslichen TREM-1 (rsTREM-1) durchgeführt, die uns freundlicherweise von Dr. Philipp Haselmayer, Institut für Immunologie der Universität Mainz zur Verfügung gestellt wurden. Im folgender Abbildung sind die Protein-Sequenzen von TREM-1, rsTREM-1 und dem im *yeast two hybrid system* gefundenen TREM-1 Klon 95 im Vergleich dargestellt. Der TREM-1 Klon 95 ist zu 100% homolog zu dem N-terminalen Bereich der beiden TREM-1-Formen auf (Abb.5.11).

### TREM-1 Klon 95

```
MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHP
VQVGRIILEDYHDHGLL
```

### TREM-1 (26,4 kDa)

```
MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHP
VQVGRIILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFSGTPGSNENSTQNVYKIPPTI
TKALCPLYTSPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINLTNVTDIIRVPVFNIVILLAGGFSLKSLVFSVLFAVTLRSEVP
```

### rsTREM-1 (17,5 kDa)

```
MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHP
VQVGRIILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFRCSLTLFSWLVDV
```

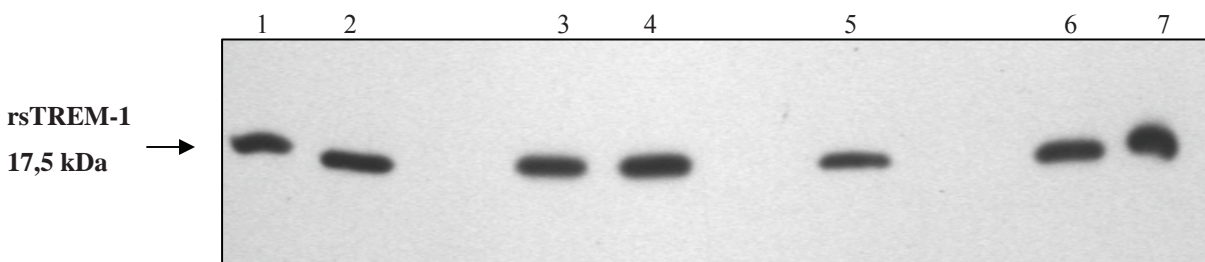
### Abb.5.11: Sequenzvergleich von TREM-1, rsTREM-1 und TREM-1 Klon 95 (NM\_018643.2)

Grün dargestellt ist die Homologie; Rot dargestellt sind die unterschiedlichen Sequenzreste der 2 Proteine TREM-1 und rsTREM-1, nicht markiert sind die abweichenden Aminosäuresequenzen

Als Positivkontrolle wurde bei allen *pull downs*-Versuchen sowie Koimmunpräzipitationen 1  $\mu$ g des aufgereinigten rsTREM-1-Protein von Haselmayer eingesetzt.

### GST-pull down Analyse mit Glutathion Sepharose beads 4B

Das hiergezeigte Ergebnis des GST-pull down Versuchs wurde im Rahmen der Diplomarbeit von K. Scharf, AG Denner erhalten, wobei zuerst nach Standard-Protokoll gearbeitet wurde. Dabei wurden bei der Aufarbeitung des Bakterienpellets der GST-Fusionsproteine  $\Delta$ NHR und CHR4K der Fusionspuffer PBS + 1% Triton X 100 verwendet. Weiterhin wurden aufgereinigte Fusionsproteine als Vergleich mitgeführt. Als Negativkontrolle wurden ebenfalls 10  $\mu$ g GST, im Bakterienlysat vorliegend, und die beads alleine mit TREM-1 inkubiert. Der erste Inkubationsschritt der GST-Sepharose-beads mit den Fusionsproteinen belief sich auf 1 ½ h bei 4°C. Die Inkubation der Fusionsproteine mit rs-TREM-1 dauerte 4h bei 4°C. Die Western Blot-Ergebnisse zeigten, das in diesem GST-pull down Versuch rsTREM-1 unspezifisch mit den GST-Sepharose-beads sowie mit GST interagiert (Abb.5.12).

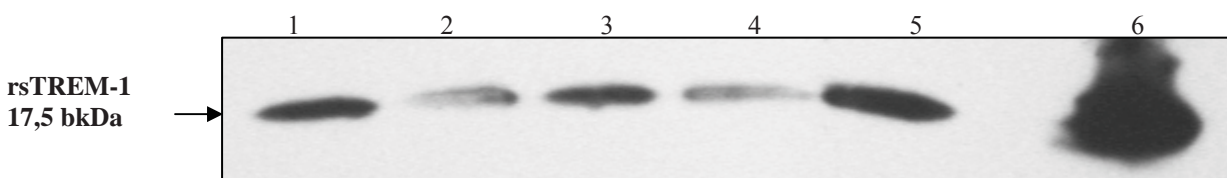


**Abb.5.12: GST-pull down zur Analyse der Interaktion von rsTREM-1 mit gp41-Deletionsmutanten**

Auftrennung der Proben mit Hilfe eines 10% SDS-Trenngels, TREM-1 Detektion mittels  $\alpha$ -TREM-1 Mainz (1:1000), Sekundärantikörper  $\alpha$ -mouse IgG/HRP (1:2000); **1:** beads + 10 $\mu$ g rsTREM-1, **2:** GST- $\Delta$ NHR (unaufgereinigt) + 10 $\mu$ g rsTREM-1, **3:** GST-CHR4K (unaufgereinigt) + 10 $\mu$ g rsTREM-1, **4:** GST (unaufgereinigt) + 10 $\mu$ g rsTREM-1, **5:** GST- $\Delta$ NHR (aufgereinigt) + 10 $\mu$ g rsTREM-1, **6:** GST-CHR4K (aufgereinigt) + 10 $\mu$ g rsTREM-1, **7:** Positivkontrolle 1 $\mu$ g rsTREM-1 (Expositionszeit 10 s)

### Etablierung der GST-pull down Analyse

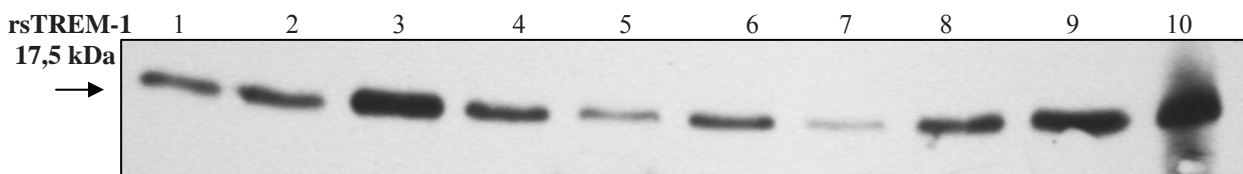
Um die Stringenz des pull downs zu erhöhen, wurde während der 2. Inkubationsschritte der Proteine der Fusionspuffer, sowie pull down-Puffer mit 5% Magermilchpulver abgesättigt. So wurde hier jeweils die Bakterienlysate der GST-Fusionsproteine GST-rpg, GST-CHR4K und GST-NHR4K als Bakterienlysat eingesetzt. Der 2. Inkubationsschritt, bei dem der GST-Sepharose-bead/GST-Fusionsprotein-Komplex mit 10  $\mu$ g TREM-1 inkubiert wurde, wurde außerdem von 4 h auf 1 h verkürzt. Trotz zusätzlicher Absättigung der GST-Sepharose-beads kam eine unspezifische Bindung von rsTREM-1 mit den beads zustande(abb.5.13).



**Abb.5.13: GST-pull down-Versuch zur Analyse der Interaktion von rsTREM-1 mit gp41-Deletionsmutanten, mit 5% Magermilchpulver abgesättigt**

Auftrennung der Proben mit Hilfe eines 10% SDS-Trenngels, TREM-1 Detektion mittels  $\alpha$ -TREM-1 Mainz (1:1000), Sekundärantikörper  $\alpha$ -mouse IgG/HRP (1:2000); **1:** / + 10 $\mu$ g rsTREM-1, **2:** GST-NHR4K + 10 $\mu$ g rsTREM-1, **3:** GST-CHR4K + 10 $\mu$ g rsTREM-1, **4:** GST + 10 $\mu$ g rsTREM-1 **5:** GST-rpg + 10 $\mu$ g rsTREM-1, **6:** Positivkontrolle 1 $\mu$ g rsTREM-1 (Expositionszeit: 30s)

Als weitere Optimierungsstrategie wurden folgend, wie bei den HLA-Cw4 *pull down*-Versuchen, 9 unterschiedliche Fusionspuffer ausgetestet. Dabei erfolgte eine Inkubation GST-Sepharose-*beads* für 1 ½ h in den jeweiligen 9 Fusionspuffern sowie eine anschließende Inkubation mit rs-TREM-1. In der Western Blot-Analyse (Abb.5.14) konnte gezeigt werden, dass bei allen Fusionspuffern eine unspezifische Bindung von rsTREM-1 an die GST-Sepharose-*beads* erfolgte und somit kein optimaler Fusionspuffer gefunden werden konnte.



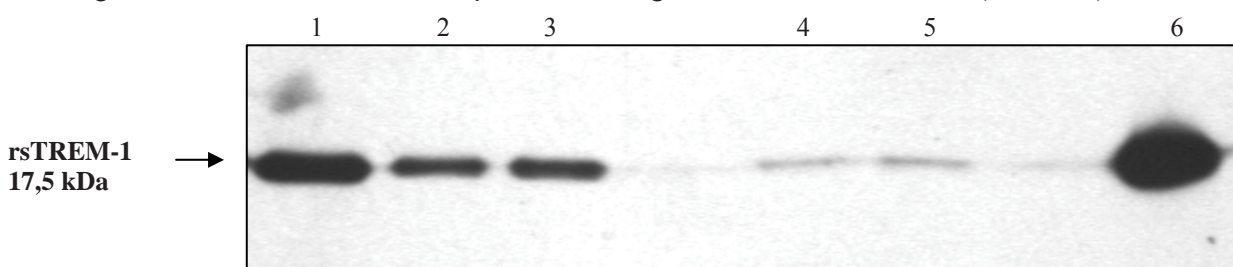
**Abb.5.14: Puffertest für GST-*pull down*-Analysen mit rsTREM-1**

Auftrennung der Proben mit Hilfe eines 10% SDS-Trenngel, TREM-1 Detektion mit  $\alpha$ -TREM-1 Mainz (1:1000), Sekundäntikörper  $\alpha$ -mouse IgG/HRP (1:2000), **1:** PBS2, **2:** NETN20, **3:** NETN25, **4:** NETN50, **5:** NETNMe, **6:** Hepes, **7:** SET, **8:** Ten10, **9:** TIF, **10:** Positivkontrolle 1  $\mu$ g rs-TREM-1, (Expositionszeit: 30 s)

### ***pull down*-Analyse mit Dynabeads® Streptavidin M-280**

Da keine Optimierung des GST-*pull downs* erreicht werden konnte, wurden statt der GST-Sepharose-*beads* Dynabeads® Streptavidin M-280 eingesetzt, um so durch bessere Trennung von Puffer und *beads* unspezifische Bindungen zu unterbinden. Eine weitere Änderung der Bedingungen war die Verwendung von kurzen biotinylierten gp41-Peptiden, welche in hoher Reinheit vorlagen.

Während dieses Versuches wurden 20  $\mu$ l und 30  $\mu$ l an *Dynabead-slurry* für die Kopplung von 10  $\mu$ g randomisierten und biotylierten ISU-Peptids und 10  $\mu$ g biotylierten ISU-Peptids der Firma Genaxxon eingesetzt. Nach Waschen der *beads* erfolgte anschließend die Inkubation mit 10  $\mu$ g rsTREM-1 für 1h bei 4°C. Abbildung 5.15 zeigt das Western Blot-Ergebnis für diesen *pull down*. Dabei ist wieder eine unspezifische Bindung von rsTREM-1 mit den *beads* zu erkennen. Weiterhin ist ein stärkeres Signal bei der bei Kopplung des randomisierten ISU-Peptid im Vergleich zu ISU-Peptid festzustellen. Ein Unterschied der Bindungsstärke bei unterschiedlichen *Dynabeads*-Mengen ist nicht zu beobachten (Abb.5.15).



**Abb.5.15: *pull down*-Analyse von rsTREM-1 mit Dynabeads® Streptavidin M-280**

Auftrennung der Proben in einem 10% SDS-Trenngel, TREM-1 Detektion mit  $\alpha$ -TREM-1 Mainz (1:1000), Sekundäntikörper  $\alpha$ -mouse IgG/HRP (1:2000), **1:** 20  $\mu$ l Dynabeads® Streptavidin M-280 + *beads*, **2:** 20  $\mu$ l Dynabeads® Streptavidin M-280 + randomisiertes ISU-Peptid + rsTREM-1, **3:** 30  $\mu$ l Dynabeads® Streptavidin M-280 + randomisiertes ISU-Peptid + rsTREM-1, **4:** 20  $\mu$ l Dynabeads® Streptavidin M-280 + ISU-Peptid + rsTREM-1, **5:** 30  $\mu$ l Dynabeads® Streptavidin M-280 + randomisiertes ISU-Peptid + rsTREM-1, **6:** Positivkontrolle 1  $\mu$ g rsTREM-1 (Expositionszeit: 30 s)

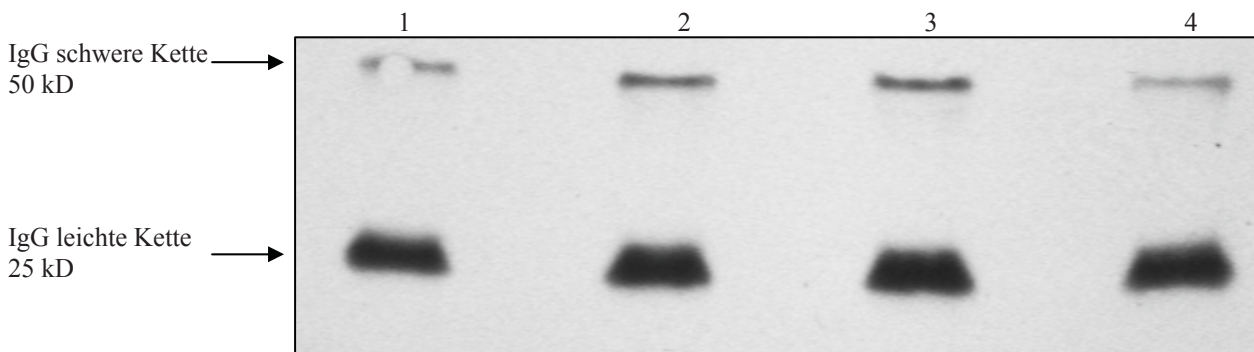


## Koimmunpräzipitation mit Dynabeads® ProteinG

Da die durchgeführten *pull down*-Versuche für rsTREM-1 ohne Ergebnis blieben, wurde versucht, mittels Koimmunpräzipitation eine Interaktion von rsTREM-1 mit gp41 zu bestätigen. Dabei wurde das Protein rsTREM-1 über einen spezifischen Antikörper an eine sedimentierbare Matrix gekoppelt. Als Matrix wurden *Dynabeads*® ProteinG der Firma Invitrogen eingesetzt, welche auf ihrer Oberfläche Protein G binden, das mehrere Bindungsdomänen mit einer hohen Affinität für die Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps IgG besitzt. Weiterhin kann durch den Magnetismus der *beads* eine optimale Trennung von Puffer und *beads* mittels Magnetständer gewährleistet werden. Da rsTREM-1 nur noch in geringen Mengen zur Verfügung stand, wurden alle Koimmunpräzipitationen mit Fusionsproteinen in NENT20-Fusionspuffer durchgeführt.

Zuerst wurden 10 µl *Dynabeads* (250 µg Antikörper/ml *Dynabeads*) mit 2,5 µg α-TREM-1 Mainz Antikörper für 1h bei 4°C rotierend inkubiert. Gleichzeitig erfolgte die Inkubation von rs-TREM-1 mit jeweils einem Bakterienlysats der Fusionsproteine GST-CHR4K, GST-NHR4K und GST-rgp4K als Suspensionslösung. Nach dem Waschen der *beads* wurden diese 1h mit der Suspensionslösung inkubiert.

Bei allen Ansätzen konnten nur Banden auf der Höhe von 50 kDa und 25 kDa detektiert werden, was den schweren und leichten Ketten des α-TREM-1 Mainz entspricht (Abb.5.16). Es konnte keine Bindung der GST-Fusionsproteine detektiert werden, wobei die Bande für GST-CHR4K bei 35,7 kDa, die Bande für GST-NHR4K bei 33,6 kDa und eine 44,3 kDa hohe Bande für GST-rgp4K liegen hätten.

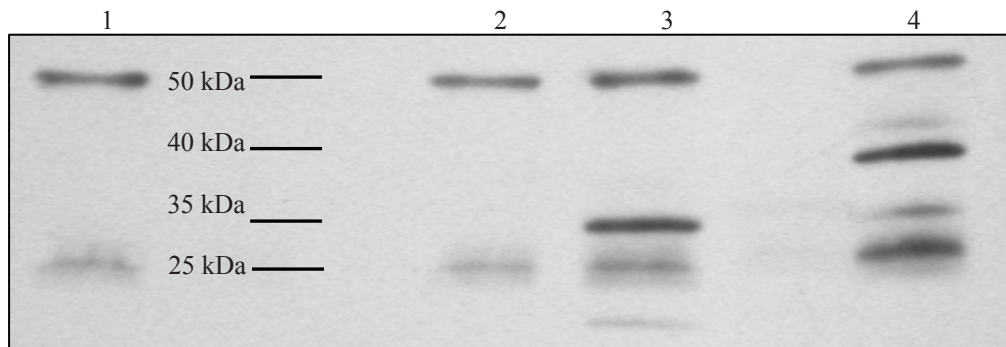


**Abb.5.16: Immunpräzipitation zur Interaktion von rs-TREM-1 mit gp41-Deletionsmutanten**

Auftrennung der Proben in einem 12% SDS-Polyacrylamid-Gel, GST-Detektion mit α-GST-antibody (1:1000), Sekundäntikörper α-mouse IgG/HRP (1:2000); **1:** 10 µg rsTREM-1 + *beads*, **2:** 10 µg rsTREM-1 + 10 µg NHR4K, **3:** 10 µg rsTREM-1 + 10 µg CHR4K, **4:** 10 µg rsTREM-1 + 10 µg rgp4K, (Expositionszeit 1s)

Da diese Strategie der Vorinkubation der GST-Fusionsproteine mit rs-TREM-1 zu keinem Ergebnis führte, wurden nun rsTREM-1, die *Dynabeads* sowie die rsTREM-1-Antikörper α-TREM-1 Mainz gemeinsam für 1h bei 4°C vorinkubiert. Nach einem gründlichen Waschschriff der *Dynabeads* erfolgte die Kopplung der Fusionsproteinen GST-NHR4K, GST-CHR4K und GST-rgp4K für 1h bei 4°C.

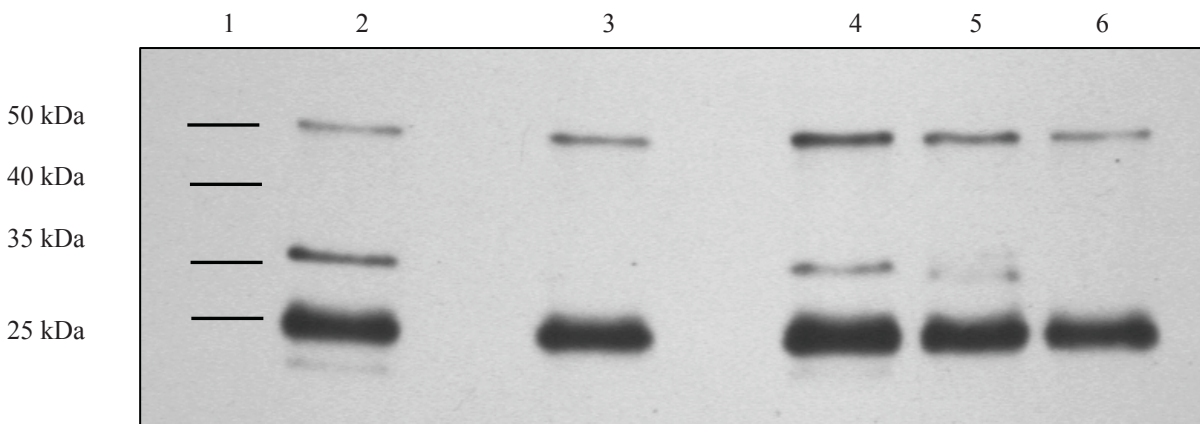
Neben den detektierten Antikörper-Banden bei 50 und 25 kDa konnten hier auch Banden detektiert werden (Abb.5.17), die den errechneten Größen der Fusionsproteine entsprechen. So konnte eine Bindung des GST-CHR4K-Protein bei 35,7 kDa und eine Bindung des GST-rgp4K bei 44,3 kDa an rsTREM-1 nachgewiesen werden. Eine Bindung von GST-NHR4K an rs-TREM-1 wurde nicht detektiert.



**Abb.5.17: Immunpräzipitation zur Analyse der Interaktion von rs-TREM-1 mit gp41-Deletionsmutanten**

Auftrennung der Proben in einem 12% SDS-Polyacrylamid-Gel, GST-Detektion mit  $\alpha$ -GST-antibody (1:1000), Sekundärantikörper  $\alpha$ -mouse IgG/HRP (1:2000); **1:** 10 $\mu$ g rsTREM-1 + *beads*, **2:** 10 $\mu$ g rsTREM-1 + 10  $\mu$ g NHR4K, **3:** 10 $\mu$ g rsTREM-1 + 10  $\mu$ g CHR4K, **4:** 10 $\mu$ g rsTREM-1 + 10  $\mu$ g rgp4K (Expositionszeit 1s)

Um eine unspezifische Bindung der Fusionsproteine an die rsTREM-1-Antikörper auszuschließen, wurden neben den mit rsTREM-1 gekoppelten *Dynabeads* im folgenden Versuch Negativkontrollen mitgeführt, bei denen die *Dynabeads* ohne rsTREM-1 mit den Fusionsproteinen GST-CHR4, GST-NHR4K und GST-rgp4K inkubiert wurden. Da ein Mangel an rsTREM-1 bestand, konnte kein rsTREM-1-Ansatz für das Fusionsprotein GST-rgp4K mitgeführt werden. Neben den Antikörperbanden der schweren und leichten Kette bei 50 und 25 kDa war starkes Signal bei rsTREM-1 mit GST-CHR4K, und im Vergleich dazu ein schwaches Signal bei GST-CHR4K ohne TREM-1 bei 35,7 kDa zu erkennen (Abb.5.18). Für GST-NHR4K ist keine spezifische Bindung zu rsTREM-1 zu sehen, jedoch eine unspezifische an die *Dynabeads* allein bei 33,6 kDa. Die Negativkontrolle für GST-rgp4K ist negativ.



**Abb.5.18: Immunpräzipitation (rs-TREM-1 mit gp41-Deletionsmutanten)**

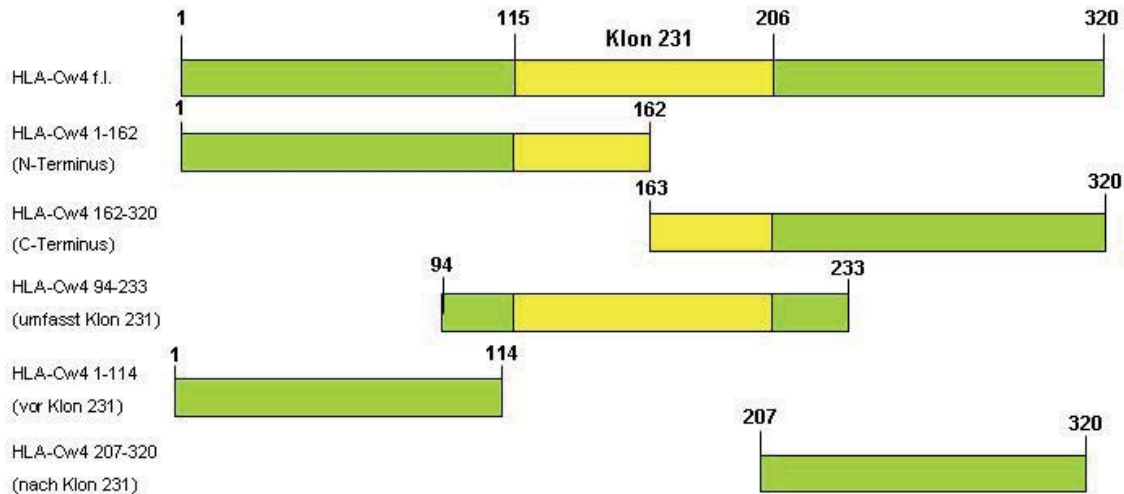
(Auftrennung der Proben in einem 12% SDS-Polyacrylamid-Gel, GST-Detektion mit  $\alpha$ -GST-antibody (1:1000), Sekundärantikörper  $\alpha$ -mouse IgG/HRP (1:2000); **1:** Marker, **2:** 10 $\mu$ g rsTREM-1+ 10  $\mu$ g GST-CHR4K, **3:** 10 $\mu$ g rsTREM-1 + 10  $\mu$ g GST-NHR4K, **4:** *beads* + 10  $\mu$ g CHR4K, **5:** *beads* + GST-NHR4K, **6:** *beads* + 10  $\mu$ g GST-rgp4K (Expositionszeit 1s)

Mittels GST-*pull down* konnte die Interaktion von TREM-1 und gp41 nicht bestätigt werden, da eine Optimierung der Versuche in Bezug auf rsTREM-1 nicht möglich war. Weiterhin konnten die Koimmunpräzipitationsversuche nicht weitergeführt werden, da rsTREM-1 nicht mehr zur Verfügung stand.



## 5.5 Klonierungsversuche von HLA-Cw4-Verkürzungsmutanten

Für weiterführende Interaktionsversuche von HLA-Cw4 und gp41 sollten unterschiedliche HLA-Cw4-Verkürzungsmutanten in den Vektor pACT kloniert werden. Diese sollten in nachfolgenden *yeast two hybrid screens* eingesetzt werden, um die Bindungsstellen von HLA-Cw4 mit gp41 weiter einzugrenzen bzw. die in Studien der italienischen Arbeitsgruppe um Siccardi detektierte Interaktionsstelle von HLA-Cw4 für gp41 zu bestätigen. In der nachfolgenden Abbildung sind die HLA-Cw4-Verkürzungsmutanten schematisch dargestellt.



**Abb.5.19:** Schematische Darstellung des HLA-Cw4 Vollängenproteins sowie davon abgeleitete Verkürzungsmutanten Klon 231 (XM\_001717045) gelb dargestellt

Zu Beginn der Klonierung wurden *forward*- und *reverse*-Primer für die 6 unterschiedlichen HLA-Cw4-Mutanten konstruiert, die die spezifischen Schnittstellen *Nco* I und *Xho* I beinhalteten (Tab.5.3). Als *template*-DNA wurde der H1 pZeoSV2(+) HLA-Cw4 eingesetzt der von unserem Kooperationspartner A. Siccardi zu Verfügung gestellt wurde. Die konstruierten Primer (10 pmol/ $\mu$ l) wurden dann mittels PCR mit einer Anelatingtemperatur von 65°C, für die Amplifizierung der HLA-Cw4-Konstrukte eingesetzt.

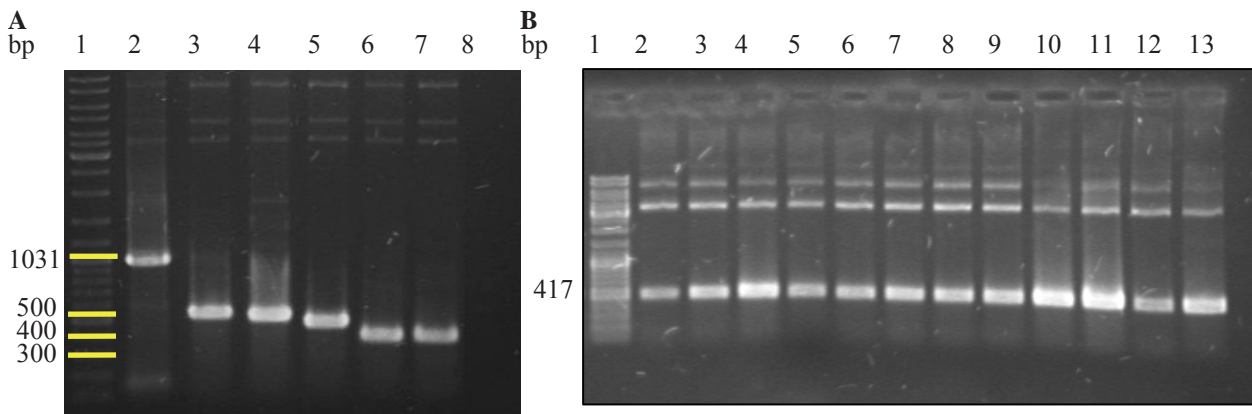
**Tab.5.3: Primerzusammensetzung für PCR der HLA-Cw4-Verkürzungsmutanten**

<b>Konstrukte</b>	<b>Größe bp</b>	<b>PCR-Primer forward</b>	<b>PCR-Primer reverse</b>
HLA-Cw4 full length	960	1A HLA-Cwfor	HLA-Cw 320 rev
HLA-Cw4 1-162	486	1A HLA-Cwfor	HLA-Cw 162rev
HLA-Cw4 162-320	471	163A HLA-Cwfor	HLA-Cw 320 rev
HLA-Cw4 94-233	417	94A HLA-CWfor	HLA-Cw 233 rev
HLA-Cw4 1-114	342	1A HLA-Cwfor	HLA-Cw 114 rev
HLA-Cw4 207-320	339	207A HLA-Cwfor	HLA-Cw 320 rev

Die PCR-Amplifikate wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 5.20 A). Da nicht alle Konstrukte optimal amplifiziert wurden, erfolgte anschließend eine Gradienten-PCR bei der für die einzelnen Konstrukte die optimale Anelatingtemperatur der beiden Primer ermittelt wurde (Abb.5.20 B). Am Beispiel des HLA-Cw4-Konstruktes HLA-Cw4 94-233 konnte die optimale Anelatingtemperatur für die 2 Primer 94A HLA-Cwfor und HLA-Cw 320 rev bei 63,9°C ermittelt werden. Für eine direkte Klonierung

wurde der pACT2-Vektor und die 6 Inserts mit den spezifischen Restriktionsenzymen *Nco* I und *Xho* I geschnitten. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung und Aufreinigung aus dem Gel, erfolgte die Ligation der Inserts mit dem pACT2-Vektor sowie anschließendes Ausplattieren des Ligationsansatzes auf 2YT-Amp Platten. Die Klonierung blieb erfolglos.

Alternativ wurde die Klonierung über einen Übergangsvektor pSSTA durchgeführt laufen zulassen. Dabei wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym *Xcm* I geschnitten. Dieses Restriktionsenzym produziert TA-Überhänge, die eine zusätzliche Restriktion der Inserts umgehen, da diese durch PCR schon TA-Überhänge besitzen. Jedoch blieb dieser Versuch der indirekten Klonierung auch erfolglos



**Abb.5.20: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der HLA-Cw4-Konstruktein**

**A: PCR für die Amplifizierung aller HLA-Cw4-Verkürzungsmutanten aus dem Vektor H1 pZeoSV2(+): 1:** Marker, **2:** HLA-Cw4 full length (960 bp), **3:** HLA-Cw4 1-162 (486 bp), **4:** HLA-Cw4 162-320 (471 bp), **5:** HLA-Cw4 94-23 (417 bp), **6:** HLA-Cw4 1-114 (342 bp), **7:** HLA-Cw4 207-320 (339 bp), **8:** Negativkontrolle

**B: Gradienten-PCR am Beispiel des HLA-Cw4 94-233-Konstruktes 417 bp): 1:** 55°C, **2:** 55,2°C, **3:** 55,8 °C, **4:** 56,7°C, **5:** 57,8°C, **6:** 59,1°C, **7:** 60,4°C, **8:** 60,7°C, **9:** 62,9°C, **10:** 62,9°C, **11:** 63,9°C, **12:** 64,6°C, **13:** 64,9°C

## 6. Diskussion

Neben der Suche nach einem neutralisierenden Impfstoff gegen HIV, um Neuinfektionen zu verhindern, steht besonders auch das Erringen neuer Erkenntnisse über die Pathogenese von HIV im Mittelpunkt, um die Erkrankung bzw. die dadurch hervorgerufene Immunsuppression besser verstehen zu können.

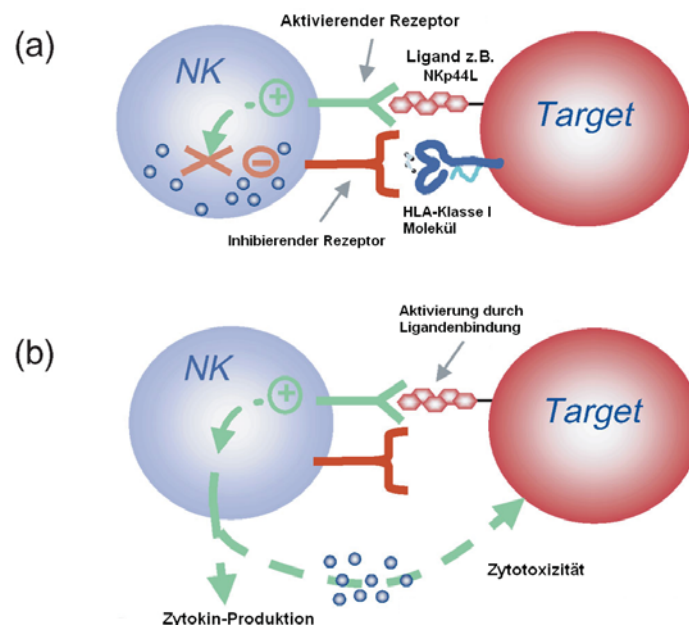
Dabei spielt das transmembrane Hüllprotein gp41 eine wichtige Rolle, für das in verschiedenen Studien, neben der Funktion der Membranfusion zwischen Wirtszelle und Virus, auch eine Funktion bei der Immunsuppression von HIV-1 zugeschrieben wird (Ruegg *et al.*, 1989; Denner *et al.*, 1996, 1998). Deshalb wurde nach einem putativen Rezeptor bzw. einem potentiellen Protein gesucht, das diesen Prozess im Organismus durch Interaktion mit gp41 initiiert. So konnte HLA-C in Interaktionsstudien als potentieller Interaktionspartner detektiert und im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion mit gp41 bestätigt werden. Für den Nachweis der Interaktion von TREM-1 und gp41 konnte keine Bestätigung erfolgen.

### 6.1 HLA-Cw4 als potentieller Interaktionspartner für die gp41-Ektodomäne

In einem *yeast two hybrid screen* mit Hilfe einer Leukozyten-Genbank konnte bei der Suche nach einem potentiellen Interaktionspartner für gp41 das HLA-Klasse I Molekül HLA-C gefunden werden. Um zu untersuchen, ob HLA-C mit dem transmembranen Hüllprotein gp41 interagiert, wurden deshalb *GST-pull down* Analysen mit unterschiedlichen gp41-Deletionsmutanten durchgeführt. Ein Ausschluss von unspezifischen Bindungen erfolgte durch Mitführen der zwei Negativkontrollen *GST-Sepharose-beads* und *GST*. So wurden 10 µg *GST-Fusionsproteine* mit *B-Zellysat* gekoppelt, welches HLA-Cw4 enthält.

Da im ersten *GST-pull down* Versuch eine unspezifische Bindung von HLA-Cw4 an die Negativkontrollen detektiert wurde (Abb.5.3), wurde zur Stringenzerhöhung ein Puffertest durchgeführt, bei dem die *beads* mit 9 unterschiedlichen Fusionspuffern vorinkubiert und anschließend mit HLA-Cw4 inkubiert wurden. Neben dem SET und TEN10-Puffer konnte auch der NETN20-Puffer erfolgreich eine unspezifische Bindung von HLA-Cw4 an die *beads* unterbinden (Abb 5.4 A, B) und wurde deshalb in den weiteren *GST-pull down* Analysen eingesetzt. So konnte im folgenden *pull down* eine starke Interaktion von *GST-rgp4K* und *GST-Δrgp4K*, sowie bei *GST-CHR4K* und *GST-NHR4K* mit HLA-Cw4 ein schwacher Hintergrund detektiert werden (Abb.5.6). Als Problem stellte sich aber die schwache Affinität von *GST-CHR4K* zu den *beads* im Vergleich zu den anderen *GST-Fusionsproteinen* dar, da trotz Einsatz der ermittelten Bakterienlysat-Volumina für 10µg *GST-CHR4K*, auf der PVFD-Membran nach Anfärbung nur eine geringe Menge an *GST-CHR4K* sichtbar war. So wurde im folgenden Versuch *GST-CHR4K* im Überschuss eingesetzt, um eine möglichst große Abdeckung der *beads* mit *GST-CHR4K* zu erhalten (Abb. 5.7). Außerdem wurde die Interaktionszeit von HLA-Cw4 und den gp41-Deletionsmutanten verkürzt, um nochmalig unspezifische Bindungen verhindern zu können. Im Ergebnis der Western Blot-Analyse konnte keine Bindung des HLA-Cw4 mit *NHR4K* detektiert, jedoch neben der Bindung von *GST-rgp4K* und *GST-Δrgp4K* eine Bindung von *GST-CHR4K* bestätigt werden.

Die Bestätigung der Interaktion zwischen HLA-Cw4 und gp41 spiegelt die Ergebnisse der italienischen Arbeitsgruppe um Antonio Siccardi wieder. So konnte diese in FACS-Analysen zeigen, dass eine rekombinante, lösliche gp41-Mutante (rgp41), welche die Ektodomäne ohne Fusionspeptid darstellt, an humane, leukämische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (MOLT3-Zellen), die HLA-Cw4 exprimieren, sowie an Zellen der B-Zelllinie 721.221, die stabil HLA-Cw4 transfiziert, bindet. Weiterhin konnte A.Siccardi bereits einen interagierenden Bereich auf Seiten von gp41 eingrenzen. Durch FACS-Analysen der italienischen Arbeitsgruppe konnte durch Kopplung von überlappenden Peptiden an HLA-Cw4, welche die Ektodomäne gp41 abdeckten, einzig Peptid#23 effektiv an HLA-Cw4 binden. Peptid #23 umfasst 5 Aminosäuren des Cystein-Cystein-Loop sowie 21 Aminosäuren der C-terminalen Region von gp41. Das deckt sich mit der im *pull down* detektierten Bindung von HLA-Cw4 und GST-CHR4K, da GST-CHR4K die 21 Aminosäuren beinhaltet, die ebenfalls Peptid#23 aufweist. Außerdem enthält dieser Bereich auch das im Ergebnisteil in Abbildung 5.8 aufgeführte 3S-Peptid. So konnte für das von gp41 abgeleitete 3S-Peptid in Studien mit HIV positiven Patienten gezeigt werden, dass es bei CD4<sup>+</sup>-Zellen durch Anwesenheit des von gp41 abgeleiteten 3S-Peptid zu einer vermehrten Expression von NKP44-Liganden auf der Zelloberfläche kommt (Vieillard *et al.*, 2005). NKP44L ist ein aktivierender Ligand der nur auf CD4<sup>+</sup>-Zellen vorkommen kann, bei Stresssituationen gebildet wird und bei Vorhandensein die Zelle sensibler für Apoptose und NK-vermittelnde Zellyse macht. Dabei wiesen 3-32% der CD4<sup>+</sup>-Zellen von HIV positiven Patienten NKP44L auf ihrer Oberfläche auf, was bei HIV negativen Patienten nicht der Fall war. Durch Einsatz von 3S-Antikörpern, welche nachweislich in Zusammenhang mit der Expression von NKP44L durch das 3S-Peptid, konnte die Expression von NKP44L hemmt werden. Der entsprechende Rezeptor für NKP44L ist NKP44, der zu der Familie der *Natural Cytotoxicity Receptors* (NCR) und auf der Oberfläche von aktivierten NK-Zellen vorkommt. Durch die Erkennung von NKP44L kann die Zerstörung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen unabhängig von HLA-Molekülen durch NK-Zellen initiiert werden.

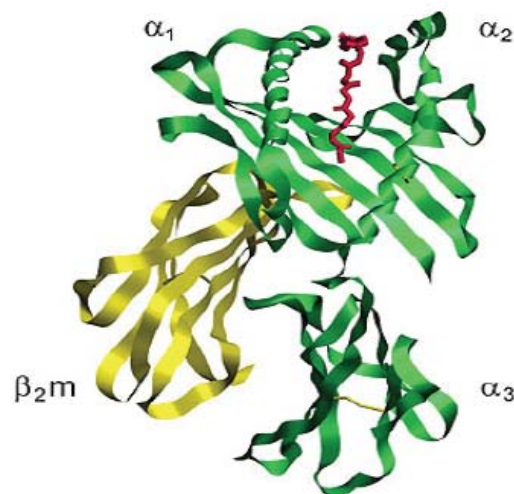


**Abb.6.1: Natürliche Killerzell-Aktivierung unter Kontrolle von inibierenden und aktivierenden Rezeptoren**

a) Durch Erkennen des HLA Klasse I Moleküls mittels inibierender Rezeptoren kommt es zu keiner NK-Zell-Aktivierung, da der inibierende Effekt größer ist als der aktivierende Effekt; b) Auslösung der NK-Zell-Aktivierung durch Interaktion des NK-aktivierenden Liganden mit dem aktivierenden Rezeptor, hier bleibt der inibierende Effekt aus ([arthritis-research.com/content/6/1/8](http://arthritis-research.com/content/6/1/8))

In Abbildung 6.1 ist die „missing-self“-Hypothese von NK-Zellen dargestellt (Kärre, 1981) bei der NK-Zellen über inhibierende Rezeptoren insbesondere bei Interaktion mit HLA-C-Molekülen in ihrer Funktion gehemmt (Hoglund *et al.*, 1997; Lanier *et al.*, 1997), durch Interaktion der aktivierenden Rezeptoren mit bestimmten Liganden wie NKp44L aktiviert werden und anschließend Zytokine ausschütten sowie die Apoptose induzieren (1.5.2).

Eine Eingrenzung des HLA-C-Bindungsbereiches konnte durch Sequenzierung des im *yeast two hybrid system* detektiertes HLA-C-Klons 231 vorgenommen werden, da die Aminosäuresequenz von 231 eine Homologie von 92,4 % zu der  $\alpha_2$ -Domäne von HLA-Cw4 aufwies (Abb.5.2). Dieses Ergebnis bestätigt wiederum den in der italienischen Arbeitsgruppe gefundenen Interaktionsbereich von HLC-Cw4. In deren Studien konnte der Bindungsbereich von HLA-Cw4 für rgp41 auf die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne der schweren Kette eingrenzt werden. Dabei wurden 3 verschiedene Antikörper an HLA-Cw4 transfizierte Zellen gekoppelt, die spezifisch für bestimmte Abschnitte der schweren und leichten Kette von HLA-Cw4 sind. Durch Koimmunpräzipitationsanalysen konnte nur eine Inhibition der Bindung von rgp41 an die Zellen durch den L31-Antikörper erfolgen, die Antikörper TP.2599 und BBM.1, welche für die  $\alpha_3$ - Domäne bzw.  $2\beta$ Mikroglobulin spezifisch sind, zeigten keine Einschränkung der rgp41-Bindung an HLA-Cw4. Abbildung 6.2 zeigt schematisch den Bindungsbereich von Peptiden in der Bindungstasche von HLA-Cw4, in der auch die Bindungsstelle für gp41 lokalisiert werden konnte. Dieser Bereich stellt allgemein die Bindungsstelle für Peptide dar, die auf Zellen für T- und NK-Zellen präsentiert werden sollen.



**Abb.6.2: Schematische Darstellung des Bindungsbereichs des HLA-Cw4-Bereichs mit gp41 am Beispiel des löslichen Teils von HLA Klasse I Molekülen**

Das gebundene Peptid, hier rot dargestellt, liegt in der von der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne gebildeten Bindungstasche.  
<http://expneu.softimpulse.de/expneu2/lehre/biochemie/vorlesungen/regul/vortrag/Antigenpraesentation.pdf>

Eine relativ simple Erklärung für die Interaktion von gp41 mit HLA-Cw4, könnte in der Funktion von HLA-Cw4 selbst begründet sein. Da HLA-Klasse I Moleküle Peptide auf ihrer Oberfläche präsentieren, könnte ein Abschnitt von Peptid#23 ein zu präsentierendes Peptid darstellen, dass durch Restriktion entweder des Vorläuferproteins gp160 oder durch Restriktion von gp41 entsteht. Diese Hypothese korreliert mit dem Ergebnis der Arbeitsgruppe um A. Siccardi, die nachwies, dass Peptid#23 nicht an den funktionellen Trimer-Komplex, der aus 2 schweren Ketten,  $\beta_2$ -Mikroglobulin und einem Peptid besteht, bindet, sondern nur mit dem leeren Komplex, ohne Peptid, bzw. nur mit der schweren



Kette ohne Peptid und  $\beta$ 2-Mikroglobulin interagiert. So wurden Lysate, die einen leeren Komplex von HLA-Cw4 beinhalten, jeweils mit den unterschiedlichen Antikörpern L31, W6/32, der spezifisch für HLA-Trimer-Komplexe ist und BBM.1, welcher das  $\beta$ 2-Mikroglobulin erkennt, inkubiert, wobei nur Antikörper L31 eine spezifische Bindungsstelle in der schweren Kette hat. Anhand der Ergebnisse konnte keine Reaktivität von Peptid#23 mit Komplexen im Lysat detektiert werden, welches vorher mit L31 inkubiert wurde, festgestellt werden. Da schon Epitopabschnitte von gp41 bekannt sind, die von HLA-Klasse I Molekülen für zytotoxische T-Zellen präsentiert werden (Johnson *et al.*, 1992), ist das die wahrscheinlichste Hypothese.

Eine extrazelluläre Bindung von gp41 an HLA-Cw4 könnte durch eine hohe Affinität von gp41 und somit die Verdrängung des an HLA gebundenen Antigens zustande kommen, dafür müsste aber der notwendige gp41-Abschnitt frei zugänglich sein, was wiederum eine vorangegangene gp120-Konformationsänderung notwendig macht. Diese läge bei der Rezeptorerkennung durch gp120 vor. So könnte gp41 nach oder während der Ausbildung des 6-Helix-Bündels mit HLA-Cw4 interagieren. Jedoch stellt sich die Frage, was diese bewirken könnte. Eine Hypothese wäre, dass durch die Bindung von gp41 bzw. ein Bereich von gp41, HLA-C nicht mehr zugänglich für die NK-inhibierenden Rezeptoren von NK-Zellen ist und so eine Aktivierung dieser erfolgt. Das korreliert mit der Überexpression von NKP44L bei Vorhandensein des 3S-Peptides, wobei bei beiden Wegen eine Zellyse bzw. die Zellapoptose initiiert werden würde (Vieillard *et al.*, 2007).

In Verbindung mit einer möglichen Rezeptorfunktion von HLA-C für gp41 wurde in weiteren Versuchen der italienischen Arbeitsgruppe gezeigt, dass HLA-Cw4 negative Zellen mit HIV zwar infiziert werden konnten, die Effizienz dabei aber 1000fach schwächer war als bei HLA-Cw4-positiven Zellen. Weiterhin konnte bei HLA-Cw4-positiven Zellen eine höhere provirale DNA-Konzentration gemessen werden als bei HLA-Cw4-negativen, was eine schnellere Infektion bei Vorhandensein von HLA-Cw4 vermuten lässt. Dieses Ergebnis konnte in einem anschließenden Fusionsassay bestätigt werden, bei dem neben der HLA-Cw4 B-Zelllinie 721.221 auch eine B-Zelllinie 721.221, die stabil HLA-Cw3 transfiziert, mit getestet wurde. Das Ergebnis war gleich dem der B-Zelllinie 721.221 mit HLA-Cw4, so dass man davon ausgehen kann, dass HLA-Cw4 nicht das einzige HLA-C-Allel ist, welches mit gp41 bzw. Peptiden von gp41 interagiert. In diesem Zusammenhang wurde auch postuliert, dass HLA-C positive Zellen, die mit gp120/gp12 koexprimieren, schneller fusionieren können als HLA-C negative Zellen (Matucci *et al.*, 2008). Ferner konnte auch eine Inkorporation von HLA-C in die HIV-Membran gezeigt werden, wodurch die Hypothese aufgestellt wurde, dass HLA-C mit dem gp120/gp41-Komplex oder mit HIV-spezifischen Rezeptoren bzw. Korezeptoren interagieren könnte und so eine Erhöhung der Infektiosität bewirkt. Ferner könnte durch Vorhandensein von HLA-C auf der Virusmembran die Infektion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen möglich gemacht werden. So wurde in Studien von Saha gezeigt, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von HIV-1 infiziert werden können (Saha *et al.*, 2001). Geht man davon aus, dass HLA-C eine Konformationsänderung von gp120 auslösen könnte, hätte so gp41 die Chance, eine Fusion des Virus mit der CD8<sup>+</sup>-Zellmembran einzuleiten.

In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass die Expression des HIV-kodierten Proteins Nef zu einer verminderten Expression von HLA-A und HLA-B Molekülen auf der Oberfläche von Zellen führt. Die Expression von HLA-C und HLA-E Molekülen, die durch verschiedene NK-Zellrezeptoren erkannt werden, aber nicht beeinflusst wird (Cohen *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 1998). Es wird davon ausgegangen, dass dadurch die zytotoxische T-Zellantwort im Organismus unterdrückt werden soll, so

dass infizierte Zellen nicht erkannt und zerstört werden. So könnte auch weiter vermutet werden, dass durch das geringe Vorhandensein von HLA Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche die Wahrscheinlichkeit der zytotoxischen T-Zellerkennung reduziert ist, die geringe Expressionsrate von HLA-C aber dem Virus dadurch von Vorteil ist, dass es zu keiner Aktivierung von NK-Zellen kommt. So würde eine vorzeitige Apoptose von infizierten Zellen inhibiert werden.

Eine zusätzliche Bestätigung der Interaktion von gp41 und HLA-Cw4 durch die Hemmversuche mit Peptid#23, bei denen durch Kopplung des Peptids an HLA-Cw4 die Bindung von gp41-Deletionsmutanten unterbunden werden sollte, konnte nicht erreicht werden. Dabei stand nur Peptid#23 gelöst in DMSO zur Verfügung. Zuerst wurden unterschiedliche Konzentrationen (10 µg, 25µg, 50µg) von Peptid#23 parallel mit HLA-Cw4 zu den *beads* sowie GST-rgp4K gegeben. So wurde zwar keine unspezifische Bindung von HLA-Cw4 an die *beads*, jedoch mit steigender Peptidkonzentration auch eine steigende Bindungsstärke von HLA-Cw4 an GST-rgp4K detektiert werden. Im 2. Ansatz wurde HLA-Cw4 erst mit Peptid#23 vorinkubiert und dann die Suspension zu den Fusionsproteinen gegeben. So konnte bei allen Proben (GST-rgp4K, GST-NHR4K, GST sowie *beads* allein) eine Bindung, sowie die Bindungszunahme bei Peptid#23 zunehmender Konzentration von Peptid#23 beobachtet werden (Abb.5.9). Deshalb wurden anschließend unterschiedliche Ansätze getestet, die Aussagen über den DMSO-Einfluss, sowie Inkubationsbedingungen geben sollten. Ansätze 4 und 5 ließen wieder eine Bindungszunahme mit Zunahme der Konzentration von Peptid#23 erkennen (Abb.5.10). Ein Unterschied von Ansatz 1 und 2 war nicht zu erkennen, wobei man darauf schließen kann, dass durch Vorinkubation von HLA-Cw4 bei 4°C kein Einfluss auf die Bindungsfähigkeit hat. Bei Ansatz 3 kann eindeutig gezeigt werden, dass DMSO unspezifische Bindung fördert, da HLA-Cw4 allein an die *beads* band.

Als weitere Analysemethoden der Interaktion von HLA-Cw4 mit dem transmembranen Hüllprotein gp41 könnten zum einen BIAcore-Versuche gemacht werden, durch die ebenfalls die Bindung detektiert und auch quantitativ bewerten werden kann. Es kann aber auch weiterhin ein weitere *yeast two hybrid*-Versuch durchgeführt werden. Dabei sollten die durchgeführten Klonierungsversuche von HLA-Cw4-Mutanten als Vorarbeit durchgeführt werden, um so den Interaktionsbereich von HLA-Cw4 nochweiter eingrenzen zu können.

Dabei konnten die HLA-Cw4-Deletionsmutanten zwar erfolgreich amplifiziert werden, jedoch war die Ausbeute der Amplifikate sowie der danach mit *Nho I* und *Xho I* geschnittenen DNA-Produkte nach Gelextraktion sehr gering, was die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Ligation und Transformation verringern könnte. So könnte man versuchen, die DNA-Ausbeute durch stringenteres Verfahren der Gelextraktion bzw. die Menge von Ausgangsmaterial für Insert und Vektor zu erhöhen. Durch die Kürze des Praktikums konnte der Klonierungsversuch noch nicht optimiert werden.



## 6.2 TREM-1 als potentieller Interaktionspartner für die gp41-Ektodomäne

In einem vorangegangenen *yeast two-hybrid screen* konnte TREM-1 als potentieller Interaktionspartner mit den gp-41 Konstrukten  $\Delta$ NHR und  $\Delta$ rgp identifiziert werden.

Um die Interaktion von TREM-1 mit der Ektodomäne von gp41 zu verifizieren, wurde folgend GST-*pull down* Versuche mit dem vom Institut für Immunologie aus Mainz zur Verfügung gestellten rsTREM-1 sowie unterschiedlichen Deletionskonstrukten von gp41 durchgeführt, da es nicht gelungen war TREM-1 selber herzustellen. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden weiterhin die *beads* allein und das GST-Protein als Negativkontrolle mitgeführt. Jedoch konnte neben der Bindung an alle Proben auch eine unspezifische Bindung von rsTREM-1 an die Negativkontrollen detektiert werden (Abb.5.12). Um diese zu unterbinden, wurden die *beads* zusätzlich mit Magermilchmuller abgesättigt, was jedoch die Bindungen nicht inhibierte (Abb.5.13). Deshalb sollte anschließend für den GST-*pull down* eine Erhöhung der Stringenz durch Einsatz unterschiedlicher Fusionspuffer erfolgen (Abb.5.14). Zusätzlich wurde die Interaktionszeit von rsTREM-1 mit den GST-Fusionsproteinen verkürzt. Trotz zahlreicher Optimierungsversuche konnten die unspezifischen Bindungen an die Negativkontrollen nicht verhindert werden. So wurde ferner ein *pull down*-Versuch mit *Dynabeads*® Streptavidin M-280 durchgeführt, an welche biotinylierte ISU-Peptide bzw. randomisierte biotinylierte ISU-Peptide gekoppelt wurden (Abb.5.15). Die Western Blot-Analyse zeigt eine verstärkte Bindung des rsTREM-1 an das randomisierte biotinylierte ISU-Peptid, wohingegen nur eine schwache Bindung zwischen rsTREM-1 und dem biotinylierten ISU-Peptid zu beobachten war. Sowohl in den GST-*pull down* Versuchen als auch in den *pull downs* mit den *Dynabeads* konnte durch das Vorhandensein von unspezifischen Bindungen keine Aussage über die Interaktion von rsTREM-1 und gp41 getroffen werden. Für einen weiteren Ansatz war die Analyse mit Hilfe der Koimmunpräzipitation durchgeführt worden, bei der diesmal rsTREM-1 gebunden an der Matrix vorlag. Dabei wurde zuerst der  $\alpha$ -TREM-1 Mainz Antikörper an die Protein G-*beads* gebunden, parallel dazu erfolgte die Inkubation von rsTREM-1 und den GST-Fusionsproteinen GST-rgp4K, GST-NHR4K und GST-CHR4K. Danach wurden die *beads* mit den rsTREM-1/GST-Fusionsprotein-Komplexen inkubiert. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse konnte aber nur der  $\alpha$ -TREM-1 Mainz-Antikörper detektiert werden. So wurde im 2. Versuch zuerst rsTREM-1 mit den  $\alpha$ -TREM-1 Mainz-Antikörper an die *beads* gekoppelt und dann erst die Fusionsproteine hinzugegeben (Abb.5.16).

Das Ergebnis der durchgeführten Koimmunpräzipitation zeigte eine Interaktion von rsTREM-1 mit den gp41-Konstrukten GST-CHR4K und GST-rgp4K (Abb.5.17). GST-NHR4K interagiert nicht mit rsTREM-1, was dem *yeast two-hybrid screen* widerspricht, da ja dort TREM-1 mit  $\Delta$ NHR gefunden werden konnte.

So wurden bei der anschließenden Koimmunpräzipitation parallel 2 Inkubationen angesetzt, bei der einmal das gebundene rsTREM-1 jeweils mit GST-CHR4K und GST-NHR4K, und einmal die *beads* ohne rsTREM-1 als Negativkontrollen jeweils mit GST-CHR4K und GST-NHR4K gekoppelt wurden. Bei den Negativkontrollen wurden aber die *beads* vorher mit dem  $\alpha$ -TREM-1 Mainz-Antikörper inkubiert, da man davon ausgehen musste, dass die *bead*-Antikörper-Komplexe bei einer Kopplung mit rsTREM-1 nicht vollständig abgesättigt sind, und es auch da zu unspezifischen Bindungen von GST-Fusionsproteinen an die Antikörper kommen könnte. So bestätigte der Versuch zwar die Bindung von GST-CHR4K an rsTREM-1, jedoch konnte auch eine Bindung von GST-CHR4K an die

*beads* alleine detektiert werden. Im Gegensatz dazu interagierte GST-NHR4K nicht mit rsTREM-1, jedoch aber mit den *beads* allein (Abb.5.18). Da der rsTREM-1-Vorrat nicht mehr für 3 GST-Fusionsproteine zur Verfügung stand, wurde rgp4K nur als Negativkontrolle mitgeführt, wobei bei dieser keine Bindung detektiert werden konnte. Bezieht man sich dabei auf das Ergebnis der Western Blot-Analyse von Abbildung 5.18, bei der eine Bindung von GST-rgp4K an rsTREM-1 detektiert werden konnte, wären nachfolgende Koimmunpräzipitationsversuche sehr interessant.

Eine Erhöhung der Stringenz des Versuchsansatzes mit den einzelnen GST-Fusionsproteinen oder eine Veränderung der Inkubationszeit könnte möglicherweise die Interaktion von GST-rgp4K mit rsTREM-1 bestätigen und den Interaktionsbereich auf gp41 noch weiter eingrenzen. Ein *yeast two hybrid*-Versuch mit gp41-Deletionsmutante CHR, die die carboxyterminale Region von gp41 darstellt, könnte außerdem weiteren Aufschluss bringen, jedoch blieben die Klonierungsversuche für diese Mutante bis jetzt erfolglos.

Warum für GST-NHR4K keine Bindung gezeigt werden könnte, ist fraglich. Es kann jedoch vermutet werden, dass gp41 möglicherweise zwei Bindungsstellen für TREM-1 besitzt, die einerseits auf dem aminoterminalen und andererseits auf dem carboxyterminalen Bereich von gp41 lokalisiert sind. Das kann durch BIAcore-Versuche nachgeprüft werden, da dort das Bindungsverhältnis der Proteine zueinander in Interaktionsanalysen untersucht werden kann.

## **Funktionelle Interaktion von TREM-1 mit gp41**

TREM-1 ist ein noch recht unbekanntes Protein, dem eine Funktion als Vermittler zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort zugeschrieben wird (Bleharski *et al.* 2003) und das als Verstärker der inflammatorischen Immunantwort im Organismus fungiert (1.6).

Im *yeast two hybrid screen* wurde der Klon 95 detektiert, welcher eine Homologie zu beiden Formen von TREM-1, der gebundenen und der löslichen, im aminoterminalen Bereich aufweist (Abb.5.11).

Weiterhin konnte in einem durchgeführten Mikroarray der Arbeitsgruppe, bei dem die Genexpression von 29098 humanen Genen durch Inkubation von PBMCs mit dem ISU-Petid von gp41 analysiert wurde, neben einer erhöhten Expression von Metalloproteinase 1 (MMP-1) und Zytokinen wie IL6, IL-8 und IL-1 $\beta$  auch eine Hochregulation der TREM-1-Expression detektiert werden. In anschließenden real time PCR-Analysen, bei der die Expression der jeweiligen Gene auf mRNA Ebene untersucht wurde, konnte gezeigt werden das, das veränderte Expressionsprofil nicht durch eine durch das Isu-Petid Homopolymer induzierte Hochregulation, sondern durch die Verhinderung der Herunterregulation von TREM-1 im Vergleich zu unbehandelten PBMCs entstanden ist.

Bei ELISA-Versuchen (*enzyme linked immunosorbent assay*) der Arbeitsgruppe konnte auch sTREM-1 nach Inkubation der PBMCs mit dem Isu-Petid Homopolymer in einer geringen Konzentration nachgewiesen werden, wohingegen bei unbehandelten PBMCs kein sTREM-1 nachgewiesen werden konnte. Wenn man von der *shedding*-Variante zur Bildung von sTREM-1 ausgeht, die durch Matrixmetalloproteinasen initiiert wird (Gomez-Pina *et al.*, 2007), für die im Mikroarray ebenfalls eine Erhöhung der Expressionsrate nachgewiesen wurde, könnte durch anhaltende rsTREM-1 eine Bindung der mit TREM-1 interagierenden Proteine hemmt und so eine Inflammatorische Reaktion unterdrückt werden.

Da Klon 95 eine Aminosäuresequenz darstellt, die in beiden Formen, TREM-1 und rsTREM-1, vorkommt, ist so auch eine Interaktion von gp41 mit sTREM-1 möglich, die wiederum die Interaktion von potentiellen löslichen Proteinen mit sTREM1 verhindern und somit die inflammatorische Funktion von TREM-1 steigern würde, da die antagonistische Wirkung von rsTREM-1 wegfällt. Das würde zu einer gesteigerten Immunantwort führen. Außerdem würde die stete Zytokinausschüttung zu einer Dysregulation der Zytokinproduktion führen, wobei für das CSK-17-Peptid und das ISU-Peptid von HIV-1 (Denner, 1998) schon ein Einfluss auf die Zytokinregulierung nachgewiesen werden konnte (Kedzierska *et al.*, 2001). Auch konnte bei vielen Infektionskrankheiten ein Ungleichgewicht der Produktion von Zytokinen gezeigt werden (Faxvaag *et al.*, 1995).

Eine Überexpression an TREM-1 konnte bei Neutrophilen beobachtet werden, die mit einer Filovirus Exposition eingegangen war. Zu den Filoviren gehören auch das Marburg- und dem Ebola-Virus, welche in Primaten hämorrhagisches Fieber auslösen können. Außerdem konnte eine Aktivierung der TREM-1 spezifischen Signalkaskade in Neutrophilen, initialisiert durch das Marburg- und Ebola-Virus durch Gabe von zusätzlichem sTREM-1 inhibiert werden (Mohamadzadeh *et al.*, 2006).

So konnte in Studien eine Homologie des gp120/gp41-Komplexes von HIV-1 zum Hüllprotein des Ebola-Virus, das aus den Proteinen GP1, gleichzusetzen mit gp120, und GP2, welches wie gp41 die Membranfusion vermittelt, festgestellt werden (Malashkevich *et al.*, 1999). Außerdem konnte auf GP2 ein Bereich ausgemacht werden, der eine Homologie mit der immunsuppressiven Domäne von Retroviren aufweist (Volchkov *et al.*, 1992) (Abb.6.3).



**Abb.6.2: Vorläuferpeptid von GP1 und GP2 des Ebola-Virus (Malashkevich *et al.* 1999).**

Die Glykoproteine GP1 und GP2 in Ebola werden aus einem gemeinsamen Vorläuferpeptid gespalten. FP = Fusionspeptid, TM = Transmembranbereich. Schwarz hervorgehoben ist das immunsuppressive Motiv in GP2.

Da TREM-1 wie schon erwähnt noch ein recht unerforschtes Protein ist, kann eine Funktion der von TREM-1 bzw. sTREM-1 nur vermutet werden. Eine Optimierung der Interaktionsanalysen oder anschließende BIAcore-Versuche würden zumindest eine Klärung der Interaktionsfrage klären.

## 7. Zusammenfassung

Der Mechanismus, wie HIV im menschlichen Organismus eine Immunsuppression und das Immundefizienz-Syndrom AIDS auslösen kann, ist immer noch ungeklärt. In jüngster Zeit häufen sich Beweise, dass das transmembrane Hüllprotein gp41 neben der Membranfusion bei der Infektion auch eine wichtige Rolle bei der Hemmung des Immunsystems spielt. Da jedoch noch kein potentieller Interaktionspartner für gp41 gefunden werden konnte, der diesen Zusammenhang erklärt, sollte im ersten Teil der Bachelorarbeit die Interaktion von gp41 mit dem HLA-Klasse I Molekül HLA-Cw4 untersucht werden. HLA-Cw4 gehört zu den Antigenpräsentierenden Molekülen, die durch Interaktion mit inhibierenden Rezeptoren von NK-Zellen eine Zellapoptose inhibieren oder durch Interaktion mit Rezeptoren von zytotoxischen T-Zellen, die Fremdpeptide erkennen können, eine Zellapoptose aktivieren können.

So konnte mittels *GST-pull down*-Analysen eine Bindung des HLA-Cw4-Proteins an die gp41-Deletionsmutanten  $\Delta$ rgp4K, rgp4K sowie CHR4K bestätigt werden. Das korreliert mit den Ergebnissen der italienischen Arbeitsgruppe um A. Siccardi, die ebenfalls eine Bindung von HLA-Cw4 an gp41, im Bereich von 5 Aminosäuren des Cystein-Cystein-Loop und 21 Aminosäuren auf der c-terminalen helikalen Region (CHR) der gp41-Ektodomäne beschrieb. Ob diese Bindung von gp41 mit HLA-Cw4 einen Einfluss auf die Immunsuppression hat, ist noch unklar, jedoch könnte dadurch gp41 einen direkten Einfluss auf HLA-Klasse I erkennende NK-Zellen sowie CTL-Zellen haben.

Um den Interaktionsbereich auf Seiten des HLA-Cw4-Proteins einzugrenzen, wurden Versuche unternommen HLA-Cw4-Verkürzungsmutanten in den pACT2-Vektor zu klonieren, die in weiteren *yeast two hybrid*-Analysen eingesetzt werden sollen. Weiterhin konnte durch die Sequenzierung des HLA-C-Klons 231, der in vorangegangenen *yeast two hybrid*-Analysen detektiert wurde, der Bindungsbereich von HLA-C für gp41 auf die  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domäne der schweren Kette begrenzt werden.

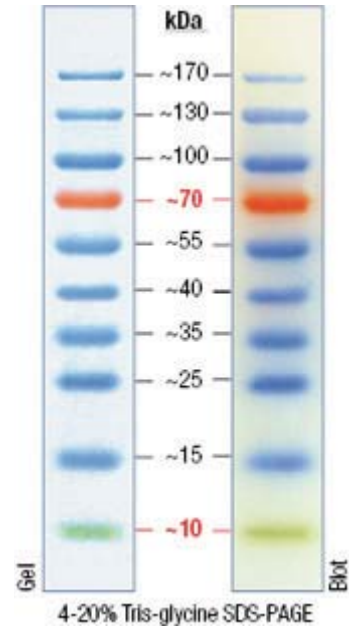
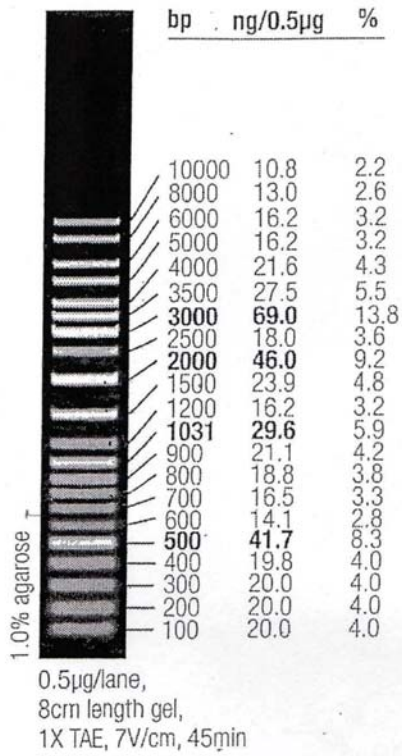
Im zweiten Teil der Bachelorarbeit sollte der potentielle Interaktionspartner TREM-1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells*) auf seine Bindung mit dem transmembranen Hüllprotein gp41 mittels *GST-pull down*-Analysen und Koimmunpräzipitation untersucht werden. Dabei konnten keine optimalen Reaktionsbedingungen für die *GST-pull down* Versuche und die Koimmunpräzipitation gefunden und die unspezifischen Bindungen von rsTREM-1 an die Negativkontrollen nicht gehemmt werden. Auch die Funktion einer möglichen Interaktion von TREM-1 mit gp41 ist noch unklar, so könnte gp41 dadurch eine modulierende Wirkung auf die Zytokinausschüttung, besonders auf TREM-1 regulierende inflammatorische Zytokine, im Organismus haben.

# Anhang

## Marker

O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use

PageRuler™ Prestained Protein Ladder



Revised 27.08.2004

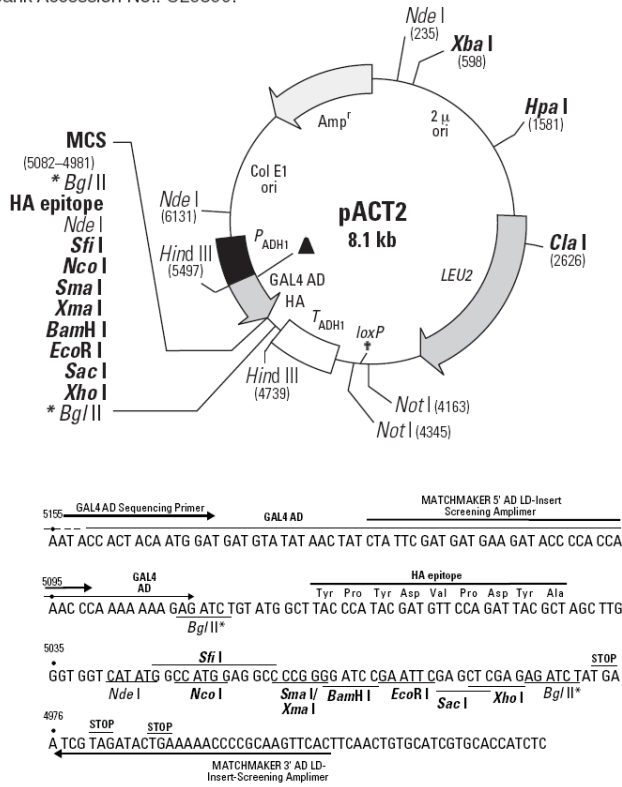


## Vektorkarten

### pACT2

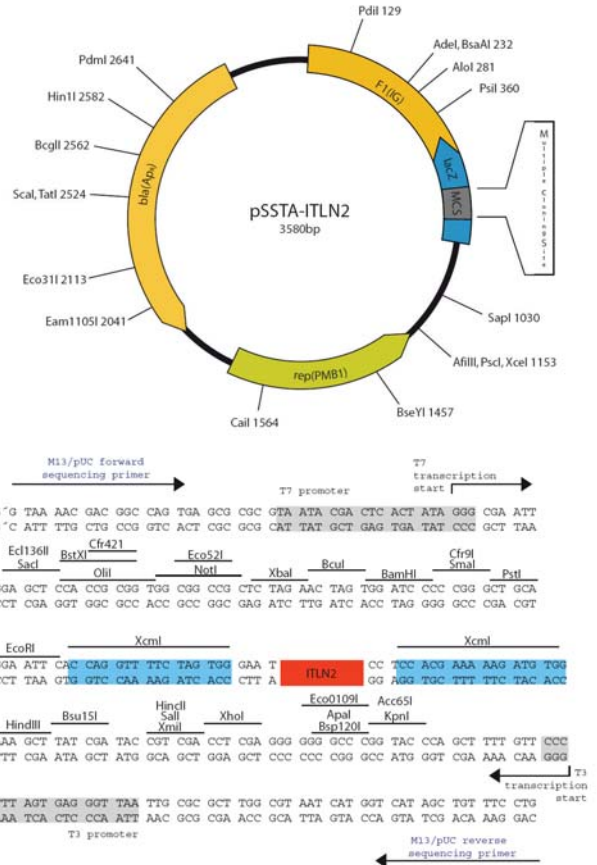
#### pACT2 AD Vector Information

GenBank Accession No.: U29899.

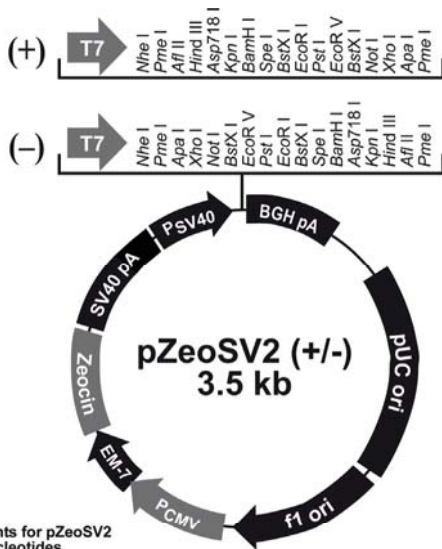


Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pACT2 AD. Unique restriction sites are in bold.

### pSSTA-ITLN2



### pZeoSV2 (+)



#### Comments for pZeoSV2 3515 nucleotides

- SV40 promoter: bases 10-356
- T7 promoter/primer: bases 401-420
- Multiple Cloning Site: bases 433-548
- BGH reverse priming site: bases 560-577
- BGH polyA: bases 560-773
- pUC origin: bases 814-1487
- f1 origin: bases 1780-2290
- CMV promoter: bases 2304-2930
- EM-7 promoter: bases 2931-2997
- Zeocin resistance gene: 2998-3372
- SV40 polyA: bases 3380-3515



## Literaturverzeichnis

- Alkhatib G., Broder C.C., Berger E.A., (1996): Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. *J Virol* 70:5487-94.
- Altfeld M., Kalife E.T., Qi Y., Streeck H., Lichterfeld M. (2006): HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8<sup>+</sup> T Cell Response against HIV-1. *PLoS Med* 3(10): 403.
- Armstrong, L., N. Jordan, A. Millar: Interleukin-10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax*. 51, 143-149 (1996).
- Armbruster C., Stiegler G.M., Vcelar B.A., Jäger W., Köller B., Jilch R., Ammann C.G., Pruenster M., Stoiber H., Katinger H. (2004): Passive immunization with the anti-HIV-1 human monoclonal antibody (hMAb) 4E10 and the hMAb combination 4E10/2F5/2G12. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(5):915-920.
- Arthos J., Deen K.C., Chaikin M.A., Fornwald J.A., Sathe G., Sattentau Q.J., Clapham P.R., Weiss R.A., McDougal J.S., Pietropaolo C., (1989): Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. *Cell*. 1989 May 5;57(3):469-81.
- B**altimore D. (1970): Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Biotechnology*. 1992; 24:3-5.
- Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, Vol 220, Issue 4599, 868-871.
- Beary T. P., Tencza S. B., T. A. Mietzner and R. C. Montelaro, Interruption of T-cell signal transduction by lentivirus lytic peptides from HIV-1 transmembrane protein. *J. Peptide Res.* 51 (1998), pp. 75–79.
- Begemann M. (1982): Das HLA-System des Menschen. *Med. Klein.* 77, pp14-15.
- Berkman, N., M. John, G. Roesems, P. J. Jose, P. J. Barnes, K. F. Chung (1995): *Inhibition of Macrophage Inflammatory Protein-1  $\alpha$  Expression by IL-10.* *J. Immunol.* 155, 4412-4418
- Biassoni, R., Pessino A., Malaspina A., Cantoni C., Bottino C., Sivori S., Moretta L., Moretta A. (1997): Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur. J. Immunol.* 27:3095–3099.
- Birnboim H C & Doly J' A. (1979): rapid alkaline extraction procedure. for. screening. recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res* 7:1513-23.
- Birnboim H C. (1983): A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzymology* 100:243-55
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., and Salazar-Mather, T. P. (1999): Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17, 189-220.
- Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C. (1987a): Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A 2. *Nature* 329; 506-512.
- Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C. (1987b): The foreign antigen binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329; 512-518.
- Bleharski, J.R., Kiessler, V., Buonsanti, C., Sieling, P.A., Stenger, S., Colonna, M. and Modlin, R.L., (2003): A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J. Immunol.* 170, pp. 3812–3818
- Bodmer W.F. (1987): The HLA system: structure and function. *J Clin Pathol.* September; 40(9): 948–958.

- 
- Borish, L., A. Aarons, J. Rumblyrt, P. Cvietusa, J. Negri, S. Wenzel(1996): Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97, 1288-1296
- Burton, D.R., Pyati, J., Koduri, R., Sharp, S.J., Thornton, G.B., Parren, P.W., Sawyer, L.S., Hendry, R.M., Dunlop, N., Nara, P.L. (1994): Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* 266, 1024–1027.
- Bottino C, Falco M, Parolini S, Marcenaro E, Augugliaro R, Sivori S, Landi E, Biassoni R, Notarangelo LD, Moretta L, Moretta A (2001): NTB-A, a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of NK cells to kill EBV-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease *The Journal of Experimental Medicine*, Volume 194, Number 3, August 6, 235-246
- Bouchon A., Dietrich J., Colonna M. (2000): Inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J. Immunol.* 164, pp. 4991–4995.
- Cao J., Bergeron L., Helse E. (1993): Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. *Journal of Virology* 67:2747–55.
- Centers for Disease Control (1981a): Pneumocystis pneumonia – Los Angeles, *MMWR Morb Mortal Weekly Report* 30:250-2.
- Centers for Disease Control (1981b): Kaposi’s sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men – New York and California, *MMWR Morb Mortal Weekly Report* 30:305-8.
- Centers for Disease Control (1981c): Follow-up on Kaposi’s sarcoma and Pneumocystis pneumonia, *MMWR Morb Mortal Weekly Report* 30:409-10.
- Centers for Disease Control (1993b): Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults, *MMWR Morb Mortal Weekly Report* 41(RR-17).
- Chan D., Fass, D., Berger, J., and Kim, P. (1997): Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89: 263–273
- Chan, Peter, Kim (1998): HIV Entry and Its Inhibition Cell. May 29;93(5):681-684.
- Chen Y H, Christiansen A, Bock G, (1995): HIV-2 transmembrane protein gp36 like HIV-1 gp41 binds to human lymphocytes and monocytes. *AIDS*, 9: 1193-1194.
- Chen Y., Xiao Y., Wu W., Zhao Y., Speth C., Dierich M. (1997): The immunosuppressive peptide of HIV-1 gp41 like human type I interferons up-regulates MHC class I expression on H9 and U937 cells *Volume 59, Issue 2, November* , Pages 93-97
- Chen Y., Cornelia Speth, Weicheng Wu, Gabriele Stockl, Yi Xiao, Tianwei Yu, Zhiyuan Ke, Yingxu Zhao, Manfred P. Dierich (1998): Antigenic characterization of HIV-1 gp41 binding proteins *Immunology Letters* Volume 62, Issue 2, June, Pages 75-79
- Chen, Y., Wu, W., Yang, J., Sui, S., Sun, J., Dierich, M. (1999): Antibodies against human IFN-alpha and -beta recognized the immunosuppressive domain of HIV-1 gp41 and inhibit gp41-binding to the putative cellular receptor protein p45. *Immunol. Lett.* 69: 253-257.
- Chien, C.T., P.L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582.
- Chuang, S. S., Kumaresan, P. R., and Mathew, P. A. (2001): 2B4 (CD244)-mediated activation of cytotoxicity and IFN-gamma release in human NK cells involves distinct pathways. *J Immunol* 167, 6210-6216.
- Cianciolo, G. J., Copeland, T. D., Oroszlan, S. & Snyderman, R. (1985). Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science* 230, 453-455

- 
- Clapham P.R., Blanc D., Weiss R.A. (1991): Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by Simian immunodeficiency virus. *Virology* 181:703-15.
- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F. (1986): isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS, *Science* 233:343-6.
- Cohen A., Subramanian R.A., Göttinger H. (1996): Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis *Current Topics in Microbiology and Immunology* ISSN 0070-217X vol. 214 (351 p.) (4 p.1/4), pp. 219-235.
- Cohen, G. B.; Gandhi, R. T.; Davis, D. M.; Mandelboim, O.; Chen, B. K.; Strominger, J. L. und Baltimore, D. (1999): The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells, *Immunity* 10 [6], Seite 661-71
- Collette, Y, Chang, H.-L., Cerdan, C., Chambost, H., Algarte, M., Mawas, C, Imbert, J, Burny, A, Olive, D. (1996): Specific Th1 cytokine down-regulation associated with primary clinically derived human immunodeficiency virus type 1 nef gene-induced expression Volume 156, *Issue 1*, 1 January, Pages 360-370
- Collins, K. L.; Chen, B. K.; Kalams, S. A.; Walker, B. D. und Baltimore, D. (1998): HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes, *Nature* 391 [6665], Seite 397-401
- Colonna M, Brooks E.G., Falco M., Ferrara G.B., Strominger J.L. (1993): Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science*. May 21;260(5111):1121-1124.
- Colonna, M., Samaridis J. (1995): Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 268:405.
- Colonna M. (2003): TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol* 3:445-53.
- Cotter S.M. and Essex M. (1977): Animal model: feline acute lymphoblastic leukemia and aplastic anemia. *Am J Pathol*. April; 87(1): 265-268.
- D**algleish A.G., Beverley P.C., Clapham P.R. (1984): The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-7.
- Daniel, M. D., Kirchoff, F., Czajak, S. C., Sehgal, P. K., Desrosiers, R. C. (1992): Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258(5090), 1938-41.
- Danielli C.M. Oliveira, Flavia F. , Maria Teresa Q. Marques, Sueli C.S. Carneiro, Luciane F.S. Pontes, Luis Cristovao M.S. Porto (2006): 173-P Is KIR genotype associated to psoriasis vulgaris in Brazilian? *Human Immunology Volume 67, Supplement 1*, October, Page S162
- Daws M.R., Lanier L.L., Seaman W.E. (2001): Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family. *Eur J Immunol* 31:783-91.
- De Cock K.M., Lucas S.B., Lucas S. (1993): clinical research, prophylaxis, therapy and care for HIV disease in Africa, *Am J Public Health* 83:1385-9.
- Degli-Esposti MA, Smyth MJ. (2005): Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol*. Feb;5(2):112-24
- Deng X., Ueda H., Su S.B., Gong W., Dunlop N.M., Gao J.L., Murphy P.M., Wang J.M. (1999): A synthetic peptide derived from human immunodeficiency virus type 1 gp120 downregulates the expression and function of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 in monocytes by activating the 7-transmembrane G-protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R. *Blood* 94:1165-1673
- Denner J, Vogel T, Norley S, Ennen J, Kurth R. (1993): The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and binding to lymphocyte surface proteins. *Int Conf AIDS*. Jun 6-11; 9: 179

- Denner, J., Persin, C., Vogel, T., Haustein, D., Norley, S., Kurth, R. (1996): The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 12: 442-450
- Denner, J. (1998): Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 862: 75– 86
- Denner J (2000): How does HIV induce AIDS? The virus protein hypothesis. *J Hum Virol* 2: 188.
- Denner J, Norley S, Kurth R., (1994): The immunosuppressive peptide of HIV-1 functional domains and immune response in AIDS patients. *AIDS.* Aug;8(8):1063-72.
- Denner J, Wunderlich V, Bierwolf D. (1986): Immunosuppression by retroviruses in tumors and immune deficiency diseases. *Arch Geschwulstforsch.*;56 (2):117-24
- Dent, P. (1972): Immunodepression by oncogenic viruses. *Prog. Med. V~rol* 14:1.Gallo S., Finnegan, C., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S., Puri, A., Durrell, S., and Blumenthal, R. 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 1614: 36–50.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP and Paxton WA (1996): HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381:667-673.
- Dubay J. W., Roberts S. J., Hahn B. H., Hunter E. (2007): Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *J. Virol.* 66 (1992), pp. 6616–6625.
- Dukers, D. F., Meij, P., Vervoort, M. B. H. J., Vos, W., Scheper, R. J., Meijer, C. J. L. M., Bloemena, E. & Middeldorp, J. M. (2000): Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *J Immunol* 165, 663–670.
- E**benbichler CF, Stoiber H, Schneider R, 1996: The human immunodeficiency virus type 1 transmembrane gp41 protein is a calcium-binding protein and interacts with the putative second-receptor molecules in a calcium-dependent manner. *J Virol* 70:1723-8.
- Este JA, Telenti A. (2007): HIV entry inhibitors. *Lancet .Review* Jul 7;370(9581):81-8.
- F**an QR, Wiley DC (1999). "Structure of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4, a ligand for the KIR2D natural killer cell inhibitory receptor." *J. Exp. Med.* 190 (1): 113–23.
- Faith A., R E O'Hehir, M Malkovsky, J R Lamb Analysis of the basis of resistance and susceptibility of CD4+ T cells to human immunodeficiency virus (HIV)-gp120 induced anergy. *Immunology* Jun 1992 (Vol. 76, Issue 2, Pages 177-84)
- Faxvaag A, Espevik T, Dalen A., (1995): An immunosuppressive murine leukaemia virus induces a Th1-->Th2 switch and abrogates the IgM antibody response to sheep erythrocytes by suppressing the production of IL-2. *Clin Exp Immunol. Dec*;102(3):487-95.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE and Berger EA (1996): HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872-877.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages *J Immunol* 1991; 147:3815-22. ( AN : 92043764 )
- Frankel, A.D. and Young, J.A.T. (1998): HIV-1: Fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 1–25
- Freed (1990): Characterization of the Fusion Domain of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein gp41, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4650-4654
- Freed, E.O., Myers, D.J., Risser, R. (1989): Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor pg160. *J. Virol.* 63: 4670-4675

- 
- Freed E.O., Delwart E.L., Buchschacher G.L., Panganiban T. (1992): A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. January 1; 89(1): 70–74
- Freed E.O., Englund G., Martin M.A. (1995): Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J Virol*. Jun;69(6):3949–3954.
- Freed EO, Martin MA (1995): The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem*. Oct 13;270(41):23883–23886.
- Fields, S. and Song, O. 1989. A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature* 340: 245–246.
- G**allagher WR. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell*. 1987 Jul 31;50(3):327-8.
- Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP (1983): isolation of a human T cell leukaemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science* 220:865-7.
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B (1984): Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 224(4648):500–503
- Gallo S.A., Finnegan C.M., Viard M. (2003): The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* 1614:36-50.
- Gao F., Yue L., Robertson D.L. (1994): Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* 68:7433-47.
- Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B. (2002): Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science*. Jun 28;296(5577):2354-60.
- Gattis JL, Washington AV, Chisholm MM, Quigley L, Szyk A, McVicar DW *et al.* (2006). The structure of the extracellular domain of triggering receptor expressed on myeloid cells like transcript-1 and evidence for a naturally occurring soluble fragment. *J Biol Chem* 281: 13396–13403.
- Gelderblom H.R. (1991): Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function, *AIDS* 5:617-637.
- Gelderblom H., H. Reupke, T. Winkler, R. Kunze and G. Pauli, M. (1987): HC antigens: Constituents of the envelopes of human and simian immunodeficiency viruses. *Z. Naturforsch.* 42 pp. 1328–1334.
- Gingras M.C., Lapillonne H., Margolin J.F. (2002): TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol Immunol* 38:817-24
- Gomez-Pina V., Soares-Schanoski A., Rodriguez-Roojas A. (2007): Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol* 179:4065-73
- Groop L, Koskimies S, Pelkonen R, Tolppanen EM (1983): Increased frequency of HLA-Cw4 in type 2 diabetes. *Acta Endocrinol (Copenh)*. Dec;104(4):475–478.
- Grunnet, N., Kristensen, T. & Kissmeyer-Nielsen, F. (1976): Cell mediated lympholysis in man. The impact of HLA-C antigens. *Tissue Antigens* 7, 301-309.
- Guillet JG, Lai MZ, Briner TJ, Smith JA, Geffer ML: Interaction of peptide antigens and class II major histocompatibility complex antigens. *Nature* 324; 260-262 (1986)
- Guan K. L., Dixon J. E. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem*. 1991;192:262–7.



---

Gultekin H, Heermann KH, (1988): The use of polyvinylidene fluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* 172:320-9.

Gurtler L.G., Hauser P.H., Eberle J. (1994): a new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon, *J Virol* 68:1581-5.

Guy B., Kieny M.P., Riviere Y., Le Peuch C., Dott K., Girard M., Montagnier, Lecocq J, (1987): HIV F/3' *orf* encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product *Nature* 330, 266 - 269

Gyader M, Emerman M, Sonigo P (1987): Genome organisation and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2, *Nature* 326:662-9

**H**araguchi, S., Good, R. A., Cianciolo, G. J., Engelman, R. W. & Day, N. K. (1997): Immunosuppressive retroviral peptides: immunopathological implications for immunosuppressive influences of retroviral infections. *Journal of Leukocyte Biology* 61, 654-666.

Harris DT, Cianciolo GJ, Snydermann R, (1987): Inhibition of human natural killer cell activity by a synthetic peptide homologous to a conserved region in the retroviral protein, p15E. *J Immunol* 138:889-94.

Hartley et al., 2005 O. Hartley, P.J. Klasse, Q.J. Sattentau and J.P. Moore, (2005): V3 HIV's switch-hitter, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21 pp. 171–189.

Haselmayer P., Grosse-Horvest L., von Landenberg P. (2007): TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* 110:1029-35.

Henderson LA, Qureshi MN. (1993): A peptide inhibitor of human immunodeficiency virus infection binds to novel human cell surface polypeptides. *J Biol Chem. Jul* 15;268(20):15291–15297.

Hillig, R. C., P. G. Coulie, V. Stroobant, W. Saenger, A. Ziegler, and M. Hulsmeier. 2001. High-resolution structure of HLA-A\*0201 in complex with a tumor-specific antigenic peptide encoded by the MAGE-A4 gene. *J. Mol. Biol.* 310:1167–1176

Hoglund, P., J. Sundback, M.Y. Olsson-Alheim, M. Johansson, M. Salcedo, C. Ohlen, H.G. Ljunggren, C.L. Sentman, and K. Karre. (1997): Host MHC class I gene control of NK cell specificity in the mouse. *Immunol. Rev.* 155:11-28.

Hope TJ. (1997): Viral RNA export. *Chem Bio. (May)*;4(5):335–344

Howard, J. C. (1995): Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr Opin Immunol.* 7: 69–76.

**I**shikawa, H., M. Sasaki, S. Noda, and Y. Koga. 1998. Apoptosis induction by the binding of the carboxyl terminus of human immunodeficiency virus type 1 gp160 to calmodulin. *J. Virol.* 72:6574–6580.

**J**acks T., Power M.D., Masiarz F.R., Luciw P.A., Barr P.J., Varmus H.E. (1988): Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature.* Jan 21;331(6153):280-3.

Jones P. L., Korte S., Blumenthal R. (1998): Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. *J Biol Chem* 273, 404–409

Joshi, S.B., Dutch, R.E., and Lamb, R.A. (1998): A core trimer of paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIVgp41. *Virology* 248, 20-34

**K**ahn J. O., Walker B. D. (1998): Current Concepts: Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, *N Engl J Med* 339:33-39

Kanki P.J., M'Boup S., Ricard D. (1987): human T-lymphotropic virus type 4 and the human immunodeficiency virus in West Africa, *Science* 236:827-31.

Kedzierska K, Crowe SM, Turville S, Cunningham AL., The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol.* 2003 Jan-Feb;13(1):39-56.



---

Kelker M., Foss T., Peti W., Teyton L., Kelly J., Wüthrich K., Wilson I. (2004): Crystal Structure of Human Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 (TREM-1) at 1.47 Å *Journal of Molecular Biology*, Volume 342, Issue 4, 24 September, Pages 1237-1248

Kiessling R, Klein E, Wigzell H. (1975): "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* Feb;5(2):112-7.

Kim J., Chwae Y.J., Kim M.Y. (1997): Molecular basis of HLA-C recognition by p58 natural killer cell inhibitory receptors. *J. Immunol.* 159 (8): 3875–82.

Kim E. M., K. H. Lee and J. W. Kim, (1999): The cytoplasmic domain of HIV-1 gp41 interacts with the carboxyl-terminal region of  $\alpha$ -catenin. *Mol. Cells* 9, pp. 281–285

Kim, J. T., E. M. Kim, K. H. Lee, J. E. Choi, B. H. Jhun, and J. W. Kim. (2002): Leucine zipper domain of HIV-1 gp41 interacted specifically with alpha-catenin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1**: Biochem Biophys Res Commun. 2002 Mar 15;291(5):1239-44.

Klas Kärre (1985): Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis. In: Mechanisms of NK cell mediated cytotoxicity. *Academic Press*, Orlando, S. 81–91

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.-C., and Montagnier, L. (1984): T-lymphocyte T4 Molecule Behaves As The Receptor For Human Retrovirus LAV. *Nature* 312, 767-768

Kleinermann ES, Lachmann LB, Knowles RD (1987): A synthetic peptide homologous to the envelope proteins of retroviruses inhibits monocyte-mediated killing by inactivating interleukin 1. *J Immunol* 139:2329-37.

Kloetzel, P. M. (2001): Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 179–187.

Kowalski M, Potz J, Basiripour L. (1987): Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 237:1351-5.

Kwong, P.D. (1998): Structure of an HIV gp120 Envelope Glycoprotein in complex with the CD4 Receptor and a Neutralizing Human Antibody. *Nature* 393:648-659.

Kyshe L, Anderson J, (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels. A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from Acrylamid to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10:203-9.

**L**aeemli UK, (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.

Lanier, L., (1997): "Natural killer cell receptors and MHC class I interactions," *Curr. Opin. Immunol.* 9(1):126-131,

Lasky LA, Nakamura G, Smith DH (1987): Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* 50:975–985.

Lawless M.K., Barney S., Guthrie K.I., Bucy T.B., Petteway S.R. Jr., Merutka G. (1996): HIV-1 membrane fusion mechanism structural studies of the interactions between biologically-active peptides from gp41. *Biochemistry.* 35:13697–13708.

Leonard C.K., Spellman M.W., Riddle L., Harris R.J., Thomas J.N., and Gregory T.J. (1990): Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 265:10373–10382.

Lieberman, J. (2003): Cell death and immunity: the ABCs of granulemediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 361–370.

- Malashkevich VN, Schneider BJ, McNally ML, Milhollen MA, Pang JX, Kim PS. (1999): Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 16;96(6):2662-7.
- Malissen, B., Kristensen, T., Goridis, C., Madsen, M. & Mawas, C. (1981): Clones of Human Cytotoxic T Lymphocytes Derived from an Allosensitized Individual: HLA Specificity and Cell Surface Markers *Scand. J. Immunol.* 14, 213-224.
- Mallon E, Newson R & Bunker CB. (1999): HLA-Cw6 and the genetic predisposition to psoriasis: a meta-analysis of published serologic studies. *J Invest Dermatol* 113: 693–695.
- Mangeny M. and Heidmann T. (2001) Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc.Natl. Acad.Sci.* U.95 (25):14920-14925
- Mangeny, M. & Heidmann, T. (1998): Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 14920±14925.
- Markowitz N., Hansen N.I., Wilcosky T.C. (1993): tuberculin and anergy testing in HIV-seropositive and HIV-seronegative persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group, *Ann Intern Med* 119:185-93.
- Matucci A., Rossolillo P., Baroni M., Siccardi A., Beretta A., Zipeto D., (2008): HLA-C increase the infectivity and is associated with gp120. *Retrovirology* 5:68
- Marx J.L. (1982): New disease baffles medical community, *Science* 217:618–21.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-73.
- Mitani M, Cianciolo GJ, Snyderman R, Yasuda M, Good RA, Day NK (1987): Suppressive effect on polyclonal B-cell activation of a synthetic peptide homologous to a transmembrane component of oncogenic retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 237
- Mohamadzadeh M, Coberley SS, Olinger GG, Kalina WV, Ruthel G, Fuller CL, Swenson DL, Pratt WD, Kuhns DB, Schmaljohn AL., (2006): Activation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 on human neutrophils by marburg and ebola viruses. *J Virol.* Jul;80(14):7235-44.
- Moretta, A., Vitale, M., Sivori, S., Bottino, C., Morelli, L., Augugliaro, J.L. (1993): Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science*, Vol 260, Issue 5111, 1121-1124.
- Moretta A. (2002): Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues *Nature Reviews Immunology* 2, 957-965.
- Muller W.E. Muller, H.C. Schroder, H. Ushijima, J. Dapper and J. Bormann (1992): Gp120 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell cultures: prevention by memantine, *Eur. J. Pharmacol.* 226 (1992) (3), pp. 209–214
- Murakami Y., Kohsaka H., Kitasato H. and Akahoshi T. (2007): lipopolysaccharide-Induced Up-Regulation of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Expression on Macrophages Is Regulated by Endogenous Prostaglandin E<sub>2</sub><sup>1</sup> *The Journal of Immunology*, 2007, 178: 1144-1150.
- Muster T. (1993): A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67, 6642-6647.
- Oostendorp, R. A. J., Meijer, C. J. L. M. & Scheper, R. J. (1993): Immunosuppression by retroviral-envelope-related proteins, and their role in non-retroviral human disease. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 14, 189-206.
- Ornstein L, 1964. Disc Electrophoresis – I. Background and theory. *Annals N.Y. Academy Sciences* 121:321.
- Qing R. Fan and Don C. (1999): Wiley Structure of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-Cw4, a Ligand for the KIR2D Natural Killer Cell Inhibitory Receptor *J. Exp. Med.*, Volume 190, Number 1, July 5, 113-124

---

Qureshi NM, Coy DH, Garry RF, Henderson LA. Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides. *Aids*. 1990;4:553–558.

**P**amer E and Cresswell P. (1998): MECHANISMS OF MHC CLASS I-RESTRICTED ANTIGEN PROCESSING. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 323-358.

Pereira F.B., Goñi F.M., Muga A., Nieva J. L. (1997): Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects. *Biophys. J.* 73:1977–1986.

Poignard B., Saphire O., Parren P., Burton R. (2001): GP120: Biologic Aspects of Structural Features Pascal, *Annual Review of Immunology Vol. 19:* 253-274.

Popovic M., Sarngaharan MG, Read E. (1984): Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS, *Science*. 224:497-500.

Preston B.D, Poiesz B.J, Loeb L.A (1988): Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242:1168-1171.

**R**adaev S., Kattah M., Rostro B., Colonna M., Sun P. (2003): Crystal Structure of the Human Myeloid Cell Activating Receptor TREM-1 . Structure , Volume 11 , Issue 12 , Pages 1527 – 1535.

Reisfeld RA, Lewis UJ, Williams DE, 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamid gels. *Nature* 195:281-3.

Rhee S.S. and Marsh J.W. (1994): Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. *J Virol*. August; 68(8): 5156-5163

Robert Koch Institut 2007. Epidemiologisches Bulletin Nr. 47. Stand: Februar 2008. <http://www.weltaidstag.com/data/weltaidstag/media/doc/Welt-Aids-Tag.pdf>

Ruegg, C., Monell, C., Strand, M. (1989): Inhibition of lymphoproliferation by a synthetic peptide with sequence identity to gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 63: 3257-3260.

**S**ackett, K., and Y. Shai. (2003): How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain. *J. Mol. Biol.* 333:47-58.

Saha K., Jianchao Zhang, Anil Gupta, Rajnish Dave, Meron Yimen & Bouchra Zerhouni (2001): Isolation of primary HIV-1 that target CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes using CD8 as a receptor *Nature Medicine* 7, 65 – 72.

Salter R.D., Norment A.M., Chen B. P., Clayberger C., Krensky A.M., Littman D.R., Parham P. (1989): Polymorphism in the or3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8. *Nature (Lond.)*. 338:345-347.

Sangeeta B., Dutch R., Robert A., Lamb A. (1998): Core Trimer of the Paramyxovirus Fusion Protein: Parallels to Influenza Virus Hemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology Volume 248, Issue 1*, Pages 20-34.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74: 5463-5467

Schols, D., and De Clercq, E. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production. *J. Virol.* 70:4953-4960

Schröder A.R., Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker J.R., Bushman F. (2002): HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, Volume 110 , Issue 4 , Pages 521 – 529.

Silvestri G., (2005): naturally SIV-infected sooty mangabeys: are we closer to understanding why they do not develop AIDS? *J Med Primatol* 34:243-52.

Simon F., Mauclore P., Roques P. (1998): Identification Of a New Human Immunodeficiency Virus Type 1 Distinct From Group M and Group O, *Nature Medicine* 4:1032-7.

---

Speth C, Prohászka Z, M Mair, G Stöckl, X Zhu, B Jöbstl, G Füst, M P Dierich (1999): A 60 kD heat-shock protein-like molecule interacts with the HIV transmembrane glycoprotein gp41 *Mol Immunol.* Jun ;36 (9):619-28

Srinivas SK, Srinivas RV (1993). Cytosolic domain of the human immunodeficiency virus envelope glycoproteins binds to calmodulin and inhibits calmodulin-regulated proteins. *J Biol Chem* 268:22895-9

Stein B.S., Gowda S.D., Lifson J.D., Penhallow R.C., Bensch K.G., Engleman E.G. (1987): pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell*, 49, 659–668

Stiegler G., Armbruster C., Vcelar B., Stoiber H., Kunert R., Michael N., Jagodzinski L., Ammann C., Jäger W., Jacobson J., Vetter N., Katinger H. (2002): Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: a phase I evaluation. *AIDS.* 16(15):2019-2025

Sun Jiaren, Daniel J., Leahy, Kavathas P. (1995): Interaction Between CD8 and Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Mediated by Multiple Contact Surfaces that Include the  $\alpha$ L2 and  $\alpha$ L3 Domains of MHC Class I. *Journal of Experimental Medicine*, Vol 182, 1275-1280

**T**acke, S. J.; Kurth, R. and Denner, J. (2000): Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation?, *Virology*, (vol. 268), No. 1, pp.87-93.

Takeshita, S., J. R. Gage, T. V. Kishimoto, D. L. Vredevoe, and O. Martinez-Maza. 1996. Differential regulation of IL-6 gene transcription and expression by IL-4 and IL-10 in human monocytic cell lines. *J. Immunol.* 156:2591.

Temin HM, Mizutani S. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus, *Nature.* 1970 Jun 27;226(5252):1211-3.

Tessarz A.J., Cerwenka A. (2008): The TREM-1/DAP12 Pathway. *Immunol Lett* 116:111-6.

Thali, M., Moore J. P., Furman C., Charles M., Ho D. D., J. Robinson, Sodroski J. (1993): Characterization of conserved human immunodeficiency virus type-1 -gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J. Virol.* 67:3978-3988.

Tiilikainen A., Lassus A. & Karvonen S. (1980): Psoriasis and HLA-Cw6. *Br J Dermatol* 102: 179–184.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4

Trkola, A. (1996): Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70, 1100-1108

Trowsdale, J. (1993): Genomic structure and function in the MHC. *Elsevier Science Publishers* 9, 117-122.

**U**NAIDS/WHO, 2007. 2007 AIDS epidemic update. Stand: Februar 2008. [http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007\\_epiupdate\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_en.pdf)

**V**an Regenmortel MH. (1998): From absolute to exquisite specificity. Reflections on the fuzzy nature of species, specificity and antigenic sites, *J Immunol Methods.* 216(1-2):37-48

Vieillard V, Le Grand R, Dausset J, Debré P.A vaccine strategy against AIDS (2008): an HIV gp41 peptide immunization prevents NKp44L expression and CD4+ T cell depletion in SHIV-infected macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 12;105(6):2100-4

Volchkov VE, Blinov VM, Netesov SV. (1992): The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive-like domain similar to oncogenic retroviruses. *FEBS Lett.* Jul 6;305(3):181-4.

**W**eissenhorn W., Dessen, A., Harrison, S., Skehel, J., and Wiley, D. (1997): Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387: 426–430

---

Whatmore, A. M., Cook, N., Hall, G. A., Sharpe, S., Rud, E. W., and Cranage, M. P. (1995): Repair and evolution of nef in vivo modulates simian immunodeficiency virus virulence. *J Virol* 69(8), 5117-23

White, J.M. (1992): *Membrane fusion*. *Science* 258, 917-924

Wild C.T., Shugars D.C., Greenwell T.K., McDanal C.B., Matthews T.J. (1994): Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:9770–9774

Wyatt R. und Sodroski J, (1998): The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280:1884-8

**Z**emmour J. and P Parham (1992): Distinctive polymorphism at the HLA-C locus: implications for the expression of HLA-C *J Exp Med*. 1992 October 1; 176(4): 937–950

Zhang, H., Wang, L., Kao, S., Whitehead, I.P., Hart, M.J., Liu, B., Duus, K., Burrige, K., Der, C.J., and Su, L. 1999. Functional interaction between the cytoplasmic leucine-zipper domain of HIV-1 gp41 and p115-RhoGEF. *Curr. Biol.* 9: 1271-1274

Zündorf, Dingermann (2001): Struktur des HI-Virus. *Pharm. unserer Zeit* 30, 203 – 207

Zwick M.B., Wang M., Poignard P., Stiegler G., Katinger H., Burton D.R., Parren P.W. (2001): Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies. 1: *J Virol*. Dec; 75(24):12198-208

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei zuerst bei Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Kurth und bei Herrn Dr. Joachim Denner für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie des interessanten Themas für meine Bachelorarbeit bedanken.

Dr. Magdalena Eschricht möchte ich für die exzellente Betreuung, das Korrekturlesen meiner Arbeit sowie für die vielen anregenden Gespräche, beruflicher sowie privater Natur, danken.

Für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe P13 des Robert Koch-Instituts danken. Dabei geht besonderer Dank an Kerstin und Daniel, die immer für technische Fragen offen waren.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, die mich seelisch und finanziell während dieser Arbeit unterstützen.