

Funktion der transmembranen Hüllproteine von Retroviren bei der Pathogenese

Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Diplom-Biochemiker

Der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
eingereicht von

Sven Hartmann

(Matrikelnr. 55845)

Berlin, im Juni 2004

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
1 EINLEITUNG.....	6
1.1 Viren.....	6
1.1.1 Infektion und Replikation.....	6
1.1.2 Klassifizierung.....	7
1.2 Retroviren.....	7
1.2.1 Morphologie und Genomstruktur.....	7
1.2.2 Endogene Retroviren.....	10
1.2.3 Transmembrane Hüllproteine.....	10
1.3 Immunsystem und Immunsuppression.....	12
1.3.1 Immunsystem und pathogene Erreger.....	12
1.3.2 Retrovirus-induzierte Immunsuppression.....	13
1.3.3 Immunsuppressive (ISU-) Peptide.....	14
1.3.4 Veränderungen des Cytokinmusters.....	15
1.3.5 Signalwege der Immunsuppression.....	16
1.4 Zielstellung.....	17
2 MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1 Materialien und Geräte.....	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Kommerzielle Kits.....	18
2.1.3 Enzyme.....	18
2.1.4 Antikörper.....	19
2.1.5 Vektoren.....	19
2.1.6 Bakterienstämme	21
2.1.7 Zelllinien.....	21
2.1.8 Laborgeräte	21
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion.....	23

2.2.3 Restriktionsverdau.....	24
2.2.4 Ligation.....	24
2.2.5 Herstellung kompetenter Bakterien.....	24
2.2.6 Transformation kompetenter Bakterien.....	25
2.2.7 Plasmid-Isolierung.....	25
2.2.8 DNS-Konzentrationsbestimmung.....	26
2.2.9 DNS-Sequenzierung.....	26
2.2.10 Expression rekombinanter Proteine in Bakterien.....	26
2.2.11 Expression rekombinanter Proteine in S2-Zellen.....	26
2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	27
2.3.1 Kopplung von Peptiden.....	27
2.3.2 CBP-Affinitätschromatographie	28
2.3.3 Affinitätschromatographie mit p15E gekoppelt an Sepharose 4B.....	30
2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	31
2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	32
2.3.6 Western Blot.....	33
2.3.7 Endotoxinanreicherung.....	34
2.3.8 Bestimmung des Endotoxinkonzentration.....	34
2.4 Zellkulturtechniken und immunologische Methoden.....	34
2.4.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen.....	34
2.4.2 Zellzahlbestimmung.....	35
2.4.3 Zellkultur von eukaryontischen Zellen.....	35
2.4.4 Zellkultur von Schneider 2 Zellen.....	36
2.4.5 Transfektion.....	37
2.4.6 Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA).....	38
2.4.7 Bestimmung der Cytokinspiegel (RayBiotech Microarray).....	39
2.4.8 Immundurchflusscytometrie (FCM).....	39
3 ERGEBNISSE.....	41
3.1 Identifizierung von Bindungsproteinen retroviraler TM-Proteine.....	41
3.1.1 Affinitätschromatographie mit rp15E gekoppelt an Sepharose 4B.....	41
3.1.2 Affinitätspräzipitation mit rp15E gekoppelt an Magnetbeads.....	44
3.2 Modulation der Cytokinproduktion durch immunsuppressive Peptide.....	46
3.2.1 Gewinnung und Charakterisierung von Peptid-Homopolymeren.....	47
3.2.2 Analyse der Wirkung von Homopolymeren auf humane PBMCs.....	49

3.3 Modulation der Cytokinproduktion durch retrovirale TM-Proteine.....	51
3.3.1 Expression und Analyse von rekombinatem p15E des FeLV.....	52
3.3.2 Klonierung und Expression von rp15E des PERV-A in Drosophila S2-Zellen.....	55
3.3.3 Analyse der Cytokinmodulation durch rekombinantes HIV-1 gp41.....	58
3.4 Klonierung rgp41-transgener 293-Tumorzellen.....	61
4 DISKUSSION.....	66
4.1 Identifizierung von Bindungsproteinen retroviraler TM-Proteine.....	66
4.1.1 Wechselwirkung von rp15E mit Nucleolin und β -Aktin.....	68
4.1.2 Wechselwirkung von rp15E mit GAPDH.....	70
4.2 Modulation der Cytokinproduktion durch immunsuppressive Peptide.....	71
4.2.1 Einfluss von Polymerisierung und Konformation.....	71
4.2.2 Modulation der intrazellulären Signalwege.....	73
4.3 Cytokinmodulation durch rekombinante retrovirale TM-Proteine.....	75
4.3.1 IL-10 Induktion durch bakteriell exprimiertes rp15E von FeLV.....	75
4.3.2 Cytokinmodulation durch bakteriell exprimiertes rgp41 von HIV-1.....	76
4.3.3 Etablierung eines Drosophila-Expressionssystems.....	78
4.3.4 Etablierung einer 293-Zelllinie mit rgp41-Oberflächenexpression.....	78
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	80
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	81
DANKSAGUNG.....	90

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AEBSF	4-(2-Aminoethyl-)benzylsulfonylfluorid Hydrochlorid (Pefabloc SC)
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches AMP (engl. cyclic AMP)
CBP	Calmodulin-Bindungsprotein
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobezidin-tetrachlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
E.coli	Escherichia coli
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylenether)-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FKS	fötales Kälberserum
FeLV	felines Leukämievirus
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigungskonstante (9,81 m*s ²)
GAPDH	Glyzeraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
gp	Glykoprotein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
h	Stunde
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
ISU	immunsuppressiv
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LAL	Limulus-Amöbocytenlysat
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid

M	Molar (Mol*L ⁻¹)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
ng	Nanogramm
NTA	Nitrioltriessigsäure
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	periphere, mononukleäre Blutzellen (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PERV	porcines endogenes Retrovirus
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
rp	rekombinates Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RPMI	Medium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecylsulfate)
SP	Streptomycin/Penicillin
SU	Oberflächenprotein (engl. surface protein)
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	transmembranes Protein
Tricin	N-[2-Hydroxy-1,1-bis-(hydroxymethyl)ethyl]-glyzin
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 EINLEITUNG

1.1 Viren

Viren stehen an der Grenze zwischen der belebten und der unbelebten Welt. Sie sind äußerst kleine (16 - 300 nm), ultrafiltrierbare, infektiöse Partikel. Viren zeichnen sich durch einen sehr strukturierten, fast kristallinen Aufbau aus. Sie bestehen aus Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden. Ihnen fehlen die komplexen Strukturelemente und energiebildenden Stoffwechselsysteme, die alle Lebensformen charakterisieren. Sie sind somit obligate Zellparasiten, die sich nicht unabhängig vermehren können. Ihre Strategie muss es sein, fremde „Wirts“-Zellen zu infizieren und zur Produktion neuer Virenpartikel, sogenannter Virionen, zu zwingen [1].

1.1.1 Infektion und Replikation

Als obligate intrazelluläre Parasiten müssen sich Viren erst Zugang zu den Ressourcen ihres Wirtes verschaffen, bevor sie sich vermehren können. Die Infektion der Zellen und die darauf folgende Replikation ist zwar im Detail sehr unterschiedlich, kann aber dennoch in sechs definierte Phasen eingeteilt werden. Den ersten Schritt stellt die selektive Interaktion des Virus mit einem zellulären Oberflächenprotein oder Rezeptor dar, dies hilft dem Virus an spezifische Wirtszellen zu binden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Adsorption. Darauf folgt der Eintritt des Virus, bzw. seines Kapsids, in die Wirtszelle (Penetration). Hier gibt es deutliche Unterschiede im Ablauf, membranumhüllte Viren werden häufig durch gezielte, also rezeptorvermittelte, Endocytose aufgenommen. Die Virusmembran muss dann mit der Endosomenmembran fusionieren, ein oftmals pH-abhängiger Prozess. Im nächsten Schritt erfolgt die Freisetzung der genetischen Information des Virus vom Kapsid, bekannt als Uncoating und weitgehend unerforscht. Je nach Art des Virus erfolgt ein Weitertransport des Virusgenoms in den Zellkern, oder es verbleibt im Cytosol. Nun muss die Replikation der Nukleinsäuren sowie die (Transkription und) Translation der viralen Proteine erfolgen. Sobald eine ausreichend hohe Konzentration an viralen Proteinen vorliegt, erfolgt ein automatischer und selbstständiger Zusammenbau von neuen Virionen (Self-Assembly). Die neugebildeten Viruspartikel können nun entweder durch Lyse der Zelle oder, wie vorwiegend bei membranumhüllten Viren, durch Knospung der Zellmembran (Budding) freigesetzt werden. Die Virusmembran stellt daher ein Abbild der Membran des Kompartiments dar, in welchem der Zusammenbau des Virions erfolgt ist. Dies können der Zellkern, das Cytoplasma oder auch das endoplasmatische Retikulum (ER) sein.

Eine Virusinfektion kann für die betroffenen Zellen völlig unterschiedliche Folgen haben. Sie reichen von latent oder chronisch-infizierten Verläufen bis hin zum Zelltod, entweder durch Apoptose oder Lyse. Einige Viren besitzen auch transformierende Eigenschaften und können zur Tumorentwicklung führen (Papillomaviren, Retroviren etc.) [1].

1.1.2 Klassifizierung

Die Klassifizierung von Viren beruht heutzutage auf einer Vielzahl von Kriterien [2] und wird vom International Comitee on Taxonomy of Viruses (ICTV) vorgenommen. Wichtige Kriterien für die Taxonomie sind u.a. die Genomorganisation und Replikation, Eigenschaften des Virions und immunologische Eigenschaften.

Viren enthalten in ihrem Inneren RNS oder DNS als Erbinformation, die einzel- oder doppelsträngig sein kann. Die einzelsträngigen Nukleinsäuren können sowohl positive als auch negative Polarität aufweisen. Das Genom kann als kontinuierliches Molekül oder in Segmente unterteilt vorliegen.

Die Nukleinsäure ist zum Schutz von einer Proteinhülle (Kapsid) umgeben, die eine helikale oder kubische Form aufweisen kann. Das Kapsid kann bei einigen Viren von einer Lipidmembran umgeben sein. Zu den umhüllten Viren zählen auch die Retroviren, die einige interessante Besonderheiten aufweisen [1, 3].

1.2 Retroviren

Retroviren wurden erstmals 1908 von Ellermann und Bang bzw. 1911 von Rous beschrieben, dem es erstmals gelang, Tumorerkrankungen (des Bindegewebes) mittels Ultrafiltraten zu induzieren [1].

Die Familie der Retroviridae umfaßt 7 Genera: α -Retroviren, β -Retroviren, γ -Retroviren, δ -Retroviren, ε -Retroviren, Lentiviren und Spumaviren. Retroviren besitzen ein einzelsträngiges RNS-Genom positiver Polarität, welches eine 5'-Cap-Struktur und eine 3'-Polyadenylierung aufweist [3]. Alle Retroviren benutzen doppelsträngige DNS als Zwischenprodukt. Diese Umkehrung des normalen Informationsflusses spiegelt sich im Begriff Retroviren wieder und wird durch ein spezifisches Enzym, die Reverse Transkriptase, katalysiert [4].

1.2.1 Morphologie und Genomstruktur

Der Aufbau infektiöser Viruspartikel ist im Allgemeinen sehr ähnlich, die Viruspartikel haben einen Durchmesser von etwa 100 nm und sind von einer Hüllmembran (Envelope) umgeben, die von der Cytoplasmamembran abgeleitet ist (Abbildung 1.1). Diese Membran wird über einen Bereich von etwa 20 hydrophoben Aminosäuren von einem Glykoprotein, dem transmembranen Hüllprotein (TM-Protein), durchlaufen. An den extraviralen Bereich des TM-Prote-

ins ist nichtkovalent ein weiteres Glykoprotein (Surface Unit, SU-Protein) gebunden. Beide Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein (Envelope, env-Protein) gebildet und durch eine Protease in einen aminoterminalen externen und einen carboxyterminalen transmembranen Anteil gespalten. TM und SU liegen hierbei als trimere Komplexe in der Hüllmembran vor. Diese Komplexe spielen eine entscheidende Rolle bei der Infektion und Pathogenese.

Im Innern an die Membran angelagert, finden sich die netzartig miteinander verbundenen Matrix-Proteine (MA), die über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden sind. Im Inneren des Partikels befindet sich das Viruskapsid, das eine sphärisch-ikosaedrische (bei α -, β -, γ - und δ -Retroviren und Spumaviren) oder konische Form (bei einigen β -Retroviren und den Lentiviren) besitzen kann. Die Hülle des Kapsids besteht aus Kapsidproteinen

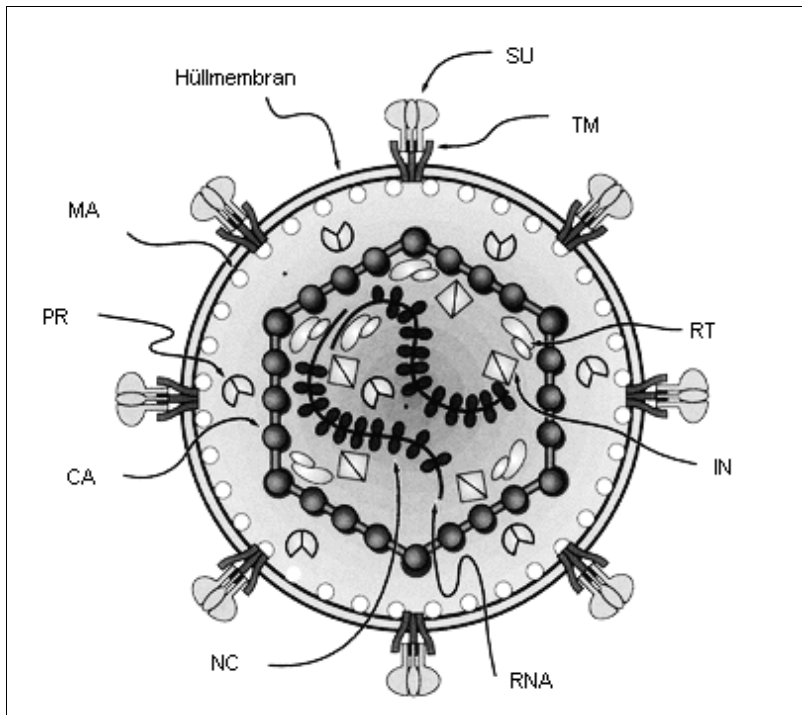


Abbildung 1.1: Aufbau eines Retroviruspartikels

Schematischer Querschnitt durch einen Retroviruspartikel, Beschriftung siehe Text; modifiziert aus [3]

(CA). Im Inneren des Kapsids befinden sich zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNS, die mit den Nukleokapsidproteinen (NC) komplexiert sind. CA, MA und NC sind Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine).

Im Viruspartikel befinden sich zudem noch die essentiellen viruskodierten Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR).

Das Genom der Retroviren umfasst 7 bis 12 kb und kodiert für die vier Proteine Gag, Pro, Pol und Env (Abbildung 1.2). Die entsprechenden vier Gene finden sich bei allen Retroviren und bilden sozusagen das Minimalgenom.

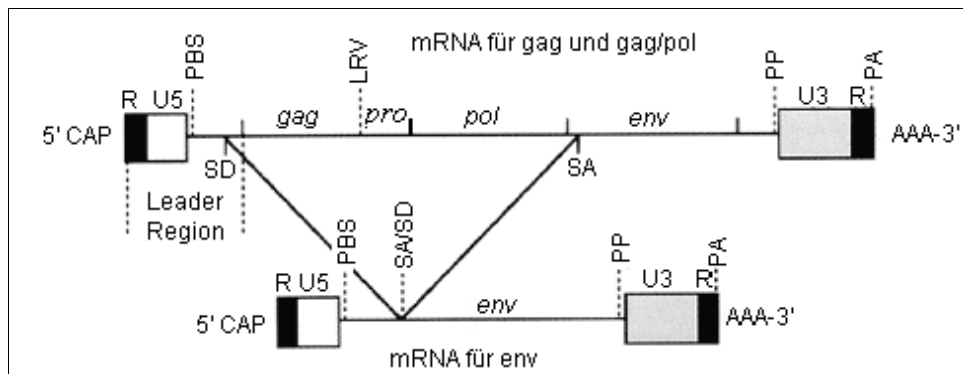


Abbildung 1.2: Organisation des RNS Genoms der Retroviren

Dargestellt ist die Vollängen-mRNS und die env-mRNS mit ihren flankierenden Sequenzen, modifiziert aus [3]

SA = Spleißakzeptor, PA = Polyadenylierungssignal, PBS = Primerbindungsstelle, PP = Polypurinbereich, LRV = Leserasterverschiebung

Die kodierenden Regionen werden am 5'- und 3'-Ende von regulatorischen Kontrollsequenzen flankiert. Die R-Region (R = redundant) liegt in identischer Basenfolge und Orientierung unmittelbar nach der 5'-CAP und vor dem Poly-A am 3'-Ende. Direkt an die R-Region am 5'-Ende schließt sich eine als U5 (U = unique) bezeichnete Basenfolge an. Darauf folgt die Primerbindungsstelle (PBS), die über Basenpaarungen mit dem 3'-Ende einer zellulären t-RNS komplexiert ist. Der Genomabschnitt zwischen der PBS und dem Beginn des gag-Gens wird als Leader-Sequenz bezeichnet, sie beinhaltet eine Spleißdonorstelle (SD) zur Produktion der gespleißten env-mRNS.

Im Anschluss an die kodierenden Gene befindet sich der Polypurinbereich (PP) gefolgt von der U3-Region und dem zweiten R-Bereich. U5 und U3 enthalten Sequenzen, die bei der Integration des Provirus in das Genom der Wirtszelle eine bedeutende Rolle spielen. Der Polypurinbereich ist ein Kontrollelement für die Initiation der reversen Transkription.

Die Regionen gag, pro, pol und env kodieren für die Proteine des Virus: gag für MA, CA und NC; pro für die Protease; pol für die Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase; env für die beiden Glykoproteine SU und TM [3].

Die komplexen Retroviren, wie Lenti- und Spumaviren, verfügen zudem über die Informationen für die akzessorischen oder regulatorischen Gene, die eine wichtige Rolle bei der Genexpression und Virusreplikation spielen. Viele Retroviren kodieren zudem virale Onkogene, die eine Transformation der Zielzellen verursachen und zur Tumorbildung führen können [1, 3].

1.2.2 Endogene Retroviren

Neben den bereits angeführten exogenen Retroviren gibt es auch eine weitere Art, die sogenannten endogenen Retroviren. Hierbei werden die Proviren als endogener Bestandteil von Keimbahnzellen auf die Folgegeneration übertragen (vertikale Übertragung). Dies wurde erstmals 1963 von J.J. Bittner für das Maus Mammatumor-Virus (MMTV) beschrieben [1]. Die endogene Retroviren existieren im Genom der Keimbahnzellen und sind somit auch in allen somatischen Zellen vorhanden. Endogene Retroviren (ERV) sind bei allen Säugetieren inklusive des Menschen zu finden, wobei viele ERV degeneriert und nicht mehr in der Lage sind, infektiöse Partikel zu bilden. Dennoch gibt es in vielen Spezies noch intakte Provirusgenome, die unter spezifischen, zellulären Bedingungen infektiöse Viruspartikel bilden können.

Da aufgrund der anhaltenden Knappheit an Spenderorganen nach Alternativen gesucht wird, rückt die sogenannte Xenotransplantation in den Mittelpunkt des Interesses. Aus diversen Gründen werden Schweineorgane besonders favorisiert. Eine wichtige medizinische und infektionsbiologische Bedeutung haben in diesem Zusammenhang die porzinen endogenen Retroviren [5, 6]. So wurde bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts die Freisetzung von Viruspartikeln aus porzinen Zelllinien beobachtet, die eine starke Homologie zu γ -Retroviren aufweisen [7, 8]. Da Infektionsstudien eine Suszeptibilität permanenter humaner Zelllinien sowie primärer humaner Zellen gegenüber PERV zeigen, könnte eine der größten Gefahren bei der Xenotransplantation zur Zeit hiervon ausgehen [9-13].

Die beiden Subtypen PERV-A und PERV-B können die Zellen anderer Spezies in vitro infizieren. Da sie eng mit den Leukämieviren von Mäusen (MuLV) und Katzen (FeLV) verwandt sind, ist eine immunsuppressive und tumorigene Wirkung bei erfolgreicher in vivo-Übertragung zu befürchten [5, 6].

1.2.3 Transmembrane Hüllproteine

Da Retroviren membranumhüllte Viren sind, ist ihre Oberfläche mit Glykoproteinen (den env-Proteinen) bedeckt. Die Aufgabe dieser Proteine ist es, die Adsorption an und Penetration in die Zielzellen sicherzustellen, sowie das Immunsystem des Wirtes zu manipulieren.

Alle Retroviren enthalten zwei unterschiedliche env-Proteine (Kap. 1.2.1), die als gemeinsames Vorläuferpeptid (gp160 bei HIV) von einer einfach gespleißten mRNS translatiert werden (Abbildung 1.2). Das env-Vorläuferpeptid wird ebenso wie zelluläre Transmembranproteine aufgrund einer aminoterminalen Signalsequenz in das Lumen des ER translatiert. Im ER erfolgt bei den env-Proteinen fast aller Retroviren eine N-Glykosylierung an mehreren Stellen. Bereits hier bilden sich die reifen Oligomere, wie etwa Trimere im Fall von HIV-1 gp41. Im

Golgi-Apparat wird das env-Vorläuferpeptid nach weiterer Prozessierung der Oligosaccharidketten durch zelluläre Proteasen wie Furin gespalten, so dass die beiden reifen Proteine TM und SU gebildet werden. Beide Proteine bleiben jedoch über nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden.

Das wohl am besten untersuchte TM-Protein, gp41 von HIV-1, zeigt exemplarisch den Aufbau und die Funktion retroviralen TM-Proteine (Abbildung 1.3). Das TM-Protein gp41 wird zusammen mit dem hochglykosylierten SU-Protein gp120 aus dem Vorläuferpeptid gp160 prozessiert und besteht aus einer extraviralen Ectodomäne und einer Endodomäne im Inneren des Viruspartikels.

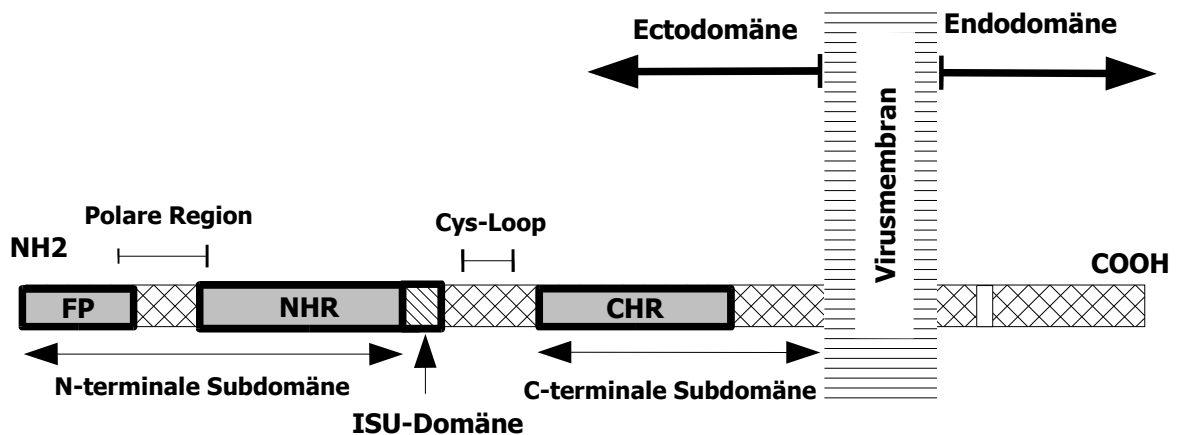


Abbildung 1.3: Aufbau retroviraler TM-Proteine am Beispiel von gp41

Schematische Struktur des TM-Proteins gp41 von HIV-1, modifiziert nach [14]

FP = Fusionspeptid, NHR = aminoterminaler heptad repeat Region, CHR = carboxyterminale heptad repeat Region, ISU-Domäne = immunsuppressive Domäne

Das gp41 ordnet sich wie bereits erwähnt zu Trimeren an. Besonders wichtig für den Infektionsprozess ist die 175 AS große Ectodomäne. Auf dieser befinden sich die zwei hauptsächlich funktionalen Regionen: die aminoterminaler und die carboxyterminale Subdomäne, die durch einen Cys-Cys-Loop getrennt sind. Die aminoterminaler Subdomäne besteht aus einem glyzinreichen, hydrophoben Fusionspeptid und einem anschließenden α -helikalen Leucin-/Isoleucin-Zipper, dem sogenannten N-terminalen Heptad Repeat. Dem folgt eine Loopstruktur, die von einer Cystinbrücke verknüpft wird und an die sich die C-terminalen Heptad Repeats anschließen [15]. Im nichtaktivierten Zustand bilden jeweils drei gp41-Moleküle einen inneren Kern aus den parallel angeordneten α -helikalen NHR. Die entsprechenden drei CHR bilden schräg dazu angeordnet einen äußeren Ring, so dass sich ein 6-Helix-Bündel ergibt [16-18]. Das Fusionspeptid spielt eine Schlüsselrolle bei der Membranfusion, da es sich nach der Aktivierung direkt in die Zielmembran einlagert und den Fusionsprozess in Gang bringt. Derzeit

tige Modelle gehen von einem aktiven Einfluss der NHR- und CHR-Regionen durch konformationelle Umlagerungen der Helices hin zu einer trimeren Hairpinanordnung aus. Diese Umlagerung der gp41-Trimere führt zu einer Annäherung und letztlich zur Fusion von Wirtszellmembran und Virusmembran [19, 20]. Dieses Strukturmotiv ist bei einer ganzen Reihe von Viren wie Influenza-, Ebola- oder Coronaviren hochkonserviert, und man kann davon ausgehen, dass noch weitere Viren diesen Mechanismus benutzen [21-24]. Die hochkonservierte immunsuppressive ISU-Domäne, auf die später noch eingegangen wird, liegt im Bereich der NHR in direkter Nachbarschaft zur Loopstruktur mit der Cys-Cys Disulfidbrücke.

1.3 Immunsystem und Immunsuppression

1.3.1 Immunsystem und pathogene Erreger

Der menschliche Organismus ist Infektionen, ob viralen oder sonstigen Ursprungs, nicht völlig schutzlos ausgeliefert. Er hat zwei Gruppen von Abwehrsystemen entwickelt, die unspezifische, nichtadaptive und die spezifische, adaptive Immunantwort, um eingedrungene Erreger unschädlich zu machen. Die unspezifische oder angeborene Immunabwehr stellt praktisch die erste Barriere dar, sobald die äußeren Schutzschranken des Körpers überwunden sind. Sie besteht aus einer zellulären Komponente, Monocyten, Granulocyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und natürlichen Killerzellen (NK), die bei Kontakt mit fremden Antigenen aktiviert werden, sowie aus löslichen Proteinen bzw. Peptiden wie den Akutphaseproteinen, dem Komplementsystem, den Cytokinen und den Interferonen.

Wird der Erreger nicht schnell genug eliminiert, tritt die adaptive oder spezifische Immunabwehr in Aktion. Hierbei werden jene Immunzellen gezielt klonal vermehrt, deren Rezeptoren spezifisch Epitope eines Erregers erkennen können. Die adaptive Immunabwehr besteht im wesentlichen aus T-Helferzellen (T_H1 und T_H2) und cytotoxischen T-Lymphocyten (CTL) als zellvermittelter Immunantwort, sowie antikörperproduzierenden B-Lymphocyten als humoraler Immunantwort. Beide können ein immunologisches Gedächtnis aufbauen.

Die beiden integralen Bestandteile der Immunabwehr, spezifische und unspezifische, stehen über eine ganze Reihe von Signalstoffen in Verbindung miteinander. Die wichtigste Rolle hierbei spielen die Cytokine und Interferone, sowie die Antigen-präsentierenden Zellen. Cytokine werden von unterschiedlichen Zellen sezerniert, sobald diese in Kontakt mit fremden Stoffen kommen und so die Immunabwehr des Körpers in die richtigen Bahnen lenken.

Daher ist es nicht verwunderlich, dass viele pathogene Erreger Wege gefunden haben, die Kommunikation über Cytokine und Interferone zu unterdrücken oder gezielt zu manipulieren. Besonders Viren können mit einigen interessanten Strategien aufwarten. Manche Viren

können die Produktion bestimmter Cytokine drosseln oder steigern, so dass die Virusreplikation positiv beeinflusst wird. Das Epstein-Barr-Virus (EBV) etwa besitzt das Gen für ein virales IL-10 [25]. Andere haben die Möglichkeit entwickelt, über lösliche Rezeptoranaloga Cytokine einzufangen und auszuschalten. Herpes-simplex-Viren (HSV) oder Pockenviren sind Beispiele hierfür [26]. Das Masernvirus hingegen infiziert DC und erreicht so eine Anergie von T-Lymphocyten. Außer diesen direkt mit Cytokinen verbundenen Strategien haben Viren auch Evasionsstrategien für alle anderen Schritte der Immunantwort entwickelt [27].

1.3.2 Retrovirus-induzierte Immunsuppression

Unter Immunsuppression versteht man die Unterdrückung einer regulären Immunantwort. Gerade retrovirale Infektionen verursachen häufig schwere Immunsuppressionen in unterschiedlichen Spezies, die zu opportunistischen Infektionen führen. Seit der Entdeckung des HI-Virus und des zugehörigen Krankheitsbildes AIDS wurden die Untersuchungen zur Aufklärung dieser immunpathogenen Eigenschaften ständig intensiviert. Dennoch sind die genauen Details nach wie vor nicht vollständig bekannt.

Aber bereits in den 1960er Jahren zeigten erste Untersuchungen, dass Retroviren neben onkogenen auch immunsuppressive Eigenschaften besitzen. Dabei konnte man mit diversen Leukämieviren eine stark reduzierte Immunantwort in Mäusen, sowohl bei der Antikörperbildung als auch bei der zellvermittelten Immunität, hervorrufen [28, 29]. Ähnliches konnte in Katzen nachgewiesen werden, die mit dem feline Leukämievirus (FeLV), einem γ -Retrovirus, infiziert waren. Die Immunsuppression war bereits vor der Tumorigenese nachweisbar [30].

Aber auch durch Inkubation mit inaktiviertem FeLV konnte bei Lymphocyten die Blastenbildung inhibiert werden [31]. Inaktiviertes PMFV, ein Typ δ -Retrovirus, hemmte humane Lymphocyten in vitro [32-34]. Inaktivierte Partikel von FeLV und des Rauscher Leukämievirus (RLV) hemmten in vitro die Mitogen-induzierte Proliferation feline und murine Lymphocyten [35, 36]. Durch inaktiviertes FeLV konnte desweiteren die gemischte Lymphocytenreaktion (mixed lymphocyte reaction, MLR), die IL-2-induzierte Proliferation von T-Zellen, der „respiratory burst“ von Monocyten, die Chemotaxis von Monocyten, natürlichen Killerzellen und die Stimulierung von B-Zellen gehemmt werden [37]. Weiterhin unterdrückte inaktiviertes FeLV die Produktion von IFN- α , die Staphylococcus Enterotoxin A-induzierte Produktion von IFN- γ und die Antikörperproduktion humaner peripherer Blutlymphocyten [38, 39]]. In vivo wurden sowohl die Makrophagen-Infiltration als auch die Antikörperantwort gegen Zelloberflächenantigene durch inaktiviertes FeLV gehemmt und die Tumorprogression durch ein Challenge-Virus

stimuliert [37]. Ein ähnlicher immunsuppressiver Effekt in vitro wurde auch für inaktiviertes HIV-1 beschrieben [40, 41].

Erstmalig wurde bei FeLV gezeigt, dass das aufgereinigte 15 kDA große transmembrane Hüllprotein p15E in Katzen eine Suszeptibilität für FeSV (felines Sarkomavirus) und damit Tumorigenese hervorrufen und wichtige immunologische Funktionen hemmen kann [42-44]. Für die transmembranen Hüllproteine von MuLV und PMFV wurde beschrieben, dass sie ebenfalls in den oben genannten in vitro-Modellen eine hemmende Wirkung ausüben [34, 43-46]. Bei den Untersuchungen der immunsuppressiven Eigenschaften von inaktivierten Viren sowie bei denen der transmembranen Hüllproteine wurde eine Interspezies-Reaktivität beobachtet. RLV und PMFV konnten sowohl murine als auch humane Lymphocyten hemmen, FeLV und zugehöriges p15E hemmten Lymphocyten der Katze, des Menschen und der Maus [35, 36, 47].

1.3.3 Immunsuppressive (ISU-) Peptide

Ein 26-Aminosäuren langes Segment aus FeLV p15E ist hochkonserviert bei einer Reihe von TM-Proteinen der felines, murinen, bovinen und simianen Retroviren (Tabelle 1.1).

CKS-17		L Q N R R G L D L L F L K E G G L
MoLV	P15E	L Q N R R G L D L L F L K E G G L C A A L K E E C C F
FLV	P15E	L Q N R R G L D L L F L K E G G L C A A L K E E C C F
AKV	P15E	L Q N R R G L D L L F L K E G G L C A A L K E E C C F
GLV	P15E	L Q N R R G L D L L F L K E G G L C A A L K E E C C F
MMCF	P15E	L Q N R R G L D L L F L K E G G L C A A L K E E C C F
AMCF	P15E	L Q N R R G L D L L F L K E G G L C A A L K E E C C F
FeLV	P15E	L Q N R R G L D I L F L Q E G G L C A A L K E E C C F
MPMV	gp20	L Q N R R G L D L L T A E Q G G I C L A L Q E K C C F
REV-A	gp20	L Q N R R G L D L L T A E Q G G I C L A L Q E K C C F
HTLV-1	gp21	A Q N R R G L D L L F W E Q G G L C K A L Q E Q C R F
HTLV-2	gp21	A Q N R R G L D L L F W E Q G G L C K A I Q E Q C C F
CKS-17		L Q N R R G L D L L F L K E G G L
HIV-1	Nef	M T Y K A A V D L S H F L K E K G G L
HIV-1	gp41	L Q A R I L A V E R Y L K D Q Q L ISU-Peptid

Tabelle 1.1 AS-Sequenz der homologen Peptide von retroviralen TM-Proteinen

Abkürzungen: CKS-17 = synthetisches TM-Heptadekapeptid, MoLV = Moloney Leukämievirus, FLV = Friend Leukämievirus, AKV = endogener Mäuseleukämievirus, GLV = Gross Leukämievirus, MMCF = „mink-cell focus-forming virus of Moloney origin“, AMCF = „mink-cell focus-forming virus of AKR origin“, FeLV = felines Leukämievirus, MPMV = Mason-Pfizer Affenvirus, REV-A = Reticuloendotheliosis-assoziiertes Virus Stamm A, HTLV-1 = humanes T-Zell Leukämievirus Typ 1, HIV = humanes Immundefizienzvirus; Übereinstimmungen sind grau unterlegt.

Eine große Homologie findet sich auch bei dem humanen Retrovirus HTLV und etwas weniger konserviert bei HIV [48-50]. Weiterhin findet sich diese Sequenz auch bei einigen endogenen Retroviren, so etwa bei den porzinen endogenen Retroviren PERV-A und -B. Bei dem Versuch, die minimale Sequenz der immunsuppressiven Peptide weiter zu bestimmen, fand man ein 17

AS langes Peptid, CKS-17, das eine starke immunsuppressive Wirkung besitzt [51, 52]. Dieses Peptid entspricht einem Teil der Sequenz der hochkonservierten 26 AS-Sequenz aus p15E und beeinflusst eine ganze Reihe von Immunfunktionen. So unterbindet es unter anderem die IL-2 abhängige und Alloantigen-abhängige Proliferation von murinen bzw. humanen T-Lymphocyten, den „respiratory burst“ von humanen Monocyten, die Aktivität von NK-Zellen oder die Aktivität von murinen CTL [52-56].

Eine große Homologie zeigt sich auch bei zwei HIV-1 Proteinen, HIV-nef [57] und gp41. Es konnte zudem gezeigt werden, dass synthetische Peptide, die von gp41 von HIV-1 oder gp21 von HTLV abgeleitet wurden, die T-Zellproliferation oder die MLR unterdrücken [53, 58-60]. Die ISU-Domäne von HIV-1 gp41 umfasst die AS 583-599, die in direkter Nachbarschaft zur immunodominanten Region AS 598-607 liegt [61]. Beide Regionen liegen damit am Ende der aminoterminalen helikalen Region, in der Nähe der Loopstruktur (Kap. 1.2.3).

Alle erwähnten Peptide haben nur dann eine immunsuppressive Wirkung, wenn sie an größere Trägermoleküle wie BSA oder KLH gekoppelt wurden. Dabei spielen Größe und Art des Trägerproteins keine Rolle [49].

1.3.4 Veränderungen des Cytokinmusters

Man geht heute davon aus, dass ein Ungleichgewicht bei der Produktion von Typ 1 (T_H1)- und Typ 2 (T_H2)-Cytokinen mit der Progression von vielen Infektionskrankheiten korreliert [62-65]. Viele pathogene Erreger sind in der Lage, die Kommunikation durch Cytokine gezielt zu manipulieren (Kap 1.3.1). Das Peptid CKS-17 und höchstwahrscheinlich auch das ISU-Peptid von HIV-1 haben einen bedeutenden Einfluss auf die Dysregulierung der Cytokinproduktion [66-69]. Dies führt zum Beispiel *in vitro* zu einer Reduktion des Levels der Typ 1- Cytokine, wie IL-2, IL-12 und $IFN-\gamma$, genau wie von $TNF-\alpha$, und damit zu einer Inhibition der CMI [70-72]. Das Typ 1-Cytokin IL-12 beispielsweise ist ein maßgeblicher Regulator des Cytokinnetzwerkes, da es die CMI gegen Krebszellen und eine Vielzahl von mikrobiellen Pathogenen verstärkt [73-75]. Gleichzeitig erhöht CKS-17 die Produktion der Typ 2-Cytokine IL-10 und IL-6 aber nicht der anderen Typ 2-Cytokine IL-4, IL-5 oder IL-13 [71, 72, 76]. Die Induktion von IL-6 und IL-10 konnte auch mit rekombinantem gp41 in einer humanen Monocytenzelllinie hervorgerufen werden [77]. Die Inhibierung von $IFN-\gamma$ beruht wohl auf der induzierten Dysfunktion von Monocyten durch den erhöhten IL-10 Spiegel und einem nachfolgenden Abfall des IL-12 Levels [72]. Das Typ 2-Cytokin IL-10 spielt eine kritische Schlüsselrolle bei der Suppression der Immunantwort [78-81]. Es konnten bei HIV-positiven Patienten erhöhte IL-10 Werte nachgewiesen werden [82-85]. Desweiteren konnte bei *in vitro* Versuchen eine erhöhte Tran-

skription von IL-10 mRNA in Monocyten und T-Zelllinien nach HIV-Infektion gezeigt werden [86-89].

1.3.5 Signalwege der Immunsuppression

Es sind vor allem zwei Signalwege, die bei der Aktivierung von Immunzellen benutzt werden [90]. Zum einen werden bei der Antigenerkennung eine Reihe von Tyrosinkinasen aktiviert, was letztlich zur Phosphorylierung der Phospholipase $C\gamma 1$ und damit zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol führt [69, 91]. Das freiwerdende Diacylglycerol (DAG) aktiviert die Proteinkinase C (PKC), während das Inositol-(1,4,5)-triphosphat (IP_3) zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt [92]. Zum anderen kommt es bei Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel zu einer Aktivierung des Proteinkinase A (PKA)-Signalweges [93]. Aber auch die Aktivierung des MAP Kinase-Signalwegs hat einen Einfluss auf die Immunantwort [94].

Interessanterweise haben sowohl CKS-17 als auch HIV ISU-Peptide einen Einfluss auf beide Signalwege. CKS-17 inhibiert die PKC in intakten Zellen sowie in zellfreien *in vitro* Assays, aber auch in Phorbol-ester-stimulierten Zellen [95-97]. Der inhibitorische Effekt beruht wahrscheinlich auf zwei basischen Argininen in der N-terminalen Region von CKS-17 [98].

Die Wirkung von CKS-17 auf den intrazellulären cAMP-Spiegel basiert auf der Aktivierung der Adenylatzyklase [96]. Analog dazu können HIV-Proteine die Lymphocytenproliferation durch Erhöhung der cAMP-Konzentration *in vitro* unterdrücken und Seren von HIV-positiven Patienten zeigen einen signifikant erhöhten cAMP-Spiegel [99, 100], was zur Anergie der T-Zellen bei AIDS führen könnte. cAMP bei niedrigen Konzentrationen stellt ein positives Wachstumssignal dar, während zu hohe Level zu einer Inhibition führen. Der inhibierende Einfluss von HIV ISU-Peptiden und CKS-17 beruht wahrscheinlich teilweise auf einer Modulation der Cytokinproduktion. Die Expression der Typ 1- und Typ 2-Cytokine ist abhängig von der intrazellulären cAMP-Konzentration. Wobei die Typ 1-Expression bei niedrigen und die Typ 2-Expression bei hohen cAMP-Werten erfolgt [69]. Dafür spricht die wesentlich höhere intrazelluläre cAMP-Konzentration in T_H2 -Zellen gegenüber den T_H1 -Zellen [101]. Für eine Übersicht siehe folgenden Review [42].

Die genaue Art des Einflusses von CKS-17 und ISU-Peptiden ist bisher noch nicht aufgeklärt. Es gibt allerdings klare Hinweise auf eine spezifische Wechselwirkung mit einem noch unbekanntem Rezeptor [102-107]. Eine Wechselwirkung mit der Membran aufgrund von Ladungsverteilung und/oder Hydrophobizität kann zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht ausgeschlossen werden [20, 108].

1.4 Zielstellung

Eine Reihe von Retroviren ist in der Lage, beim infizierten Wirt immunsuppressive Krankheitsbilder auszulösen. Das bedeutendste Beispiel hierfür ist sicherlich das humane Lentivirus HIV-1, das weltweit bisher mehr als 40 Millionen Menschen infiziert hat und die tödliche Immunschwäche AIDS auslöst. Der Mechanismus der immunsuppressiven Eigenschaften ist bisher nur in Ansätzen verstanden. Eine wichtige Rolle scheinen die transmembranen Hüllproteine der Retroviren sowohl bei der Infektion als auch bei der Pathogenese zu spielen. Es spricht einiges dafür, dass eine hochkonservierte Region der TM-Proteine, hauptverantwortlich für die Modulierung der Immunantwort ist. Diese immunsuppressive (ISU-) Domäne und davon abgeleitete synthetische Peptide besitzen *in vitro* dieselben supprimierenden Eigenschaften wie die Protein oder inaktivierte Viren.

Im Mittelpunkt dieser Diplomarbeit steht die Analyse der immunsuppressiven Eigenschaften retroviraler TM-Proteine. Besonders soll der Einfluss der beiden transmembranen Hüllproteine p15E des felines Leukämievirus FeLV, einem γ -Retrovirus, und gp41 des humanen Lentivirus HIV-1 bei der Pathogenese untersucht werden. Hierzu werden vor allem zwei Strategien zur Analyse der immunmodulatorischen Wirkung dieser Proteine angewandt.

Einerseits sollen potentielle Bindungsproteine bzw. Rezeptoren des rekombinanten p15E mithilfe von Affinitätschromatographischen Methoden aus dem Lysat der T-Lymphocytenzelllinie C8166 aufgereinigt und identifiziert werden. Zum anderen soll der Einfluss der rekombinanten Proteine rp15E und gp41, sowie eines von gp41-abgeleiteten ISU-Peptids, auf die Produktion von IL-10 und anderer Cytokine durch humane PBMCs untersucht werden. Hierzu sollen sowohl ein IL-10 spezifischer Testassay als auch ein Cytokinarray eingesetzt werden, mit dem die Ausschüttung von 22 weiteren Cytokinen in den Kulturüberstand ermittelt werden kann.

Die beiden rekombinanten TM-Proteine p15E und gp41 in einem E.coli Expressionssystem exprimiert und über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Um sie im IL-10 Assay und im Cytokinassays einsetzen zu können, sollte das Problem der Endotoxinkontamination gelöst werden. Hierzu soll vor allem neues System zur Abreicherung getestet oder ein eukaryontisches Expressionssystem eingeführt werden.

Die synthetisierten ISU-Peptide sollen mithilfe eines chemischen Crosslinkings zu Homopolymeren gekoppelt und mit Gelelektrophorese und Western Blot Analysen charakterisiert werden, bevor im IL-10 Assay und im Cytokinarray die Aktivität der Homopolymere bestimmt werden soll.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt von den Firmen Roth, Sigma oder Merck bezogen.

AEBSF (Pefabloc® SC)	Fluka, Buchs, CH
Blasticidin S HCl	Invitrogen, Karlsruhe
FBS	Biochrom, Berlin
Geneticin (G418-Sulfat)	Gibco BRL, Karlsruhe
Glutamin 200 mM Stammlösung	Biochrom, Berlin
HEPES Puffer 1 M	Biochrom, Berlin
10.000 U/ml Penicillin/10.000 µg/ml Streptomycin Lösung	Biochrom, Berlin
EDC	Pierce, Rockford, USA
Sulfo-NHS	Pierce, USA

2.1.2 Kommerzielle Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Ni-NTA Spin Columns (50)	QIAGEN, Hilden
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit (250)	GENOMED, Löhne
QIAquick® Gel Extraction Kit (250)	QIAGEN, Hilden
QIAquick® PCR Purifikation Kit (250)	QIAGEN, Hilden
Endofree® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
EndoTrap 5/1 Endotoxin removal system	Profos AG, Regensburg
Human Cytokine Array I	RayBiotech, Norcross, USA
OptEIA™ human IL-10 Set	BD Biosciences, Heidelberg
Subcellular Proteome Extraction Kit	Calbiochem, Bad Soden

2.1.3 Enzyme

Polymerasen	
High-Fidelity DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
PfuTurbo® DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Restriktionsenzyme	
Bam HI	New England Biolabs (NEB), Frankfurt a.M.
Bgl II	NEB
EcoRI	NEB
Not I	NEB
Pst I	NEB
Sal I	NEB
Ligasen	
T4-DNA-Ligase	NEB
T4-Quickligase	NEB
Proteasen	
Trypsin	Gibco-BRL, Karlsruhe, D

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung
Immunserum Ziege 16 (PERV rp15E)	1 : 250
Immunserum Ziege 1 (HIV isu-Peptid)	1 : 250
α -V5-Antikörper (Invitrogen, R960-25)	1 : 5.000
α -Nucleolin-Antikörper (Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA)	1 : 2.000
α -GAPDH-Antikörper (Abcam, Cambridge, GB)	1 : 2.000
Humaner monoklonaler Antikörper 2F5 (AIDS Research and Reference Program, Division of AIDS, NIAD, NIH)	1 : 4.000
Sekundärantikörper	Verdünnung
α -Rabbit IgG POD (Sigma, A3937)	1 : 2.000
α -Mouse IgG POD (Sigma, A4416)	1 : 2.000
α -Goat IgG POD (Sigma, A4174)	1 : 2.000
α -Human IgG-FITC (Sigma, A)	1 : 5.000

2.1.5 Vektoren

pCal-n Vektor (Stratagene, La Jolla, USA)

Das Affinity[®] Proteinexpressions- und Reinigungssystem bietet eine einfache und effiziente Möglichkeit, N-terminal mit dem nur 4 kDa großen Calmodulin-Bindeprotein (CBP) fusionierte, rekombinante Proteine aus E. coli Extrakten zu reinigen. Der Vektor pCal-n nutzt die hohe Selektivität der T7 lac Promotorkonfiguration, um mithilfe des lacI_q-Gens eine starke Repression im nichtinduzierten Zustand, sowie eine hohe Expression bei Induktion zu gewährleisten (Abbildung 2.1).

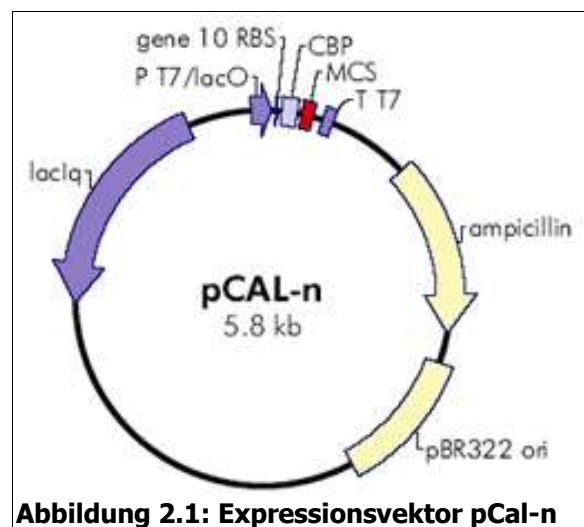


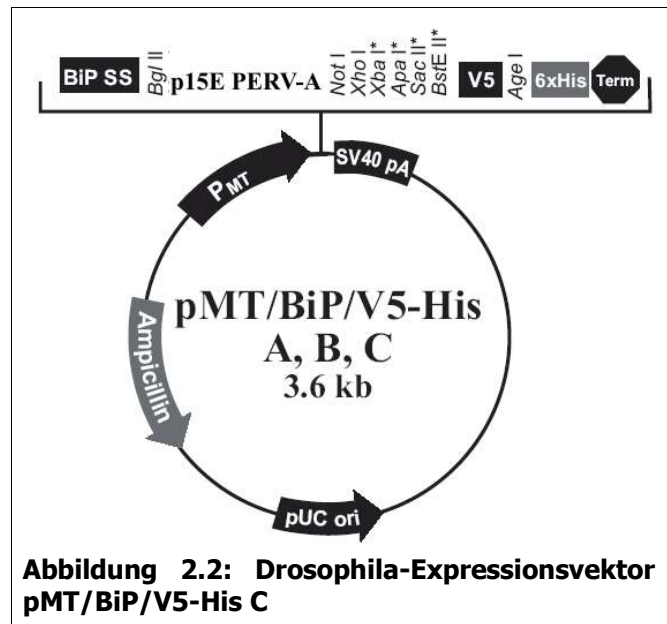
Abbildung 2.1: Expressionsvektor pCal-n

Die CBP-Fusionsproteine können dann direkt aus den Zelllysaten der Bakterien mit einer Calmodulin-Affinitätschromatographie unter nativen Pufferbedingungen und bei neutralem pH in einem Durchgang gereinigt und konzentriert werden [109].

pMT/BiP/V5-His C (Invitrogen, Karlsruhe, D)

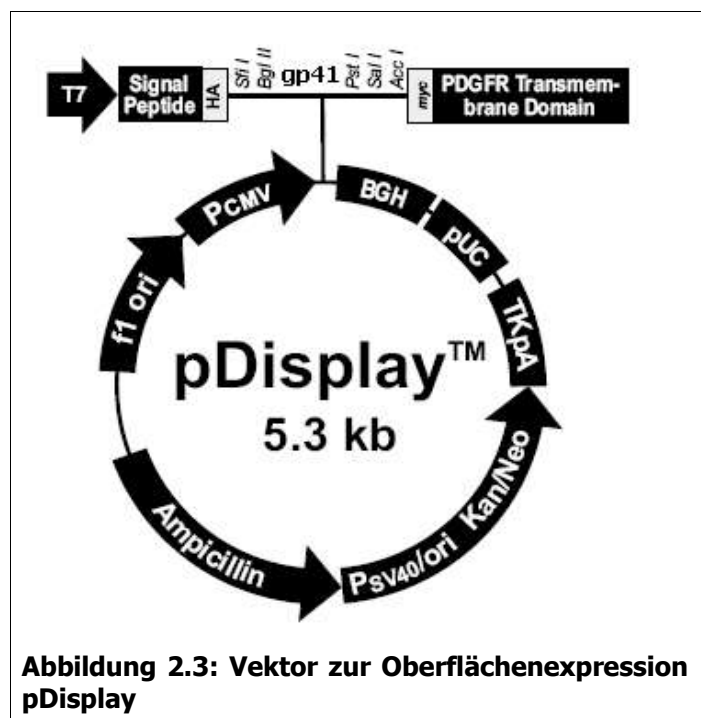
Der eukaryontische Expressionsvektor pMT/BiP/V5-His C ist speziell für das Inducible/Secreted-System in Drosophila Schneider 2-Insektenzellen entworfen, und erlaubt mithilfe des BiP-Sekretionssignals die Sekretion der rekombinanten Proteine, die unter Kontrolle eines Metallothionein-Promotors stehen, in den Kulturüberstand. Der Vektor besitzt außerdem ein C-termi-

nal gelegenes V5-Epitop zur Detektion mit α -V5-Antikörpern und einen ebenfalls C-terminalen Polyhistidin-(6xHis)-Tag zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins, sowie das BiP-Sekretionssignal (Abbildung 2.2). Die Induktion erfolgt durch Zugabe von Metallionen wie Kupfersulfat in einer Endkonzentration von 500 μ M oder 10 μ M Cadmiumchlorid ins Medium. Die rekombinanten Proteine können dann aus dem Kulturüberstand, nach vorhergehender Umpufferung, über eine Nickel-NTA-Säule affinitätschromatographisch unter nativen Bedingungen aufgereinigt und konzentriert werden [110, 111].



pDisplay-gp41

pDisplay™ ist ein 5.3 kb großer Expressionsvektor, der es ermöglicht, Proteine auf der Zelloberfläche zu exprimieren. Rekombinante Proteine kloniert in pDisplay™ sind am N-Terminus mit der murinen Ig κ -Ketten Leadersequenz fusioniert, welche das Protein ins Endoplasmatische Retikulum dirigiert (Abbildung 2.3). Der verwendete Vektor enthält das transmembrane Protein gp41 von HIV-1, das mit den beiden Enzymen BglII und Pst I kloniert wurde (M. Schmolke, AG Denner). Das gp41-Konstrukt besitzt eine eigene Transmembrandomäne und endet mit einem Stoppcodon. Die vektoreigene Transmembrandomäne des PDGF-Rezeptors wird daher nicht transkribiert, ebensowenig das myc-Epitop.



2.1.6 Bakterienstämme

BL21(DE3) strain (Stratagene, La Jolla, USA) E. coli B F'dcm ompT hsdS(rB'mB') gal λ (DE3) OneShot®TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, D)

2.1.7 Zelllinien

Die folgenden Zelllinien wurden eingesetzt:

Zelllinie	Offizielle Zellennummer	Art der Zelllinie	Bezugsquelle
C8166	ECACC-Nummer: 88051601	HTLV-1 transformierte T-Lymphocytenzelllinie	ATCC (Rockville, USA)
293 FDA	ATCC-Nummer: CRL-1573	Embryonale Nierenepithelzelllinie	ECACC (Salisbury, GB)
CL 8-1		Murine BL6 Melanomzelllinie	E. Gorelik (Pittsburgh, USA)
Schneider 2		Embryonale Drosophila-Zelllinie	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8 Laborgeräte

Analysenwaage	AC 211 S, Sartorius, Göttingen
ELISA Reader	Spectra Classic, Tecan, Crailsheim
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse E600, Nikon, Düsseldorf
Fraktionssammler	SuperFrac, Pharmacia, Freiburg
Geldokumentationsgerät	Gel Doc 2000, Bio-Rad, München
Inkubator	CO ₂ Incubator MCO-20AIC, Sanyo, München
Inversmikroskop	ID 03, Zeiss, Jena
Konzentrator	Concentrator 5301, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5403, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
PCR Cyler	PTC-200, MJ Research, Waltham, USA
pH-Meter	MP220, Mettler Toledo, Gießen
Photometer	Helios, Thermo Electron Corporation über Fisher Scientific, Ulm
Schüttelinkubator	Innova 4330, New Brunswick Scientific, Nürtingen
Sterilbank	Steril Gard Class2 Type A/B 3, The Baker Company, Sanford, Maine USA
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Ultraschallgerät	Branson Sonifier II 250, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Ultraschallstab	Branson Modell 102C, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
UV-Photometer	UV-1202, Shimadzu, Duisburg
Zentrifuge	Avanti J-20xP, Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0R, Kendro, Langenselbold

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die Vervielfältigung von beliebigen DNS-Sequenzen in einer exponentiellen Weise mithilfe einer thermostabilen DNS-Polymerase, Desoxynukleotiden und geeigneten Primern. Die PCR ist ein zyklischer Prozess, bei dem das Aufschmelzen der DNS-Doppel-

stränge, die Anlagerung der Primer (Annealing), sowie die Verlängerung der freien 3'-Enden in derselben Weise mehrfach hintereinander erfolgen. Möglich wurde dies durch die Entdeckung von thermostabilen DNS-Polymerasen aus Archaeobakterien wie *Thermophilus aquaticus* [112-114].

rp15E von PERV-A aus pCal-n

Zur Klonierung des rekombinanten Transmembranproteins rp15E aus PERV in den Drosophila-Expressionsvektor pMT/BiP/V5/His-C wurde die Sequenz aus dem bereits klonierten Vektor pCal-n/rp15E [115] mittels PCR mit den Schnittstellen für BamHI und Sal I an der 5' bzw. 3'-Ende versehen und amplifiziert.

Primer p15E_BamHI_forward:	5' TAT GGA TCC CTA ATC ACA GGA CCG CAA CAG 3'
Primer p15E_Not I_reverse:	5' TAT GCG GCC GCG TTG AAC CAT CCT TCA AAC CA 3'

Für die PCR wurden generell 25 µl-Ansätze verwendet. Folgendes Protokoll führte zu dem gewünschten Fragment mit einer Länge von etwa 350 bp.

Ansatz:
5 µl Template (pCal-n/rp15E) ≈ 12,5 ng
1 µl 5 mM dNTPs (200 µM)
1,5 µl Primer p15E_BamHI_forward (200 µM)
1,5 µl Primer p15E_Not I_reverse (200 µM)
2,5 µl 10x Cloned Pfu DNA-Polymerase reaction buffer
1 µl PfuTurbo®DNA-Polymerase (2,5 U)
12,5 µl ddH ₂ O nukleasefrei

Verwendet wurde das folgende PCR-Programm:



IRES-DsRed-Sequenz aus pLV-tTR/KRAB-Red

Zur besseren Detektion von transformierten Zellen wurde in den Vektor pDisplay-gp41 ein Fragment mit einer IRES-Sequenz gefolgt von der Sequenz des rot-fluoreszierenden Proteins DsRed kloniert. Hierzu wurde das DNS-Segment aus dem Vektor pLV-tTR/KRAB-Red (Prof. D. Trono, Genf, CH) mittels PCR vervielfältigt und über die Primer mit Schnittstellen für die beiden Restriktionsenzyme Sal I und Not I versehen.

Primer DsRed_Sal I_up:	5' GCG CGT CGA CAG TTT AAC CCG GGT AAA TTC 3'
Primer DsRed_Not I_down:	5' TTA AGC GGC CGC CTA CAG GAA CAG GTG GT 3'

Für die PCR wurden generell 25 µl-Ansätze mit folgendem Protokoll verwendet:

Ansatz:
1 µl Template (pLV-tTR/KRAB-Red) ≈ 2 ng
1 µl 5 mM dNTPs (200 µM)
1,5 µl Primer DsRed_Sal I_up (200 µM)
1,5 µl Primer DsRed_Not I_down (200 µM)
2,5 µl 10x Cloned Pfu DNA-Polymerase reaction buffer
1 µl PfuTurbo [®] DNA-Polymerase (2,5 U)
16,5 µl ddH ₂ O nukleasefrei

Verwendet wurde das folgende PCR-Programm:



2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Die Auftrennung von DNS-Fragmenten und Plasmiden erfolgte mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen. Die Porengröße der Agarosematrix ist abhängig von der Konzentration, zur Auftrennung von PCR-Produkten (<500 bp) wurden daher 2 %ige (w/v) Agarosegele, zur Trennung von Plasmiden und großen DNS-Fragmenten 1,2 %ige (w/v) Gele verwendet. Weiterhin wurde zum Aufkochen der Agarose als Gelpuffer 1x TAE-Puffer benutzt. Nach Gelierung des Gel ($T < 40^{\circ}\text{C}$) wurden die Proben mit 10x Gelladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenvergleich dienten zwei DNS-Marker: eine 100 bp Plus-Leiter und eine 1 kb-Plus-Leiter. Die Elektrophorese wurde bei einer Laufspannung des Gels von 5-8 V/cm ($\sim 80\text{ V}$) durchgeführt. Nach dem Lauf wurde das Gel für 20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (5 mg/l) gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert mit DNS-Doppelsträngen und kann dann mit UV-Licht ($\lambda = 254\text{ nm}$) zur Fluoreszenz angeregt werden ($E_{\text{max}} = 590\text{ nm}$). Die Gele wurden anschließend mit dem BioRad GelDoc2000 dokumentiert.

50x TAE-Puffer

2 M Tris-Base
 1 M Essigsäure konzentriert
 50 mM EDTA

10x Gelladepuffer

50 % (w/v) Glycerol
 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 1 mM EDTA
 0,3 % (w/v) Bromphenolblau
 0,3 % (w/v) Xylencyanol FF

Längenstandard

1 kb Plus DNA Ladder (Fa. Gibco BRL, Großbritannien)
 100 bp DNA Ladder (Fa. Gibco BRL)

DNS-Fragmente können aus Agarosegelen wieder zurückgewonnen werden. Die entsprechenden Banden wurden dazu ausgeschnitten und mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hildesheim, D) nach Herstellerangaben extrahiert. Nach Auflösung der Gelmatrix in einem Puffer wurde die DNS an eine Säule mit einer Silikamatrix gebunden. Die freie DNS wurde anschließend mit 30 µl nukleasefreiem Wasser oder TE-Puffer eluiert. Zur Abschätzung

der Konzentration wurden 2 µl zusammen mit einem Standard bekannter Konzentration auf ein Gel aufgetragen.

2.2.3 Restriktionsverdau

Um DNS-Stränge sequenzspezifisch zu spalten, verwendet man Restriktionsendonukleasen vom Typ II. Diese erkennen jeweils eine 4-8 bp lange palindromische Sequenz und schneiden den DNS-Doppelstrang entweder mit Überhängen („sticky ends“) oder ohne Überhänge („blunt ends“). Jedes Restriktionsenzym benötigt einen speziellen Puffer und eine spezifische Inkubationstemperatur, die entsprechend den Herstellerangaben gewählt wurden. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme benötigten alle eine Temperatur von 37°C. Meistens wurden 1 µg DNS (PCR-Produkt oder Vektor) mit 5 U Enzym für 2 h inkubiert und dann über Gelelektrophorese kontrolliert.

2.2.4 Ligation

DNS-Fragmente mit überhängenden Enden können durch eine Ligation miteinander kovalent verknüpft werden. Dies wird möglich durch Ligasen, wie die T4-DNS-Ligase, die energieabhängig eine Esterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-OH-Gruppe herstellen können. Um Religationen des Vektors ohne Insert zu vermeiden, wurde der geschnittene Vektor mit der Antarctic Phosphatase (NEB, USA) behandelt, um die Phosphatgruppe zu entfernen. Hierzu wurde der Restriktionsansatz mit 3 µl 10x AP-Puffer und 1,5 µl AP versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Ligation führte man entweder mit T4-Ligase oder QuickLigase™ (NEB, USA) durch. Ein Ligationsansatz von 20 µl umfasst etwa 50 ng Vektor, sowie ein 3-5 facher molarer Überschuss an Insert. Hierzu kommt nun noch 2 µl 10x T4-Ligasepuffer oder 10 µl 2x QuickLigation-Puffer und jeweils 1 µl Ligase, sowie ddH₂O auf das Endvolumen. Die Inkubationszeit für die QuickLigase™ beträgt 5 min bei 25°C, für die T4-DNS-Ligase 1 h bei RT.

2.2.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterien besitzen die Möglichkeit, exogene DNS vollständig und ungeschnitten aufzunehmen und diese an ihre Nachkommen weiterzugeben. Diesen Zustand bezeichnet man als Kompetenz. Bakterien können auf unterschiedliche Weise kompetent gemacht werden. Die in dieser Arbeit angewandte Methode ist die Rubidiumchlorid-Methode (nach Qiagen, Hilden). Aus einer Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Medium 1:1000 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde für 5 min auf Eis gekühlt und die Bakterien Beckman-Zentrifuge pelletiert (10 min, 4.000 g, 4°C). Anschließend folgte die Resuspendierung des Pellet in 30 ml TFB I-Puffer. Der Ansatz wurde für 90 min auf Eis inkubiert und die Bakte-

rien erneut pelletiert (10 min, 4.000 g, 4°C). Das Pellet wurde daraufhin in 4 ml eiskaltem TFB II-Puffer resuspendiert und zu je 100 µ aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TFB 1 (pH 5,8)

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂
30 mM Kaliumacetat
10 mM CaCl₂
15 % (v/v) Glycerin

TFB 2 (pH 6,8)

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15 % (v/v) Glycerin

Beide Lösungen müssen sterilfiltriert und bei 4°C gelagert werden.

2.2.6 Transformation kompetenter Bakterien

Transformation von E.coli OneShot® Top10 und E.coli BL21 (DE3).

Ein Aliquot von 100 µl der kompetenten Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und mit 5-10 µl der Ligation vermischt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 s bei 42°C im Wasserbad erhitzt. Nun für 2 min auf Eis inkubieren und mit 500 µl warmem LB-Medium versetzen. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 37°C im Schüttler für 1 h inkubiert. Dann wurden die Bakterien nochmals pelletiert (12.000 g, 1 min, RT) und in 50 µl LB-Medium resuspendiert. Die Zellen könnten dann auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen werden.

LB-Medium (pH 7,0)

NaCl
10 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g ad 1 L mit ddH₂O
auffüllen

LB-Agar (pH 7,0)

10 g NaCl
10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
20 g Agarose
ad 1 L mit ddH₂O auffüllen

Zu den Medien kann nach dem Autoklavieren das gewünschte Antibiotikum, hier Ampicillin (Serva, Heidelberg, D) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben werden.

2.2.7 Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen erfolgte mittels kommerzieller Kits der Firmen Qiagen (Hilden) oder Genomed (Löhne). Zur Kontrolle von Transformationen wurde die sogenannte MiniPrep zur Gewinnung von etwa 10 µg DNS mit dem Kit von Genomed entsprechend der Herstelleranleitung durchgeführt. Die DNS wurde hierbei mit nukleasefreiem Wasser von der Silikamatrixsäule eluiert.

Zur Gewinnung von größeren Mengen an Plasmid-DNS, etwa zur Klonierung oder Transfektion, wurde das Maxi bzw. Endofree Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet. In beiden Fällen erfolgte die Durchführung nach Herstellerangaben. Das erhaltene DNS-Pellet wurde dann in 100 µl TE-Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.8 DNS-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen kann photometrisch bestimmt werden. Hierbei wird die Extinktion der Lösung in einer Quarzküvette (Schichtdicke $d = 1$ cm) bei den Wellenlängen $\lambda = 260$ nm und 280 nm bestimmt. Eine Extinktion $E_{260} = 1,0$ entspricht etwa einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNS. Der Wert bei $\lambda = 280$ nm bestimmt den Anteil an Protein in der Probe, bei einer Ratio 260/280 nm $\geq 1,9$ geht man von einer reiner Nukleinsäurelösung aus.

2.2.9 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung der gewünschten Konstrukte erfolgte nach der Dideoxy-Methode [116]. Durch einen gewissen Anteil an 2',3'-ddNTPs, die jeweils mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, erfolgt mit einer statistischen Verteilung ein Synthesabbruch in der Sequenzierungsreaktion. Ein 10 μl Reaktionsansatz besteht aus 200 ng Plasmid-DNS, 5 pMol Primer, 2 μl BigDye[®] Terminator v3.1 Nukleotidgemisch (Applied Biosystems), sowie einem 5x Reaktionspuffer. Die unterschiedlich langen Bruchstücke können dann über Kapillarelektrophorese getrennt und analysiert werden. Dies erfolgte im institutseigenen Service-Labor. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden im Anschluss mit dem Programm DNASTar bearbeitet und analysiert.

2.2.10 Expression rekombinanter Proteine in Bakterien

Der bereits beschriebene Expressionsvektor pCal-n mit dem rekombinanten Transmembranprotein p15E von FeLV (S. Langhammer, AG Denner) wurde in BL21-Zellen transformiert. Die transformierten Bakterien wurden aus einem Glyzerolstock in eine 3 ml LB-Übernachtskultur (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) überimpft. Diese wurden am nächsten Tag 1:1000 in eine 1 L Amp-LB-Kultur (100 $\mu\text{g/ml}$) überimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,5 geschüttelt. Dann erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen in einer Beckmann-Zentrifuge pelletiert (6.000 g, 15 min, 4°C), der Überstand verworfen und die Pellets bei -20°C eingefroren.

2.2.11 Expression rekombinanter Proteine in S2-Zellen

Die Induktion des Expressionsvektors pMT/BiP/V5-His C erfolgte durch Zugabe einer CuSO_4 -Lösung in einer Endkonzentration von 500 μM und anschließender Inkubation von 24-48 h bei 24°C. Da es sich um einen Sekretionsvektor handelt, kann das rekombinante p15E von PERV-A aus dem Kulturmedium isoliert werden. Zur besseren Reinigung der Proteine kann die Kultivierung der Schneider 2-Zellen in serum-freiem Medium erfolgen.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Kopplung von Peptiden

In den meisten Fällen sind kleine Moleküle unter etwa 4 kDa allein nicht in der Lage, Effekte an Immunzellen zu induzieren. Sie müssen daher an größere Trägerproteine gekoppelt oder selbst zu Polymeren verknüpft werden. In diesem Fall wurde die Kopplung zu Homopolymeren gewählt, um eine höhere Valenz (Multiplizität) an wirksamen Peptiden in den Assays zur Messung der Immunsuppression zu erreichen.

Alle Kopplungen wurden mit einer chemischen Kopplungsmethode unter Verwendung von EDC, einem reaktiven Carbodiimid, durchgeführt. Die Besonderheit dieser Methode ist die direkte Kopplung von Peptiden, ohne den üblichen Spacer. Dieses Carbodiimid reagiert mit freien Carboxyl-Gruppen und bildet reaktive Intermediate, die mit primären Aminen Amidbindungen herstellen können. Zur Effizienzsteigerung der Reaktion im neutralen pH-Bereich wurde das lösliche Succinimidanalogon Sulfo-NHS zugegeben, welches die Halbwertszeit der reaktiven Ester deutlich in den Bereich von Stunden erhöht.

Herstellung von Homopolymeren

Die Peptide HIV-ISU und HIV-ran5 wurden mittels Festphasensynthese produziert, über HPLC aufgereinigt und massenspektrometrisch kontrolliert (Jerini, Berlin, D). Bei dem Peptid HIV ran5 wurde die ISU-Originalsequenz gezielt so verändert, dass das Molekulargewicht und die Gesamtladung des Peptids identisch sind, aber eine andere Aminosäureabfolge besteht. Beide Peptide besitzen ein mittleres Molekulargewicht von 2,3 kDa.

Peptid	Sequenz
HIV ISU:	NH ₂ - KQLQARILAVERYLKDQQL -CONH
HIV ran5:	NH ₂ - LQRLRKQQYIDKQAALVLE -CONH

Von den Peptiden wurden daraufhin 8 mg abgewogen und in 2 ml PBS gelöst. Danach wurde die Peptidlösung mit 38,4 mg EDC versetzt und gut vermischt. Anschließend wurden 2 mg Sulfo-NHS zugegeben und erneut sorgfältig gemischt. Der Ansatz wurde dann für 3 h bei RT inkubiert und in regelmäßigen Abständen gemischt. Das Reaktionsgemisch daraufhin in einen Dialyseschlauch (MWCO: 1000 Da) überführen und für 5 Tage gegen 1x PBS bei 4°C dialysiert. Das dialysierte Kopplungsgemisch wurde nun aliquotiert und eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Kopplung an Magnetbeads

Die Magnetbeads (BioMag 84125-10, Polysciences, Warrington, USA) wurden resuspendiert und 1 ml entsprechend 20 mg entnommen. Diese wurden in den Dynal-MCR-S-Magneten (Fa. Dynal A.S., Oslo, N) gegeben und dreimal mit je 2 ml Kopplungspuffer gewaschen, an-

schließlich wurden die Beads in 1 ml Kopplungspuffer resuspendiert. Es wurden 400 µl der EDC-Lösung hinzugegeben, dann etwa 2 mg rp15E von FeLV zugefügt. Diesen Ansatz wurde für etwa 60' bei RT inkubieren und gelegentlich gemischt.

Der Überstand wurde im Dynal MCR-S entfernt, die Beads fünfmal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und zur Aufbewahrung die Magnetbeads in 1 ml Waschpuffer resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Die gefriergetrocknete Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Uppsala, S) wurde in 1 mM HCl resuspendiert und nach dem Quellen für 15 min in 1 mM HCl gewaschen. Dabei ergibt etwa 1 g Trockensepharose ein Gelvolumen von 3,5 ml. Der Ligand wurde über Nacht gegen Kopplungspuffer dialysiert. Man benötigt mindestens 5 mg Ligand pro ml Gelvolumen. Die Koppungslösung mit dem gelösten Liganden wurde mit dem Gel gemischt und für 1 h bei RT rotiert. Daraufhin wurde das Gel mit dem 5fachen Volumen an Kopplungspuffer gewaschen und alle nicht gekoppelten aktivierten Gruppen in Blockierungspuffer für 2 h bei RT blockiert. Der Ansatz wurde dann dreimal mit den beiden Waschpuffern gewaschen und das fertige Gel in eine Säule verpackt.

Kopplungspuffer

100 mM NaHCO₃ (pH 8,3)
500 mM NaCl

Blockierungspuffer

100 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Waschpuffer 1

100 mM NaOAc (pH 4,0)
500 mM NaCl

Waschpuffer 2

100 mM Tris-HCl (pH 8,0)
500 mM NaCl

2.3.2 CBP-Affinitätschromatographie

Die pelletierten Zellen wurden in 40 ml Bindungspuffer resuspendiert und für 3 min mit Ultraschall (60 % Duty cycle, Output control 5) auf Eis aufgebrochen. Das Lysat wurde dann für 30 min bei 25.000 g in einer Beckman-Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Der so erhaltene Proteinextrakt wurde anschließend affinitätschromatographisch über eine Calmodulinsäule aufgereinigt.

Hierbei wurde als Säulenmaterial eine Sepharosematrix verwendet, die kovalent mit Calmodulin (CaM) gekoppelt ist (Stratagene, La Jolla, USA). In Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen bindet der N-terminale CBP-Tag des rekombinanten Proteins an CaM und andere Proteine konnten durch Waschen entfernt werden. Anschließend wird Ca²⁺ durch Zugabe von EGTA chelatiert, so dass sich die Bindung zwischen CBP und CaM löst und das Fusionsprotein eluiert werden kann.

Vor der eigentlichen Säulenchromatographie wurde das CaM-Säulenmaterial aus dem Lagerpuffer in CaCl₂ Bindungspuffer überführt, hierzu wurde das Säulenmaterial in Lagerpuffer einige Minuten sedimentiert und der Überstand dann vorsichtig abgegossen. Nun wurde das Säulenmaterial in Bindungspuffer resuspendiert. Mit dieser Suspension wurde daraufhin eine 15 cm lange Plexiglassäule (Pharmacia) beladen und mit 5 Säulenvolumen Bindungspuffer gewaschen.

Dann wurde bei 4 °C über Nacht das Proteinlysate in einem geschlossenen Kreislauf mehrmals über die Säule gepumpt. Am nächsten Tag wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Bindungspuffer gewaschen, um alle nicht gebundenen Proteine zu entfernen. Anschließend wurde das gebundene Protein mit Elutionspuffer von der Säule eluiert, wobei mit einem Fraktionssammler 20 Fraktionen von jeweils 1,5 ml gesammelt wurden.

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt und die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt. Danach wurde die Säule nochmals mit 5 Säulenvolumen Elutionspuffers gewaschen und mit jeweils 3 Säulenvolumen Regenerationspuffer 1 bis 3 regeneriert. Nachdem die Säule zuletzt mit 5 Säulenvolumen Bindungspuffer äquilibriert wurde, konnte sie erneut verwendet werden.

Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, eingengt und einer erneuten Konzentrationsbestimmung unterzogen. Für weitere Versuche wie die Endotoxinanreicherung, ist es in den meisten Fällen notwendig, das im Elutionspuffer enthaltene EGTA durch Dialyse oder Umpufferung zu entfernen.

CaCl₂-Bindungspuffer

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
150 mM NaCl
10 mM β-Mercaptoethanol
1 mM Magnesiumacetat
1 mM Imidazol
2 mM CaCl₂

Elutionspuffer

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
10 mM β-Mercaptoethanol
2 mM EGTA
150 mM NaCl

Regenerationspuffer 1 (pH 8,6)

100 mM NaHCO₃
2 mM EGTA

Regenerationspuffer 2

1 M NaCl
2 mM CaCl₂

Regenerationspuffer 3 (pH 4,4)

100 mM Natriumacetat
2 mM CaCl₂

2.3.3 Affinitätschromatographie mit p15E gekoppelt an Sepharose 4B

Zur Aufreinigung eines Bindungsproteins für die immunsuppressive Domäne von γ -Retroviren wurde eine Affinitätschromatographie mit einer rp15E gekoppelten Sepharosesäule durchgeführt. Hierfür wurden drei 150 cm²-Zellkulturflaschen (TPP, Trasadingen, CH) von C8166-Kulturen geerntet. Die Zellen wurden dreimal mit 30 ml PBS (+ 250 μ M AEBSF) gewaschen und mit 1.200 g für 10 min bei RT pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (Kap.2.4.2). Die Zellen wurden erneut pelletiert und mit Lysispuffer in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Die Zellen wurden dann für 3 h bei 4°C über Kopf rotiert. Das Lysat wurde daraufhin mit 6.000 g für 10 min bei 4°C in einem Beckman-Rotor JA 25.50 zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und 1:1 mit PBS verdünnt. Das klare Lysat wurde nun über Nacht in einem geschlossenen Kreislauf bei 4°C über die Säule gepumpt. Am nächsten Morgen wurde die Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen PBS gewaschen und anschließend mit einem Gradienten von 150 mM bis 2 M NaCl in PBS die gebundenen Proteine eluiert. Es wurden jeweils Fraktionen von 1,5 ml gewonnen und die Proteinkonzentration bestimmt.

Die rp15E Sepharosesäule wurde abschließend dreimal alternierend mit den beiden Regenerationspuffern I und II regeneriert. Danach wurde die Säule mit PBS (+ 250 μ M AEBSF) äquilibriert und konnte wiederverwendet werden.

Affinitätspräzipitation mit rp15E an Magnetbeads gekoppelt

C8166-Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und gezählt. Davon wurden 5×10^6 Zellen in 100 μ l PBS resuspendiert und mit 500 μ l M-PER Lysispuffer (Perbio, USA) zur Gewinnung der Membranfraktion versetzt. Der Ansatz wurde bei RT für 30 min unter Schütteln inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden nun bei 10.000 g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Tube überführt.

Zu der Membranfraktion wurde 30 μ l der Magnetbeadsuspension gegeben und bei 4°C über Nacht rotieren gelassen. Nachdem die Proben im Magnetständer (Dynal MCR-S, Fa. Dynal A.S., Oslo, Norwegen) fünfmal mit 1 ml PBS gewaschen wurden, wurden sie mit 30 μ l Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C aufgekocht. Anschließend wurden die Proben mit 6.000 g für 10 min zentrifugiert und 20 μ l auf ein 8 %iges SDS-Gel aufgetragen.

Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Um rekombinante Proteine mit einem 6x His-Tag unter nativen Bedingungen aufzureinigen zu können, wurde die immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) mit Qiagen Spin Columns entsprechend Anbieterprotokoll durchgeführt. Das Zellkulturmedium der induzierten

Kultur wurde abgenommen, über Konzentrationskartuschen (Vivaspin 2, MWCO 5.000, Vivascience, Göttingen) konzentriert und in Bindungspuffer aufgenommen. Das gewonnene Eluat wurde dann mittels Western Blot und SDS-PAGE auf Vorkommen des rekombinanten Proteins überprüft.

Wasch-/Bindungspuffer NPI-5

50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)
300 mM NaCl
5 mM Imidazol

Elutionspuffer NPI-250

50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)
300 mM NaCl
250 mM Imidazol

2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen wurden zwei verschiedene Methoden herangezogen, zum einen der Bio-Rad Protein Assay und zum anderen der BCA Protein Assay Kit von Pierce. Die Bestimmung erfolgte jeweils mittels einer Eichgeraden, für die als Standard für die Quantifizierung bei beiden Methoden BSA in Konzentrationen von 200, 400, 600, 800, 1000 und 1200 µg/ml eingesetzt wurde. Um Pipettierfehler zu minimieren, wurden von allen Proben inklusive des Standards Dreifachbestimmungen angefertigt.

Bio-Rad Protein Assay

Der Bio-Rad Protein Assay nutzt eine von Bradford et al. beschriebene Methode [117], die auf einer Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau R-250 an Seitenketten von Proteinen basiert, wodurch das Absorptionsmaximum von 470 nm nach 595 nm verschoben wird.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde in einer 96-well Mikrotiterplatte pro Well 195 µl des Bradfordreagenz (1:5 Verdünnung der Stammlösung in Wasser) vorgelegt und mit 4 µl Probe, Standard oder Wasser gut durchmischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei RT. Dann wurden die Proben im Tecan Elisa Reader bei 560 nm vermessen und die Proteinkonzentration im Vergleich zur Eichgeraden bestimmt.

Pierce Protein Assay

Die Proteinbestimmung nach Pierce beruht auf der Reduktion von Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen durch die Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin. Die einwertigen Kupferionen werden jeweils durch zwei Moleküle BCA in der sogenannten Biuret-Reaktion chelatiert, dieser Komplex hat ein Absorptionsmaximum von 562 nm .

Für den Pierce Protein Assay wurde zuerst die Gebrauchslösung aus BCA Reagenz A und BCA Reagenz B hergestellt, hierfür wurden 50 Teile Reagenz A mit einem Teil Reagenz B gemischt.

Von der Gebrauchslösung wurden 200 µl pro Well einer Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend 10 µl Probe, Standard oder Wasser zugegeben und die Platte für 30 min bei 37° C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben im Tecan Elisa Reader bei 570 nm mit einer Referenz von 492 nm vermessen und die Proteinkonzentration im Vergleich zur Eichgeraden bestimmt.

2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung der Proteinisolate und Fusionsproteine wurde die Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet [118]. Hierbei liegen die Proben denaturiert vor und bilden einen Komplex mit SDS. Das Verhältnis von SDS zu Protein ist konstant, so dass die Anzahl negativer Ladungen proportional zur Größe des Proteins ist. Der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix trennt die SDS-Proteinkomplexe nach ihrem Molekulargewicht auf. Die Proteinproben wurden zur Analyse in einem 1,5 mm starken PAA-Gel aufgetrennt. Als Trenngel wurde ein 10 %iges Polyacrylamidgel, als Sammelgel ein 4 %iges Polyacrylamidgel verwendet. Zur Abschätzung der Molekulargewichte wurde als Massenstandard 10 µl des Markers SeeBlue® Plus2 (Invitrogen) eingesetzt. Zunächst wurden die Proteinproben mit dem gleichen Volumen Tricin-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert und aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 0,03 A im Sammelgel und 0,05 A im Trenngel in der Gelapparatur Hoefer SE 250 (mini vertical). Anschließend wurde das Gel entweder in Coomassie Färbelösung für 30 min gefärbt und danach in Entfärbelösung für mehrere Stunden entfärbt oder es wurde für die Western Blot Analyse eingesetzt.

Kathodenpuffer

100 mM Tris-Base (pH 8,25)
100 mM Tricin
0,1 % (w/v) SDS

2x Tricin-Probenpuffer

100 mM Tris-HCl (pH 6,8)
24 % (v/v) Glycerin
8 % (w/v) SDS
10 % (v/v) β-Mercaptoethanol
0,04 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250

Anodenpuffer

200 mM Tris-Base (pH 8,9)

Gelpuffer

3 M Tris-Base (pH 8,45)
0,3 % (w/v) SDS

Färbelösung

50 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
0,2 % (w/v) Coomassie Brilliantblau G-250

Entfärbelösung

25 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure

2.3.6 Western Blot

Ein sensitives Verfahren zum Nachweis von Proteinen nach einer Elektrophorese, sofern geeignete Antikörper zur Verfügung stehen, ist der Western Blot. Hierbei werden die Proteine durch ein elektrisches Feld auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen. Diese können danach mit spezifischen Antikörper markiert und mittels einer enzymgekoppelten Farbreaktion detektiert werden.

Das Trenngel wurde nach der Elektrophorese für 15 min in Transferpuffer äquilibriert, die PVDF-Membran Immobilon-P^{SO} (Porengröße 0,2 µm, Millipore, Schwalbach, D) zuerst auf Trenngelgröße zugeschnitten, in Methanol aktiviert und dann ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden jeweils ein Blotpapier (Criterion™, BioRad) für den oberen und unteren Abschluss mit Transferpuffer angefeuchtet. Nun wurde ein Sandwich aus Blotpapier, PVDF-Membran, dem PAA-Gel und erneut einem Blotpapier auf die Anode der Transferkammer (TransBlot Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) gelegt. Hierauf wurde die Kathode aufgelegt und die Kammer mit dem Deckel verschlossen. Der Semi-Dry Blot erfolgte mit 20 V für 50 min.

Die Membran wurde anschließend für 45 min mit Blockierungspuffer blockiert. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper verdünnt in Blockierungspuffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nun wurde der Blot dreimal für 5 min gewaschen und daraufhin der jeweilige Sekundärantikörper in Blockierungspuffer zugegeben. Anschließend wurde für 1 h bei RT inkubiert und der Blot nochmals dreimal für 5 min gewaschen. Die Entwicklung wurde mit einer DAB-Farblösung durchgeführt. Die 10 ml DAB-Lösung wurden mit 250 µl 30 % Wasserstoffperoxidlösung (Perhydrol®, Merck, Darmstadt) versetzt und die Bildung von rot-braunen Banden abgewartet. Bei ausreichender Entwicklung des Blots wurde die Reaktion durch Waschen mit ddH₂O gestoppt und der Blot getrocknet. Der Blot wurde dann in Folie eingeschweißt und fotografiert.

Blockierungspuffer

1 x PBS

0,05 % (v/v) Tween-20

5 % (w/v) Trockenmilchpulver (Fa. Sucofin, Zeven)

Waschpuffer

1 x PBS

0,05 % (v/v) Tween-20

2.3.7 Endotoxinanreicherung

Zur Endotoxinanreicherung von rekombinanten Proteinen aus Bakterienlysaten wurde das EndoTrap 5/1 System (Profos, Regensburg) verwendet. Dieses System besitzt eine neue auf spezifischen Phagenproteinen beruhende Affinitätsmatrix, die eine äußerst effiziente Entfernung von Endotoxin aus Proteinlösungen gewährleisten soll.

Die Proben wurden über Nacht gegen Equilibrierungspuffer bei 4°C dialysiert. Die EndoTrap-Säulen wurden zuerst mit 6 ml Regenerationspuffer gewaschen, und anschließend mit 6 ml Equilibrierungspuffer äquilibriert. Dann wurde die Probe auf die Säule gegeben und das Eluat sofort gesammelt. Nachdem die Probe die Säule komplett passiert hatte, wurde nochmals mit 6 ml Equilibrierungspuffer gewaschen. Davon wurden drei 2 ml Fraktionen genommen. Zur Lagerung der Säule wurde 1 ml 20 % Ethanol zugegeben und bei 4°C gelagert. Die Proben wurden danach einer Protein- und Endotoxinbestimmung unterworfen.

Regenerationspuffer (Profos)

Cat. no. 311067

Equilibrierungspuffer

50 mM Tris-HCl(pH 7,8)

100 mM NaCl

50 µM CaCl₂

2.3.8 Bestimmung des Endotoxinkonzentration

Die Bestimmung des Endotoxingehaltes beruht auf dem kinetischen LAL-Test. Endotoxinhaltige Proben verursachen beim Test eine Koagulation des Lysats. Die Konzentration berechnet sich nach dem Maß der Gerinnung in einer gegebenen Zeit, welches photometrisch bestimmt werden kann. Diese Messungen wurden am Paul-Ehrlich-Institut (Langen) durchgeführt.

2.4 Zellkulturtechniken und immunologische Methoden

2.4.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen

PBMCs sind eine Population von mononukleären Immunzellen, hauptsächlich Lymphocyten und Monocyten, die im peripheren lymphatischen System, also auch im Blut, vorhanden sind. Sie können daher aus frischen Blutproben isoliert und für in vitro Assays verwendet werden.

Die PBMCs wurden aus frischen Blutspenden in Leucosep[®]-Röhrchen (GreinerBio-one, Frickenhausen) überführt. Das Trennprinzip der Leucosep[®]-Röhrchen beruht auf einer Filterscheibe und einer Ficoll-Isopaque-Trennlösung darunter. Bis zu 30 ml Vollblutprobe wurden dann auf die Filterscheibe gegeben und für 10 min bei 1.000 g und RT zentrifugiert. Danach waren die Erythrocyten und Granulocyten unterhalb der Filterscheibe, während sich oberhalb des Filters ein deutlicher Ring aus PBMCs und darüber das Plasma befand. Das Plasma wurde mithilfe

einer Pipette abgenommen, und die PBMCs in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurden die Zelle mit 10 ml PBS versetzt, bei 250 g für 10 min bei RT zentrifugiert und daraufhin noch zweimal mit 5 ml PBS gewaschen.

2.4.2 Zellzahlbestimmung

Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Hämatocytometer) kann die Gesamtzahl an Zellen und mit Trypanblau zusätzlich die Vitalität der Zellen bestimmt werden. Nach Zugabe von Trypanblau färben sich tote Zellen blau, da die Zellmembran toter Zellen porös und deshalb, im Gegensatz zur Zellmembran lebender Zellen, durchlässig für Trypanblau ist. Allerdings muss schnell gearbeitet werden, da Trypanblau cytotoxische Eigenschaften besitzt, so dass auch lebende Zellen absterben, wenn sie zu lange der Trypanblaulösung ausgesetzt sind.

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität der Zellen wurden jeweils 20 µl der Zellsuspension und einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung gemischt und davon 20 µl in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgt nach folgenden Formeln:

$$\text{Gesamtzellzahl} = n * V_f * V * 10^4$$

$$\text{Lebendzellzahl} = m * V_f * V * 10^4$$

Hierbei sind n und m die Durchschnittswerte von 4 ausgezählten mittleren Quadraten, V_f der Verdünnungsfaktor, V das Volumen der Suspension und 10^4 der Kammerfaktor der Neubauer-Zählkammer.

Die Vitalität ergibt sich schließlich aus dem Verhältnis von lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100 = \frac{n}{m} \times 100 [\%]$$

In einer Zellsuspension sollte die Vitalität zwischen 90 % und 95 % liegen.

2.4.3 Zellkultur von eukaryontischen Zellen

Um Zellen für Versuche zur Verfügung zu haben, wurden diese in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert, wobei alle 48-72 Stunden ein Mediumwechsel vorgenommen wurde.

Passagieren von Zellen

Adhärenent wachsende Zellen müssen beim Erreichen der Konfluenz, d.b. wenn der gesamte Boden des Kulturgefäßes bewachsen ist, passagiert werden. Sonst können aufgrund der Kontaktinhibierung die Zellen nicht weiter im Monolayer wachsen.

Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS (ohne Kalzium und Magnesium) gewaschen. Um die Zellen von der Zelloberfläche zu lösen, wurden sie mit 0,25%iger Trypsinlösung versetzt und für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dabei richtete sich das Volumen des zugegebenen Trypsins nach der Größe der Zellkulturflaschen, 1 ml für 25 cm² Flaschen, 2 ml für 75 cm² Flaschen und 4 ml für 150 cm² Flaschen. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurden die Zellen durch Klopfen gegen die Flasche gelöst und die vollständige Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Das Trypsin wurde dann durch Zugabe des doppelten Volumens serumhaltigen Mediums inaktiviert und diese Suspension aus der Flasche in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in einer Dichte von $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ in neue Zellkulturflaschen mit bereits vorgelegtem frischen Medium überführt.

Kryokonservieren: Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eukaryontische Zellen können über längere Zeit nur bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Hierfür wurden etwa 1×10^7 Zellen pelletiert und in 1 ml eiskaltem FBS mit 5% DMSO aufgenommen, in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Hierbei ist es essentiell schnell zu arbeiten, da DMSO, das die zellmembranschädigende Kristallbildung beim Einfriervorgang verhindert, die Zellen im ungefrorenen Zustand abtötet.

Am folgenden Tag wurde das Kryoröhrchen aus dem -80°C Schrank in einen Lagertank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurde angewärmtes Medium in einer Zellkulturflasche vorgelegt. Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend zum Medium in die Zellkulturflasche gegeben. Nach spätestens 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, die Zellen gegebenenfalls passagiert und ihre Vitalität bestimmt.

2.4.4 Zellkultur von Schneider 2 Zellen

Beim Drosophila Expressionssystem (DES[®]) werden Schneider 2 Zellen aus *Drosophila melanogaster* zur Expression rekombinanter Proteine verwendet [119]. S2-Zellen benötigen eine Inkubationstemperatur von $22\text{-}24^\circ\text{C}$ und kein CO_2 . Sie wachsen praktisch bei Raumtemperatur als semiadherente Zellen in Kulturflaschen.

Passagieren von S2-Zellen

Da S2-Zellen bei Dichten über 5×10^6 Zellen/ml in Suspension gehen und Klumpen bilden, müssen sie regelmäßig alle 72 h passagiert werden. Die Zellen wurden hierzu mit einer 10 ml Pipette gründlich resuspendiert und in einer 1:5 Verdünnung in eine neue 75 cm² Kulturflasche mit 10 ml komplettem Schneider Drosophila-Medium überführt ($\sim 2 \times 10^6$ Zellen/ml).

Kryokonservieren: Einfrieren und Auftauen von S2-Zellen

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurde angewärmtes Medium in einer Zellkulturflasche vorgelegt. Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C angetaut und anschließend sofort zum Medium in die Zellkulturflasche gegeben. Die Zellsuspension wurde für 30 min bei RT inkubiert, dann mit 1.000 g für 3 min bei RT abzentrifugiert und in 5 ml frischem Medium in einer 25 cm² Zellkulturflasche resuspendiert.

Die frischen S2-Zellen wurden bei 1.000 g für 3 min pelletiert und das konditionierte Medium aufbewahrt. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und erneut pelletiert. Danach wurden die Zellen in einer Dichte von $1,1 \times 10^7$ Zellen/ml in Gefriermedium aufgenommen und zu je 1 ml aliquotiert, sowie bei -80°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Kryoröhrchen aus dem -80°C Schrank in einen Lagertank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.4.5 Transfektion

Transiente Transfektion

Zur transienten Transfektion von Schneider 2 Zellen wurde die Calciumphosphat-Methode angewandt, die eine hohe Transfektionsrate verspricht. Die S2-Zellen wurden 16 h vor der Transfektion in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 3 ml komplettem Schneider Drosophila-Medium (Gibco, Karlsruhe) in 35 mm Platten ausgesät und bei 24°C bis zur logarithmischen Phase, etwa 20 h, inkubiert. Am Tag der Transfektion wurden in einem 15 ml Falconröhrchen je Ansatz 300 µl 2x HBS als Lösung B vorgelegt. In einem Eppendorftube wurden pro Ansatz 144 µl 0,5 M CaCl₂ und 19 µg DNS mit Zellkulturwasser auf 300 µl gebracht (Lösung A). Unter kontinuierlichem Mixen wurde die Lösung A langsam in Lösung B getropft. Das langsame Zutropfen gewährleistete die Bildung des feinen Niederschlags, der für eine Transfektion notwendig ist. Die Lösung wurde dann für 40 min bei RT inkubiert, bis sich ein feiner Niederschlag gebildet hatte. Dann wurde die Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 24 h bei 24°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit frischem Medium gewaschen und in 3 ml frischem Medium neu ausgesät. Die Induktion des Expressionsvektors erfolgte durch die Zugabe von CuSO₄ in einer Endkonzentration von 500 µM und anschließender Inkubation von 24-48 h bei 24°C.

Stabile Transfektion

Zur stabilen Transfektion sowohl von 293 FDA-Zellen als auch von S2-Zellen wurde die Methode mit Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) angewandt. Diese verspricht höhere Transfektionsraten bei deutlich geringerer DNS-Menge im Vergleich zur CaCl₂-Methode.

Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion entweder 1×10^6 Zellen in 5 ml Medium auf 60 mm Kulturschalen (293 FDA) oder 5×10^5 Zellen in 2 ml Medium in 6-well Platten (S2-Zellen) ausgesät. Am nächsten Tag wurden pro Versuch 8 µg Plasmid-DNS in 500 µl serumfreiem 293-Medium resuspendiert, dann wurden 20 µl der Lipofectamine 2000 Lösung in 500 µl 293-Medium resuspendiert und für genau 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und nochmals für 20 min bei RT inkubiert. Das Transfektionsreagenz wurde daraufhin auf die Zellen mit Medium gegeben und vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C inkubiert und in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:100 passagiert. Weitere 24 h später wurde Selektionsmedium mit 500 µg/ml Geneticin zugegeben und die Ansätze bei 37°C kultiviert, bis sich einzelne Klone herausbildeten. Diese müssen danach auf eine Expression der gewünschten Proteine hin untersucht werden.

Für die Ansätze mit S2-Zellen wurden jeweils die Hälfte der Volumina verwendet. Da das Plasmid pMT/BiP/V5-His C keinen Selektionsmarker besitzt, muss der Vektor pCoBlast mit einer Blasticidinresistenz im Verhältnis 1:20 kotransfiziert werden. Die Selektion erfolgt dann über 25 µg/ml Blasticidin S HCl im Drosophila-Medium.

2.4.6 Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

Mit einem ELISA lassen sich quantitativ und schnell Protein-, Antigen- oder Antikörpertiter immunologisch bestimmen. Bei der Verwendung Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper kann die Umsetzung von farbigen Substraten photometrisch gemessen und sogar im Mikrotitermaßstab durchgeführt werden.

In diesem Fall wurden zur Bestimmung des IL-10 Levels in Zellkulturüberständen der kommerzielle OptEIA IL-10 ELISA Kit verwendet. Hierbei handelt es sich um einen sogenannten „Sandwich/Capture-ELISA“, bei dem ein „Capture“-Antikörper am Boden einer Mikrotiterplatte adsorbiert und das eingefangene IL-10 über einen zweiten Antikörper detektiert wird. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Farbreaktion wurde nach 30 min mit 2 N H₂SO₄ abgestoppt und im ELISA Reader (Tecan, Crailsheim) bei $\lambda = 450$ nm (Referenz $\lambda = 560$ nm) gemessen.

2.4.7 Bestimmung der Cytokinspiegel (RayBiotech Microarray)

Um einen Überblick über das Ausmaß der Cytokinveränderung zu bekommen, wurde in dieser Arbeit der RayBio™ Human Cytokine Array I verwendet. Dieser Microarray ist in der Lage, die Änderung von 23 verschiedenen Cytokinen im Zellüberstand zu bestimmen (Abbildung 2.4).

Hierzu wurden 3×10^6 Zellen der isolierten PBMCs in 100 ml pro Well einer Mikrotiterplatte ausgesät und mit 50 µg Protein in 100 µl Medium für 24 h im Zellkulturschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert und 1:2 mit Blockierungspuffer verdünnt.

Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-α
Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-α
IL-1α	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
IL-1α	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
IL-13	IL-15	IFNγ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTES
IL-13	IL-15	IFNγ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTES
TGF-β1	TNF-α	TNF-β				Neg	Pos
TGF-β1	TNF-α	TNF-β				Neg	Pos

Abbildung 2.4: Übersicht RayBio Cytokine Array I

Folgende Abkürzungen wurden zur Beschreibung der 23 Cytokine verwendet:

Pos = Positivkontrolle, Neg = Negativkontrolle, GCSF = Granulocyte-colony Stimulating Factor, GRO = Growth related Oncogen, GRO- α = Growth related Oncogene alpha, IL = Interleukin, IFN γ = Interferon gamma, MCP = Monocyte Chemoattractant Protein, MIG = Monokine induced by IFN, RANTES = regulated upon activation, normal T-cell expressed and presumably secreted, TGF- β = Transforming growth factor beta, TNF = Tumornekrosefaktor.

Währenddessen wurden die Microarray-Membranen für 30 min bei RT blockiert und anschließend mit 1 ml der Probe für 2 h bei RT inkubiert. Nach Abnahme der Probe wurde die Membran dreimal für 5' mit Waschpuffer 1, dann zweimal 5' mit Waschpuffer 2 gewaschen.

Nach Zugabe von 1 ml 1:500 verdünntem Biotin-gekoppeltem Antikörpermix wurde 90 min bei RT inkubiert. Daran schloss sich ein erneuter Waschschrift an. Der Ansatz wurde nun mit 2 ml POD-gekoppeltem Streptavidin für 1 h bei RT behandelt und nochmals gründlich gewaschen.

Die Detektion erfolgte mithilfe der ECL™-Chemolumineszenz. Die Auswertung wurde über die Belichtung eines Fotofilms und Vergleich mit einem nicht-induzierten Kontrollversuch vorgenommen.

2.4.8 Immundurchflusscytometrie (FCM)

Die Durchflusscytometrie ist ein elegantes Verfahren, um die Verteilung eines Merkmals innerhalb einer gemischten Population mittels Immunfluoreszenzmarkierung quantitativ darzustellen. Das System beruht auf der Markierung von Zellantigenen, die auf der Oberfläche oder nach Permeabilisierung auch im Zellinneren, mithilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern.

Die Zellsuspension wird dann vom FACS-Gerät FACSCalibur (Becton Dickinson) in feinste Tröpfchen aufgeteilt, die im Durchschnitt nur eine Zelle enthalten. Diese Tröpfchen werden von einem Laser ausgelesen und verschiedene Parameter wie Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität können mithilfe des Programms CellQuest Pro (Becton Dickinson) gemessen und ausgewertet werden.

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und gut in PBS resuspendiert. Um vorhandene Zellklumpen, die eine Einzelzellzählung erschweren, zu vereinzeln, wurde die Suspension über MACS Pre-Separationsfilter (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) pipettiert. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 2.500 rpm für 5 min bei RT. Die Zellen mussten nun für 30 min mit Fixierlösung (PBS + 3,7 % (v/v) Formaldehyd) bei RT fixiert werden. Danach wurde zweimal mit Waschlösung (PBS + 3,7 % (v/v) FKS) gewaschen und mit Blockierungspuffer (PBS + 5 % (w/v) Trockenmilchpulver) für 20 min blockiert. Im Anschluss wurde dreimal mit Waschlösung gewaschen und der Erstantikörper 2F5 für 1 h zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin erneut zweimal gewaschen und mit dem α -Human-FITC-Antikörper für 1 h im Dunkeln inkubiert. Die Zellen werden abschließend noch zweimal gewaschen und in 500 μ l FACS Lysing Solution (Becton Dickinson) resuspendiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Identifizierung von Bindungsproteinen retroviraler TM-Proteine

Die Wechselwirkung der ISU-Peptide mit den Immunzellen ist noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Besonders die Art und Weise der Signalübertragung in die Zellen, ob durch eine selektive Erkennung der Peptide über Rezeptoren oder eine allgemeine Wechselwirkung mit der Zellmembran, ist noch nicht bekannt. Auch die Signaltransduktion innerhalb der Immunzellen ist nur in Ansätzen verstanden. Die Wirkung der ISU-Peptide kann entweder mit den Peptiden allein, oder den Peptiden an Trägermoleküle gekoppelt untersucht werden. Man kann aber auch mit rekombinanten TM-Proteinen arbeiten. Die rekombinanten Proteine haben den Vorteil, die ISU-Sequenz bereits in einer nativen Konformation zu enthalten. In dieser Arbeit wurden beide Wege zur Untersuchung der modulatorischen Wirkung auf Immunzellen besprochen.

Da es einige Hinweise für eine rezeptorvermittelte immunsuppressive Wirkung gibt, wurde in dieser Arbeit versucht, Bindungsproteine für das TM-Protein p15E des γ -Retrovirus FeLV mittels affinitätschromatographischer Methoden aufzureinigen und zu identifizieren. Das p15E von FeLV wurde ausgewählt, weil es eine große Homologie zu den TM-Proteinen anderer γ -Retroviren aufweist und von einem exogenen Retrovirus stammt. Gewonnene Ergebnisse würden sich also relativ problemlos im Tiermodell bestätigen lassen. Weiterhin besteht die Hoffnung, dass alle Retroviren auf eine ähnliche oder sogar gleiche Weise die Immunmodulation induzieren, und die Ergebnisse auf andere Retroviren übertragbar sind.

3.1.1 Affinitätschromatographie mit rp15E gekoppelt an Sepharose 4B

Eine der einfachsten Möglichkeiten, Bindungspartner zu isolieren, ist die Säulenaffinitätschromatographie. Im Verlauf dieser Arbeit wurden daher zwei Säulen mit rekombinantem p15E, gekoppelt an das Säulenmaterial Sepharose 4B, hergestellt. Für die erste Säule wurden 10 mg rp15E entsprechend der Herstellervorschriften an 2 ml Sepharose gekoppelt. Hierbei konnte man aufgrund der Proteinbestimmung von einer nahezu 100 %igen Effizienz der Kopplung ausgehen. Mithilfe der rp15E-gekoppelten Sepharose wurde nun versucht, Bindungspartner von rp15E chromatographisch aus dem Zellysat von C8166-Zellen aufzureinigen. Bei der Elution wurden Fraktionen mit einem messbaren Proteingehalt erst ab einer 1 M NaCl-Konzentration erhalten. Dies läßt darauf schließen, dass die eluierten Proteine eine starke Wechselwirkung mit dem rp15E eingehen. Die Auftrennung im SDS-Gel zeigt ein klares Bandenmuster mit drei prominenten Banden (Abbildung 3.1). Es wurde daraufhin versucht, die drei erhaltenen, deutlich sichtbaren Banden mittels MS/MS-Sequenzierung (TopLab,

Martinsried) zu identifizieren. Die 40 kDa-Bande, markiert durch den untersten Pfeil, konnte als β -Aktin identifiziert werden. Die schwache Bande bei 100 kDa, sowie die Bande bei 80 kDa, markiert durch die obersten Pfeile, wurden bei der Datenbanksuche jeweils als Nucleolin identifiziert. Der dritten, starken Bande in der Höhe von 50 kDa, siehe mittlerer Pfeil, konnte bei der Sequenzierung kein spezifisches Protein zugeordnet werden.

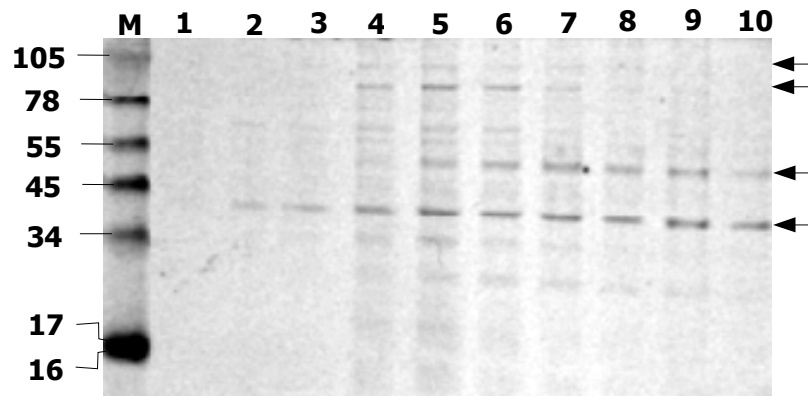


Abbildung 3.1: SDS-Gel nach rp15E-Affinitätschromatographie

SDS-Gel mit den Eluaten einer rp15E-gekoppelten Sepharosesäule, aufgetragen wurden jeweils 20 μ g Protein. Auffallend sind die starken Banden in der Höhe von 40 kDa, 80 kDa und 100 kDa. Diese Banden wurden massenspektrometrisch sequenziert und identifiziert. Die dritte, starke Bande bei 50 kDa konnte bisher nicht identifiziert werden.

M = SeeBlue[®]Plus2 Standardmarker, Bahnen 1-10 = Elutionsfraktionen

Das Ergebnis ließ sich bei vier weiteren Läufen mit demselben Säulenmaterial nicht mehr reproduzieren. Es konnten nur sehr geringe Mengen an Protein eluiert werden und das Bandenmuster war nicht vergleichbar.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Säule mit rp15E-gekoppelter Sepharose hergestellt. Um eine höhere Proteinausbeute zu erzielen, und die Bildung von Di- oder Trimeren bei der Kopplung von rp15E an die Säule zu verbessern, wurde das Verhältnis Protein : Sepharose erhöht. Es wurde zur Kopplung ein Verhältnis von 10 mg Protein/ml Sepharose eingesetzt. Da nach der Kopplung kein Protein mehr in der Waschlösung nachgewiesen werden konnte, kann man von einer nahezu 100 %igen Effizienz bei der Kopplung ausgehen. Allerdings ist das Volumen beim Waschen so groß, dass ein gewisser Verlust nicht gemessen werden kann. Mit dem neuen, zweiten Säulenmaterial ergab sich ein ähnliches Bild wie beim allerersten Säulenlauf der ersten Säule. Das Bandenmuster war hier deutlich stärker als in Abbildung 3.1, obwohl eine vergleichbare Menge an C8166-Zellen lysiert und eingesetzt worden war. So trat beispielsweise bei 34 kDa, markiert durch den untersten Pfeil, eine weitere, starke Bande auf, die vorher nicht zu sehen war (Abbildung 3.2). Diese Bande konnte bisher nicht sequenziert und identifiziert werden.

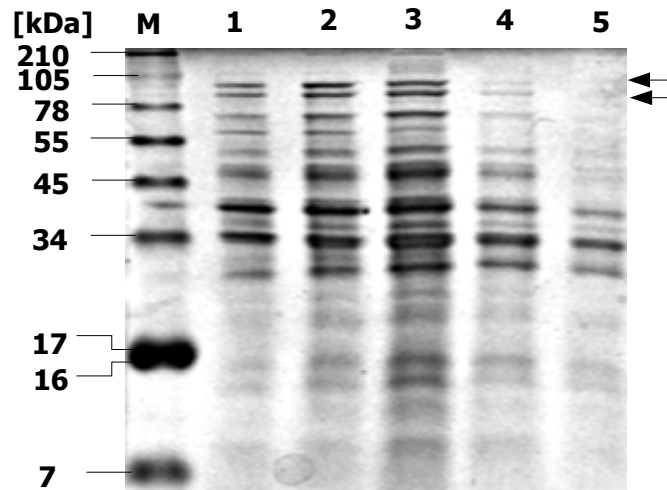


Abbildung 3.2: SDS-Gel einer rp15E-Affinitätschromatographie

SDS-Gel der zweiten Sepharosesäule gekoppelt mit rp15E, aufgetragen sind die Elutionsfraktionen des zweiten Säulenlaufs. Hier sind ebenfalls die beiden Banden bei 80 und 40 kDa erkennbar, siehe oberer und mittlerer Pfeil, aber auch zusätzliche Banden im Bereich dazwischen. Eine besonders starke Bande zeigt sich bei 34 kDa, markiert durch den unteren Pfeil. Insgesamt wurde deutlich mehr Protein eluiert.

M = SeeBlue®Plus2 Standardmarker, Bahn 1 - 5 = Elutionsfraktionen 4 - 8

Das Ergebnis konnte bei der Säule mit deutlich höherem Protein-Sepharose Verhältnis bisher dreimal reproduziert werden, was ein Hinweis auf die Notwendigkeit der richtigen Stöchiometrie des gebundenen rp15E sein könnte. Da auch die Banden bei 100 kDa und 80 kDa, markiert durch die zwei Pfeile, in diesem Fall wieder deutlich erkennbar waren, wurde versucht, Nucleolin zu identifizieren.

Dazu wurde ein Western Blot mit α -Nucleolin-Antikörpern eingesetzt, mit dem eine Reihe von Zerfallsprodukten von Nucleolin nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.3).

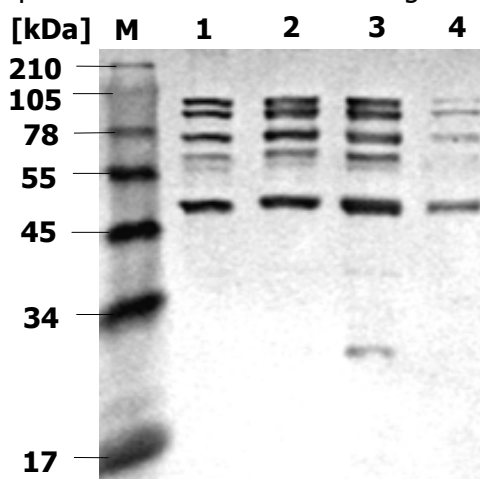


Abbildung 3.3: Western Blot-Analyse von Eluaten der rp15E-Affinitätschromatographie

Western Blot-Analyse von Elutionsfraktionen der zweiten rp15E-gekoppelten Sepharosesäule mit α -Nucleolin-Antikörper. Aufgetragen sind einzelne Elutionsfraktionen. Hier sind im Bereich von 100 kDa bis 50 kDa eine Reihe von Nucleolin-Fragmenten zu sehen.

M = SeeBlue®Plus2 Standardmarker, Bahn 1 - 4 = Elutionsfraktionen 4 - 7

Mithilfe der Säulenaffinitätschromatographie konnte also Nucleolin wiederholt aus dem Lysat von C8166-Zellen aufgereinigt werden. Das Verhältnis von Protein zu Sepharose scheint dabei einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität der Chromatographie zu haben. Zwei weitere Banden konnten bisher nicht identifiziert werden.

3.1.2 Affinitätspräzipitation mit rp15E gekoppelt an Magnetbeads

Eine weitere Möglichkeit, Bindungspartner zu isolieren, besteht in der Präzipitation von Proteinen mithilfe Protein-gekoppelter Magnetkügelchen, sogenannter Beads. Hierzu wurde das rekombinante p15E von FeLV nach Herstellerangaben an Magnetbeads (BioMag 84125-10, Polysciences, Warrington, USA) gekoppelt. Diese Magnetbeads wurden dann mit Zelllysat von C8166-Zellen über Nacht inkubiert, nach mehreren Waschschrritten in Probenpuffer aufgekocht und auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen.

Das SDS-Gel zeigte wesentlich mehr Banden als die Säulenchromatographie. Die Versuche zeigten jedoch, dass im Vergleich zu einer Kontrolle mit ungekoppelten Magnetbeads zwei zusätzliche Banden im Bereich von 14 kDa und 38 kDa auftreten (Abbildung 3.4). Bei der Bande im Bereich von 14 kDa, markiert durch den unteren Pfeil, handelt es sich wahrscheinlich um rp15E, das unter den denaturierenden Bedingungen der Probenaufbereitung und des SDS-

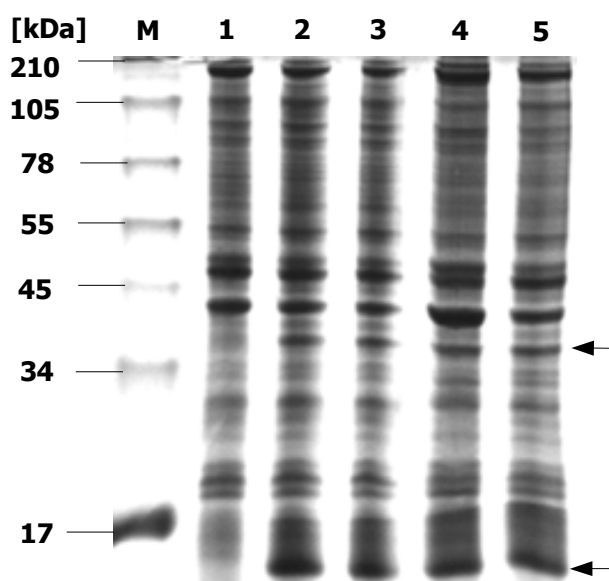


Abbildung 3.4: SDS-Gel nach Affinitätspräzipitation mit rp15E Magnetbeads

SDS-Gel einer Affinitätspräzipitation von C8166-Lysat mit rp15E gekoppelt an Magnetbeads. Nur die zwei Banden bei 37 kDa und 14 kDa werden im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich verstärkt, siehe Pfeile.

M = SeeBlue®Plus2 Standardmarker, Bahn 1 = C8166-Lysat + Magnetbeads ungekoppelt, Bahn 2/3 = Lysat + Magnetbeads gekoppelt, Bahn 4/5 = Lysat + Magnetbeads gekoppelt gewaschen mit 0,5 M NaCl

Gels von den Magnetbeads abgelöst wurde. Die Bande bei 37 kDa, verdeutlicht durch den oberen Pfeil, konnte mithilfe der MS/MS-Sequenzierung als das ubiquitäre, cytoplasmatische Protein Glyzeraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, GAPDH, identifiziert werden.

Dieses Resultat konnte auch durch einen Western Blot mit α -GAPDH-Antikörper bestätigt werden (Abbildung 3.5). Da GAPDH nicht als membranständiges Protein bekannt ist, waren weitere Versuche nötig, um einen unspezifischen Effekt aufgrund der hohen Konzentration an GAPDH im Cytoplasma auszuschließen.

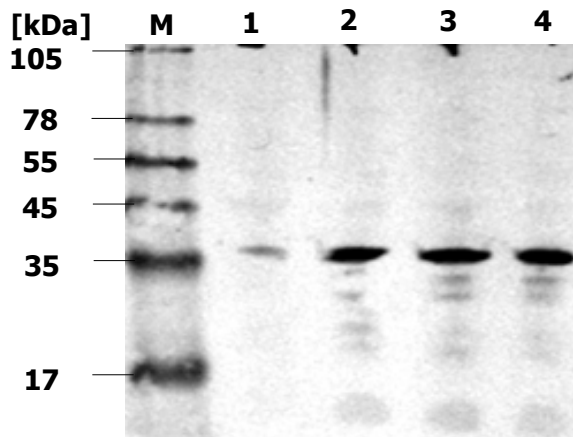


Abbildung 3.5: Western Blot-Analyse einer Affinitätspräzipitation mit rp15E Magnetbeads

Western Blot-Analyse einer Affinitätspräzipitation von C8166-Lysat mit gekoppelten Magnetbeads. Nur die Bande bei 37 kDa wird vom α -GAPDH-Antikörper erkannt.

M = SeeBlue® Plus2 Standardmarker, Bahn 1 = C8166-Lysat + Magnetbeads ungekoppelt, Bahn 2-4 = Lysat + Magnetbeads gekoppelt

Um eine Verunreinigung mit cytoplasmatischen Proteinen zu minimieren, wurden C8166-Zellen mithilfe des Subcellular Proteom Extraction Kit (Calbiochem, Bad Soden) in die vier Fraktionen Cytoplasma, Membranen, Nukleus und Cytoskelett aufgetrennt. Somit konnten die Proteine aus diesen unterschiedlichen Kompartimenten separat auf eine Wechselwirkung mit rp15E hin untersucht werden. Die einzelnen Fraktionen wurden dann mit den gekoppelten Magnetbeads inkubiert und die einzelnen Proben auf ein 8 %iges SDS-Gel aufgetragen (Abbildung 3.6). Gezeigt sind in dieser Abbildung die beiden Fraktionen Cytoplasma und Membranen. Aufgetragen wurden jeweils eine Negativkontrolle mit ungekoppelten Beads, rp15E-Magnetbeads mit Lysat und mit dem Lysat vor der Inkubation 1:10 verdünnt.

Allerdings konnten in der Membranfraktion wiederum zwei Banden angereichert werden, wobei die 14 kDa Bande auch in der cytoplasmatischen Fraktion zu sehen ist. Hierbei handelt es sich vermutlich wieder um rp15E, das von den Magnetbeads abgelöst wurde. Dafür spricht auch das Vorhandensein der Bande in allen vier Fraktionen (Abbildung nicht gezeigt). Die GAPDH-Bande aus Abbildung 3.4 ist allerdings in der Membranfraktion nicht angereichert worden. Auch ein Western Blot mit α -GAPDH-Antikörper konnte keinen positiven Nachweis liefern (Abbildung nicht gezeigt). Zu sehen war die GAPDH-Bande in der Cytoplasmafraktion, markiert durch den Pfeil in der Abbildung. Daher kann man davon ausgehen, dass es sich bei dem gefundenen GAPDH um cytoplasmatisches Protein handelt.

Auffallend war allerdings eine Bande zwischen 105 kDa und 210 kDa, die nur in der Membranfraktion auftrat. Diese Bande war bereits früher in der Arbeitsgruppe bei Bindungsstudien mit radioaktiv-markierten Proteinen gefunden worden [120]. Die vorhandene Proteinmenge war allerdings für eine Sequenzierung nicht ausreichend.

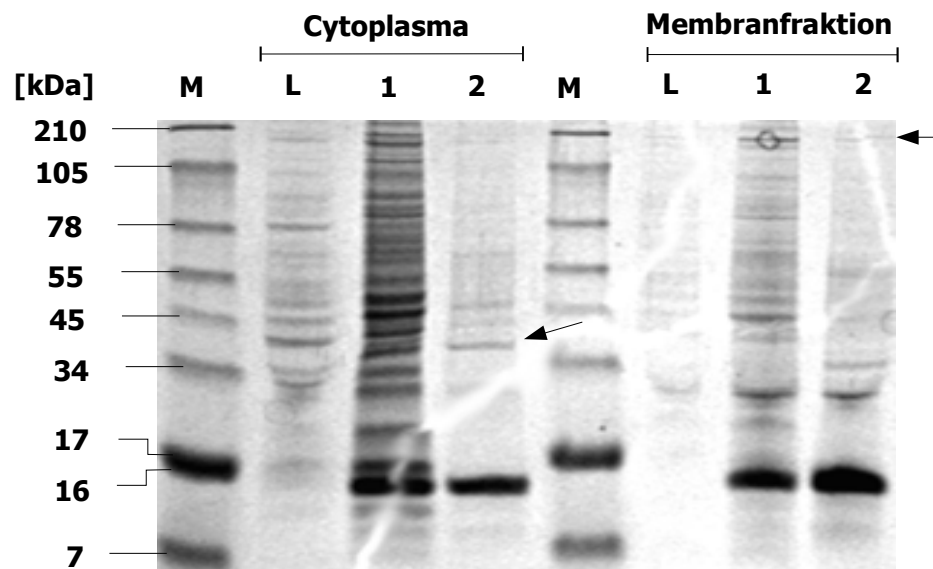


Abbildung 3.6: SDS-Gel einer Affinitätspräzipitation mit rp15E Magnetbeads und Fraktionen des Subcellular Proteom Extraction Kits

Aufgetragen sind die Proteomextrakte des Cytoplasmas und der Membranfraktion von C8166-Zellen. Eine spezifische Anreicherung ist kaum erkennbar. In der cytoplasmatischen Fraktion ist die GAPDH-Bande sichtbar und durch einen Pfeil markiert. Interessant ist vor allem eine Bande zwischen 210 und 105 kDa, die mit einem Pfeil markiert ist.

M = SeeBlue®Plus2 Standardmarker, Bahn L = C8166-Lysat + Magnetbeads ungekoppelt, Bahn 1 = Lysat + Magnetbeads gekoppelt, Bahn 2 = Lysat 1:10 verdünnt + Magnetbeads gekoppelt

Mithilfe des Subcellular Proteom Extraction Kits lassen sich größere Proteinmengen zur Durchführung von Affinitätspräzipitationen nicht gewinnen. Diese Methode zur Aufreinigung von Membranfraktionen eignet sich offensichtlich nicht zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von Membranproteinen oder Rezeptoren.

Die Isolierung von GAPDH beruht auf einer spezifischen, weil starken Wechselwirkung zwischen GAPDH und rp15E. Da beide Proteine in vivo in unterschiedlichen Kompartimenten vorliegen, handelt es sich allerdings um einen artifiziellen Effekt. Dieser Effekt wird in der Diskussion noch ausführlich besprochen.

3.2 Modulation der Cytokinproduktion durch immunsuppressive Peptide

Der Mechanismus zur Modulation der Immunzellen durch transmembranen Hüllproteine der Retroviren ist weitestgehend unverstanden. Eine wichtige Rolle hierbei scheint allerdings das regulatorische Typ 2 Cytokin IL-10 zu spielen.

Aus diesem Grund wurde in der Arbeit versucht, über verschiedene Ansätze eine immunmodulatorische Wirkung und damit die Beeinflussung von Immunzellen, speziell humaner PBMCs nachzuweisen. Hierfür sollte durch einen IL-10 spezifischen ELISA eine Induktion des Cytokins IL-10 ermittelt werden. Dazu wurden einerseits die synthetisierten Peptide als Homopolymere eingesetzt, andererseits wurden rekombinante retrovirale TM-Proteine für die in vitro-Studien verwendet.

3.2.1 Gewinnung und Charakterisierung von Peptid-Homopolymeren

Die immunsuppressiven ISU-Peptide sind nur wirksam, wenn sie an größere Trägerproteine wie BSA oder KLH gekoppelt wurden [49]. Die Kopplung an Trägermoleküle hat allerdings diverse Nachteile. So ist die Konformation der Kopplungen nicht beeinflussbar, und über das Trägermolekül werden zusätzliche Parameter in den Versuch eingeführt.

In dieser Arbeit sollte deswegen untersucht werden, ob mit einer homologen Kopplung des HIV ISU-Peptids ebenfalls eine immunsuppressive Wirkung erzielt werden kann. Dabei sollte die Produktion von IL-10 bei humanen PBMCs mit einem spezifischen ELISA quantifiziert werden. Eingesetzt wurden dabei das ISU-Peptid von HIV-1, sowie ein Kontrollpeptid, das dieselbe Aminosäuren-Zusammensetzung in einer anderen Abfolge enthält (Kap. 2.3.1). Dieses Kontrollpeptid HIV ran5 sollte auch Hinweise darauf liefern, ob es sich bei der IL-10 Induktion um einen sequenzspezifischen Effekt oder einen Effekt aufgrund der Ladungsverteilung und Hydrophobizität handelt.

Zur Kopplung der Peptide wurde das Carbodiimid EDC verwendet, das mit freien Carboxylgruppen ein reaktives Intermediat, einen O-Acylisoharnstoff, bildet. Zur besseren Ausbeute bei einem neutralem pH-Wert wurde Sulfo-NHS zugegeben. Um beide Reagenzien wieder zu entfernen, wurde dann eine Woche gegen PBS dialysiert. Die Kopplungen der Peptide waren nach der Dialyse nicht vollständig löslich. Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Pierce ergab eine durchschnittliche Kopplungsausbeute zwischen 18 und 20 %. Allerdings sagte die Ausbeute noch nichts über die Art der Kopplung und Polymerisierung aus. Bei den ersten vier Versuchen waren die Peptide im SDS-Gel mit Coomassie Blue-Färbung kaum darstellbar. In diesen Fällen war es offensichtlich nicht gelungen, gute Kopplungsergebnisse zu erzielen. Diese Peptide waren bereits vorher in Wasser gelöst worden, um eine einheitliche Peptidkonzentration in unterschiedlichen Ansätzen zu gewährleisten.

In der Folge wurde dann auf das ungelöste Peptid zurückgegriffen. Aber auch in den folgenden drei Ansätzen zeigten sich deutliche Qualitätsunterschiede in den Kopplungen. Dargestellt ist eine Kopplung mit guten Kopplungsergebnissen (Abbildung 3.7). Im Vergleich mit

den Monomeren, die ein Molekulargewicht von 2,3 kDa aufweisen, sind im SDS-Gel bei den ISU- und ran5-Kopplungen im Bereich von 4 kDa und darüber Anfärbungen sichtbar. Dies zeigt, dass bei dem ISU-Peptid Dimere und höhere Polymere entstanden sind. Die genaue Stöchiometrie dieser Komplexe konnte jedoch nur abgeschätzt werden, da sich keine einzelnen Banden abzeichnen. Bei der Kopplung des Kontrollpeptids war eine starke Bande bei 7 kDa zu sehen, dies läßt die Bildung von Trimeren vermuten. Aber auch im Bereich der Dimere bei 5 kDa ist eine leichte Anfärbung erkennbar. Höhere Polymere, die der Kopplung des ISU-Peptids entsprechen würden, sind nicht nachweisbar. Im SDS-Gel lassen sich Kopplungen also nur bis zu einer Größe von 20 kDa, entsprechend Dekameren, nachweisen.

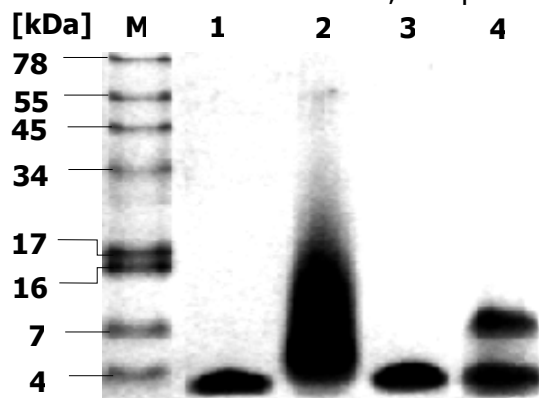


Abbildung 3.7: SDS-Gel einer EDC-Kopplung von ISU-Peptiden

Aufgetragen sind die Monomere und Kopplungen des HIV ISU-Peptids und Kontrollpeptids HIV- ran5.

M = SeeBlue®Plus2 Standardmarker, Bahn 1 = HIV ISU-Monomer, Bahn 2 = Kopplung HIV ISU, Bahn 3 = HIV ran5-Monomer, Bahn 4 = Kopplung HIV ran5-Kontrollpeptid

Western Blot Analysenvon HIV ISU-Kopplungen mit dem Immuserum einer Ziege, die mit HIV ISU-Peptiden immunisiert worden war, zeigen überraschende Ergebnisse. So wird erwartungsgemäß das Kontrollpeptid nicht oder nur ganz schwach angefärbt, da das Epitop der Antikörper im immuserum nicht existiert (Abbildung 3.8).

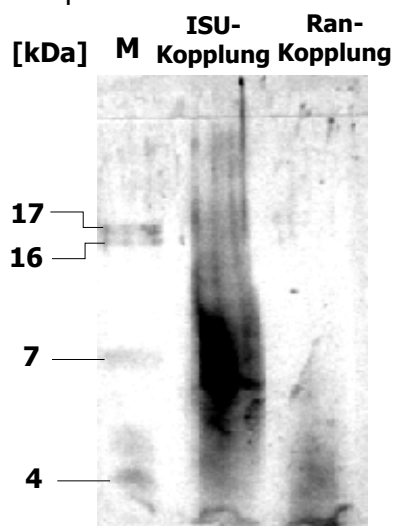


Abbildung 3.8: Western Blot-Analyse einer EDC-Kopplung von ISU-Peptiden

Aufgetragen sind die Kopplungen von HIV ISU-Peptiden und des Kontrollpeptids HIV- ran5. Die Detektion erfolgte über ein α -ISU-Immuserum und α -Ziege-Antikörper. Deutlich läßt sich eine Anfärbung im höhermolekularen Bereich zwischen 10 und 17 kDa bei den HIV ISU-Homopolymeren erkennen.

M = SeeBlue®Plus2 Standardmarker, Bahn 1 = Kopplung HIV ISU, Bahn 2 = Kopplung HIV ran5-Kontrollpeptide

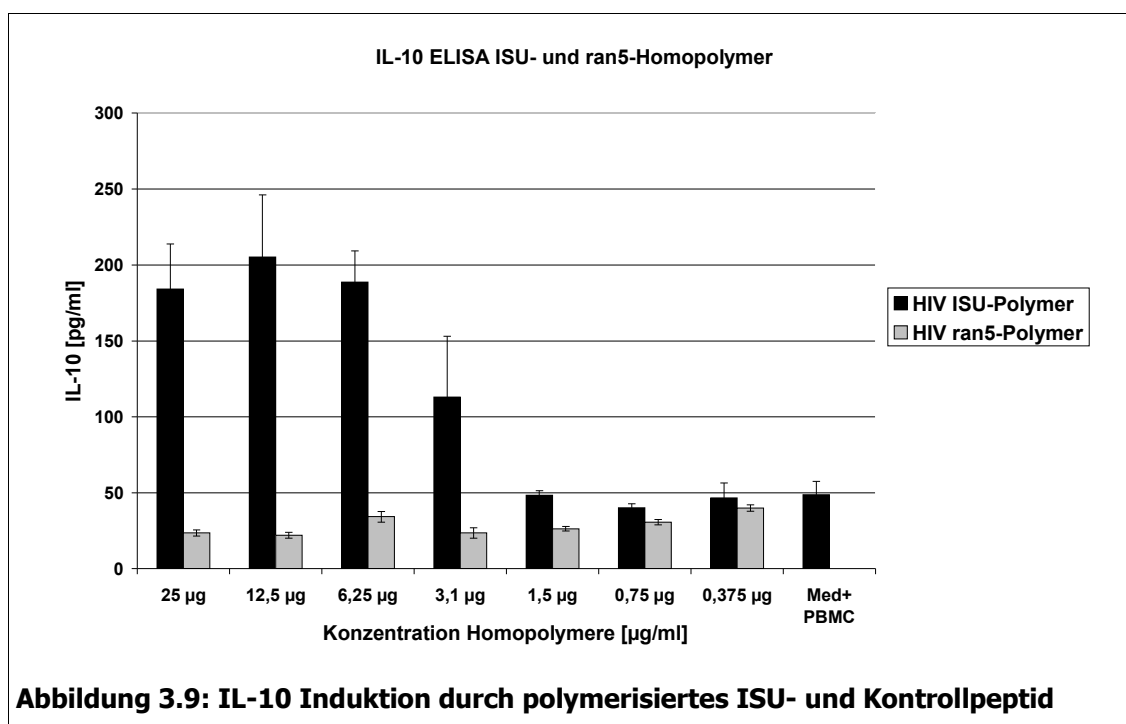
Bei der HIV ISU-Peptidkopplung zeigt sich jedoch eine starke Färbung im hochmolekularen Bereich. Dieser Bereich wird im SDS-Gel mit Coomassie Blau kaum oder nicht angefärbt. Die niedrigmolekularen Kopplungen, also Mono-, Di- und Trimere werden dagegen nur schwach

vom Immenserum erkannt, obwohl sie die größte Peptidmenge beinhalten. Dies läßt auf eine notwendige Multiplizität des erkannten Epitops oder die Notwendigkeit von bestimmten räumlichen Konformationen schließen.

Aus der Qualität der Kopplung ließen sich Rückschlüsse auf die Effektivität der Probe im IL-10 ELISA ziehen. Nur Kopplungen, die sich im SDS-Gel und im Western Blot darstellen und charakterisieren ließen, zeigten auch eine IL-10 induzierende Wirkung auf PBMCs.

3.2.2 Analyse der Wirkung von Homopolymeren auf humane PBMCs

Die Induktion der IL-10 Produktion von humanen PBMCs fiel in den durchgeführten Versuchen extrem unterschiedlich aus. Da auch die Kopplungen, wie bereits angeführt, qualitativ stark divergent ausgefallen waren, lassen sich dadurch unter Umständen Rückschlüsse auf die Art und Weise der IL-10 Induktion ziehen. Besondere Unterschiede gab es speziell in der Höhe der IL-10 Produktion. Die Messwerte reichten von über 800 pg/ml IL-10 pro Ansatz bis hin zu Werten unter 100 pg/ml bei der höchsten Peptidkonzentration. In den Versuchen mit qualitativ guten Kopplungen waren jedoch deutliche Unterschiede zwischen ISU-Kopplungen und den Kopplungen des Kontrollpeptids ran5 erkennbar (Abbildung 3.9).



So geht die IL-10 Menge im Kontrollansatz nicht über die Werte des Negativansatzes, Zellen mit Medium, hinaus. Bei der ISU-Kopplung hingegen waren die Werte deutlich erhöht und wurden mit abnehmender Peptidkonzentration immer geringer. Man kann daher von einer Abhängigkeit der IL-10 Produktion von der Konzentration an ISU-Peptiden ausgehen. Bei Kon-

zentrationen von weniger als 3 µg Homopolymer pro ml ist kein Unterschied zur Negativkontrolle mehr erkennbar.

Bei Kopplungen, die im SDS-Gel und im Western Blot schwer darstellbar waren und keine höheren Polymere zeigten, war eine IL-10 Induktion nicht nachweisbar (Abbildung 3.10). Diesen Effekt zeigten besonders Kopplungen der in Wasser gelösten Peptide. Dies könnte ein deutlicher Hinweis darauf sein, dass nur hochpolymerisierte Kopplungen einen Effekt auf die IL-10 Modulation zeigen.

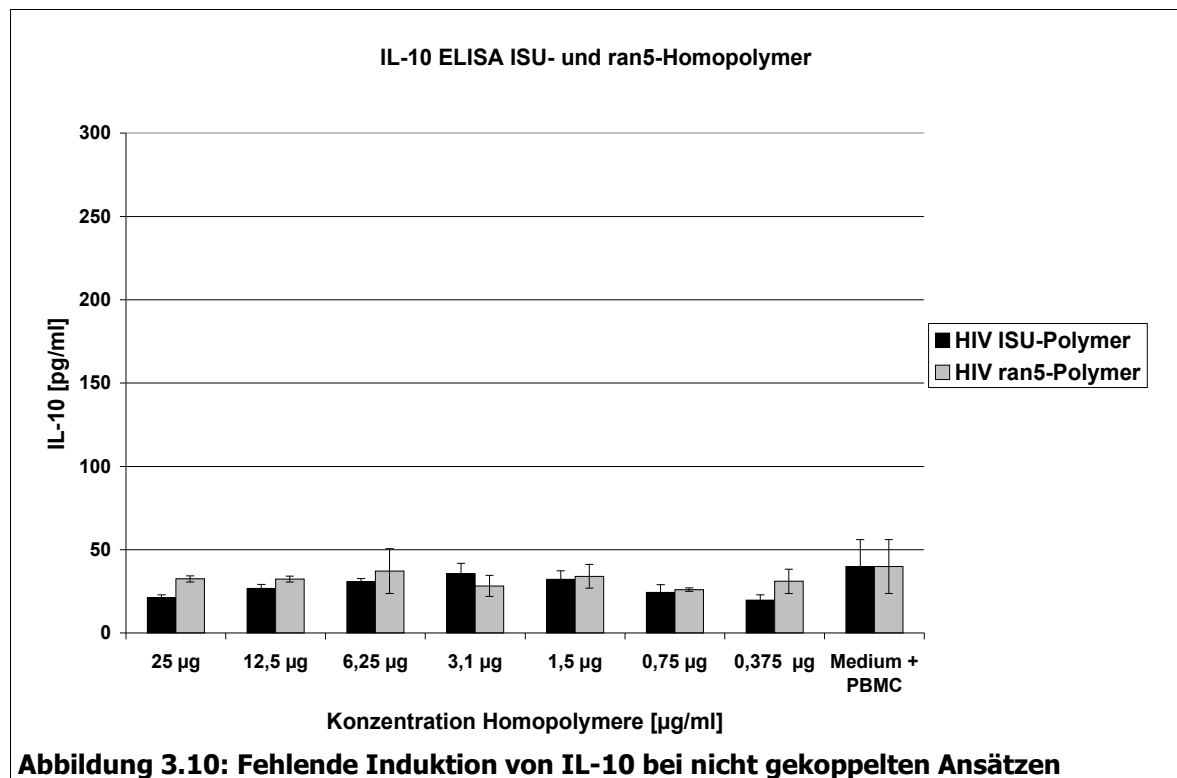
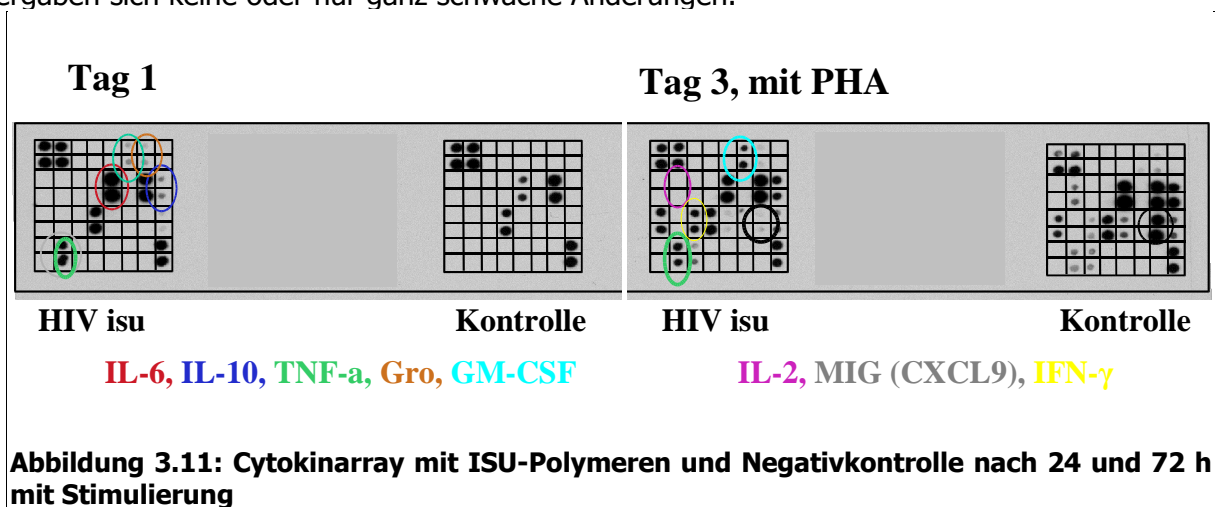


Abbildung 3.10: Fehlende Induktion von IL-10 bei nicht gekoppelten Ansätzen

Zusätzlich zu der Messung des IL-10 Gehaltes im Zellkulturüberstand wurde mithilfe eines Cytokin-Microarrays der Gehalt an 23 unterschiedlichen Cytokinen (Kap. 2.4.7), die eine Rolle bei der Aktivierung und Regulation des Immunsystems spielen, im Zellkulturüberstand behandelte PBMCs ermittelt (Abbildung 3.11). Die Zellen wurden hierbei 24 h mit 25 µg/ml einer ISU-Kopplung oder mit inaktiviertem PERV-A inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen mit PHA stimuliert und der hemmende Einfluss von ISU-Homopolymeren in derselben Konzentration nach 72 h untersucht.

Im Vergleich zu einer nichtbehandelten Kontrolle zeigte sich bei einer mit HIV-ISU behandelten Probe deutliche Unterschiede. Bereits nach 24 h sah man mit ISU-Homopolymeren ein Ansteigen von IL-6 und TNF- α . Einen ganz leichten Anstieg erkannte man bei IL-10, GRO und GM-CSF. Keinen Einfluss hat die Inkubation mit HIV ISU-Homopolymeren auf die Cytokine IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-5 und IL-7. Auch die Chemokine RANTES, MIG, MCP-1, -2 und -3, so-

wie die weiteren Cytokine IL-13, IL-15 und IFN- γ , TGF- β und TNF- β zeigten keine Veränderung. Nach einer Inkubation über 72 h und gleichzeitiger Aktivierung mit PHA zeigte sich besonders die fehlende Produktion von IL-2, einem stark immunaktivierenden Cytokin. Weiterhin war die Erhöhung von MIG (CXCL 9) nicht so stark ausgeprägt wie im Kontrollansatz. Zusätzlich trat auch nach 72 h eine leichte Erhöhung des GM-CSF sowie von IFN- γ auf, der im Kontrollansatz nicht erfolgte. Bei der Inkubation mit ISU-Homopolymeren zeigte sich auch eine wesentlich stärkere Aktivierung von TNF- α . Bei den weiteren Cytokinen und Chemokinen ergaben sich keine oder nur ganz schwache Änderungen.



Man kann also bei einer Inkubation mit ISU-Homopolymeren von einer Verschiebung der Cytokinantwort hin zu den typischen Typ 2 Cytokinen (Kapitel 1.3.4) sprechen. Wobei die Aktivierung von TNF- α allerdings eine Entzündungsreaktion fördern würde. Der Cytokinarray erlaubt natürlich nur Abschätzungen der Modulation, genaue Ergebnisse über die Höhe der Modulation lassen sich nicht gewinnen. Hierzu wurde in dieser Arbeit der IL-10 ELISA zur Bestimmung des wichtigsten Titers verwendet.

3.3 Modulation der Cytokinproduktion durch retrovirale TM-Proteine

In dieser Arbeit wurde eine weitere Möglichkeit angewandt, um die Modulation der Immunzellen zu charakterisieren. Hierzu wurden die Transmembranproteine verwendet. Die ISU-Domänen sind dabei im Protein vorhanden und liegen wahrscheinlich in einer nativen Konformation vor. Die Verwendung von rekombinanten Proteinen hat allerdings auch einige Nachteile, wie die geringe Löslichkeit der Transmembranproteine aufgrund ihrer hydrophoben Regionen. Aus diesem Grund wurden bei den rekombinanten Proteinen nur die Ectodomäne ohne besonders hydrophobe Regionen kloniert. Zudem tragen alle rekombinanten Proteine einen Tag, der die Aufreinigung über Affinitätschromatographie ermöglicht. Als zusätzlichen Effekt bewir-

ken diese Tags oftmals eine Erhöhung der Löslichkeit in wäßrigen Systemen oder ermöglichen die Erkennung über spezifische Antikörper in Western Blots.

3.3.1 Expression und Analyse von rekombinantem p15E des FeLV

Die TM-Proteine vieler Retroviren weisen eine starke Homologie zueinander auf. Besonders eine 26 Aminosäuresequenz ist hochkonserviert. Das TM-Protein p15E des γ -Retrovirus FeLV kann daher ohne Bedenken als Modell der retroviralen TM-Proteine verwendet werden (Kap. 1.3.2). Aus diesem Grund wurde für Versuche zur Wirkung der retroviralen TM-Proteine in der Arbeit ein rekombinantes FeLV p15E verwendet (S. Langhammer, AG Denner). Das rekombinante p15E enthält nur die Ectodomäne ohne Fusionspeptid und ohne Transmembranteil. Das p15E von FeLV ist im Virus nicht glykosyliert und kann daher ohne Einschränkungen in E.coli produziert werden. Dies stellt einen Vorteil im Vergleich zum komplexen gp41 dar, das sehr viele Glykosylierungen im nativen Protein aufweist. Dieses läßt sich im Bakterienmodell, bei dem keine Glykosylierung möglich ist, nicht als physiologisches Glykoprotein produzieren.

Die Produktion von rp15E erfolgte im E.coli System (Kap. 2.2.10) mithilfe des Affinity[®] Systems und anschließender affinitätschromatographischer Aufreinigung über eine Calmodulinsäule. Das klare Bakterienlysat wurde über Nacht mit dem Säulenmaterial inkubiert und ausgiebig gewaschen. Nach der Elution mit EGTA-haltigem Elutionspuffer wurden die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt und nach einer Proteinbestimmung mittels SDS-Gelelektrophorese kontrolliert (Abbildung 3.12).

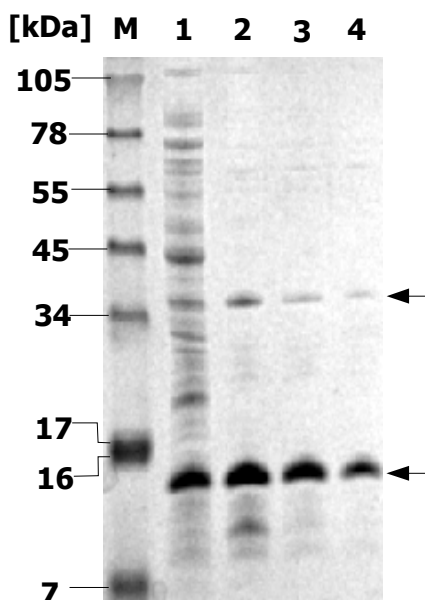


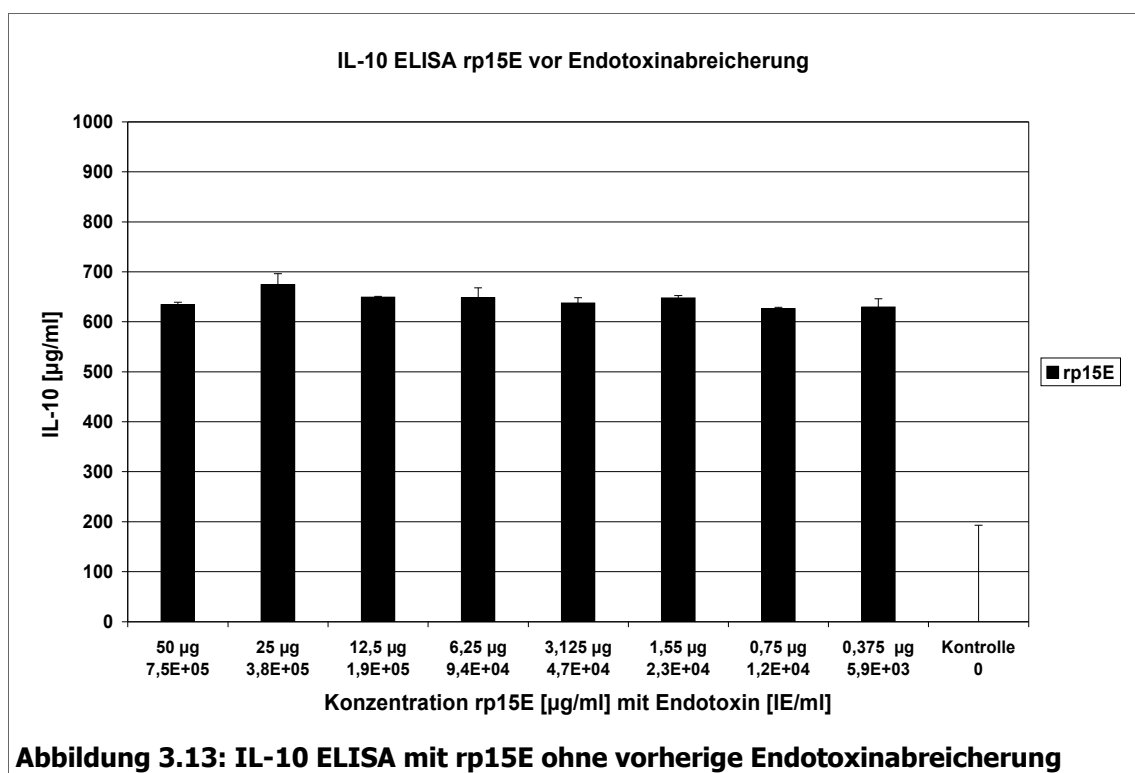
Abbildung 3.12: SDS-Gel der Aufreinigung von rekombinantem FeLV p15E

Aufgetragen sind die einzelnen Schritte der Aufreinigung von rekombinanten p15E des FeLV gewonnen aus transformierten E.coli. Das rp15E hat zusammen mit dem CBP-Tag ein Molekulargewicht von ca. 15 kDa und ist mit einem Pfeil markiert. Man kann deutlich die Aufreinigung des rp15E erkennen. Eine zweite Bande ist bei 36 kDa sichtbar, ebenfalls mit einem Pfeil markiert. Vermutlich handelt es sich um eine E.coli Bande.

M = SeeBlue[®]Plus2 Standardmarker, Bahn 1 = Bakterienlysat, Bahn 2 = Elution der CaM-Säule, Bahn 3 = Probe nach Dialyse gegen Reagenzienpuffer, Bahn 4 = nach Endotoxinabreicherung

Man kann auf dem SDS-Gel deutlich eine Anreicherung des rekombinanten Proteins erkennen. In allen Bahnen wurden annähernd vergleichbare Proteinmengen aufgetragen. Der Anteil an Proteinbanden von E. coli nahm deutlich ab, während die rp15E-Bande bei 15 kDa deutlicher

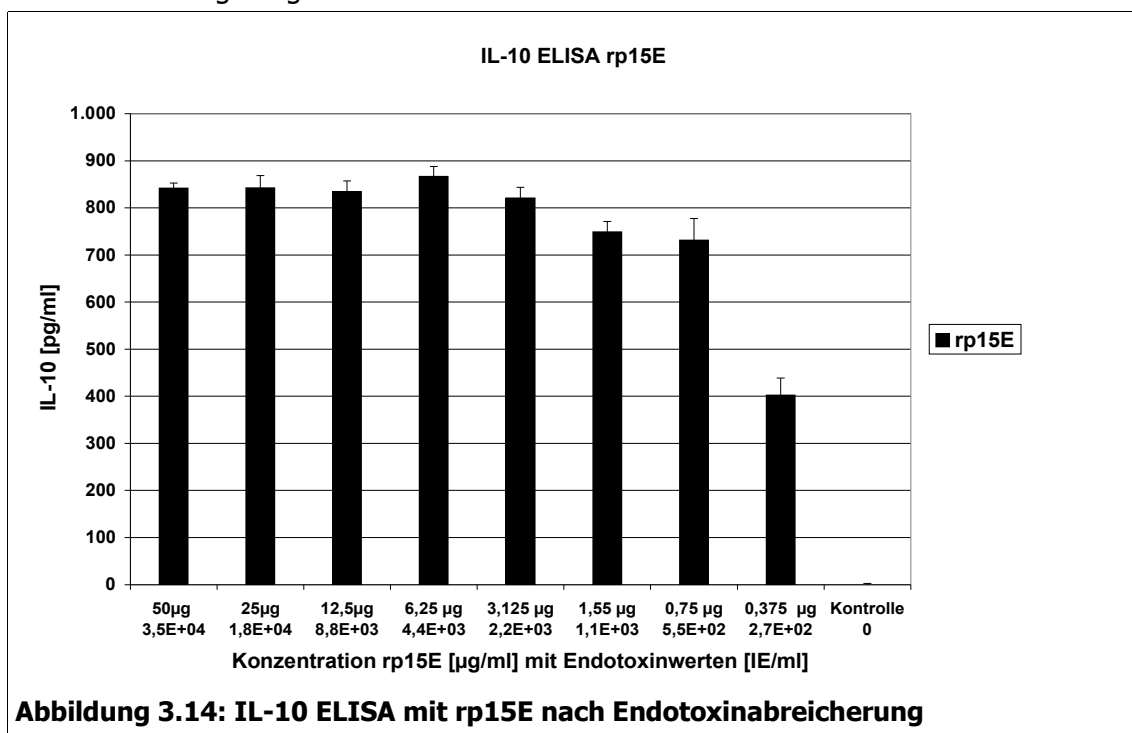
wurde. Einzig nach der Endotoxinabreicherung war deutlich weniger rp15E vorhanden. Die Intensität der Bande im Vergleich zu der Lysaten und Waschfraktionen zeigte einen guten Reinigungserfolg. Allerdings waren schwache Nebenbanden, speziell im Bereich von 36 kDa erkennbar, die auch durch ausgiebiges Spülen der Säule nicht von der CaM-Säule gewaschen wurden. Hierbei handelt sich vermutlich um eine E.coli Protein. Bei jeder Aufreinigung ließen sich aus einem Liter Bakterienkultur durchschnittlich 10 mg rekombinantes Protein gewinnen. Erste Versuche zur IL-10 induzierenden Wirkung von rp15E zeigten eine starke Induktion von IL-10 (Abbildung 3.13). Es gab einen deutlichen Unterschied zur Negativkontrolle, die IL-10-Werte lagen alle über 600 pg/ml. Allerdings war im eingesetzten Konzentrationsbereich keine Abhängigkeit von der Proteinmenge zu erkennen.



Also war entweder die Proteinkonzentration in allen Fällen zu hoch oder in der Probe enthaltenes Endotoxin führte zu einem verzerrten Ergebnis. Da es sich um bakteriell gewonnene Proteine handelt, ist eine Verunreinigung der Proteine mit Endotoxin unvermeidbar. Problematisch war jedoch der hohe Endotoxingehalt des erhaltenen Proteins. Generell gab es große Unterschiede im Endotoxingehalt des Ausgangsmaterials, das meistens im Bereich von mehr als 3×10^6 IE/mg Protein lag. Unterschiede in der Probenvorbereitung und Bakterienanzucht haben einen großen Einfluss auf die Endotoxinmenge. Die CaM-Affinitätschromatographie erreichte nur eine schwache Entfernung des Endotoxins proportional zur vorhandenen Proteinmenge. Die Proben erreichten immer noch Werte bis zu 2×10^6 IE/ml. Dies ist viel zu hoch, um

die Ergebnisse zweifelsfrei bewerten zu können. Man geht bei Endotoxinwerten bis 0,3 IE/ml von einer möglichen Interferenz aus. Dies entspricht etwa 100 pg LPS. Daher wurde versucht Endotoxin mithilfe geeigneter Methoden abzureichern.

So erreichten auch die EndoTrap-Säulen der Fa. Profos keine ausreichende Dekontamination. Nach der Abreicherung lag der Endotoxinwert im niedrigsten Fall noch im Bereich von etwa 300 IE/ml. Jedoch zeigte der IL-10 ELISA im Vergleich zur nicht abgereicherten Probe ein aussagekräftigeres Bild (Abbildung 3.14). Es waren einerseits höhere IL-10 Titer erreicht worden, dies kann jedoch mit einer Anreicherung des rp15E in der Lösung erklärt werden. So konnte man in Abbildung 3.12 nach der Dialyse gegen Equilibrierungspuffer (Kap. 2.3.7) und Elution von einer EndoTrap-Säule eine zusätzliche Aufreinigung erkennen. Adererseits zeigte sich in diesem Ansatz bereits eine Abhängigkeit der IL-10 Produktion von der eingesetzten Proteinkonzentration. Auch wenn ein Hintergrund aufgrund des immer noch hohen Endotoxinanteils nicht völlig ausgeschlossen werden kann.



Ein zusätzliches Problem der Endotoxinabreicherung war der auftretende Proteinverlust bei jedem Dekontaminationsschritt mit den EndoTrap-Säulen. Bei dem ersten Abreicherungsschritt hatte man durchschnittlich einen Verlust von etwa 25 % des Gesamtproteins. Bei jedem weiteren Abreicherungsschritt wurde der Verlust noch größer. Also waren mehrere Abreicherungsschritte hintereinander bei einem derart großen Verlust an Protein nicht durchführbar. Der Proteinverlust kann nur mit einer starken Wechselwirkung des rekombinanten p15E

mit dem Säulenmaterial erklärt werden. Daher müssten für die weitere Verwendung von bakteriell produziertem rp15E alle Phasen der Endotoxinanreicherung optimiert werden.

3.3.2 Klonierung und Expression von rp15E des PERV-A in Drosophila S2-Zellen

Um das Problem der Endotoxinkontamination zu umgehen, wurde in dieser Arbeit damit begonnen, ein Expressionssystem basierend auf Drosophila-Zellen zu etablieren. Da es sich bei den verwendeten Schneider 2-Zellen um eukaryontische Zellen handelt, ist eine Verunreinigung mit Endotoxin ausgeschlossen. Insektenzellen haben zudem den Vorteil, eine physiologische Glykosylierung von Proteinen zu ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde das TM-Protein p15E des porcinen endogenen Retrovirus A (PERV-A) verwendet. Das p15E von PERV-A weist eine sehr große Homologie zum p15E des FeLV auf. Die ISU-Domäne beider Proteine ist sogar zu 100 % identisch. Man kann daher davon ausgehen, dass beide Proteine eine vergleichbare Wirkung auf Immunzellen besitzen könnten. Das TM-Protein von PERV-A wurde jedoch ausgewählt, weil dieses Virus in naher Zukunft eine wichtige Rolle im transplantationsmedizinischen Alltag erhalten könnte (Kap. 1.2.2). Im Rahmen des Mangels an geeigneten Transplantaten wird zunehmend über die Verwendung von Schweineorganen als Xenotransplantate nachgedacht. Da PERVs ein endogener Bestandteil aller Schweinezellen sind, besteht die Gefahr der Freisetzung im Patienten. Das vorhandene p15E könnte dann eine Immunsuppression bewirken und die Tumorigenese fördern. Aus diesem Grund wurde an dieser Stelle das TM-Protein von PERV-A verwendet.

Aus einem bereits vorhandenen Klon im bakteriellen Expressionsvektor pCal-n [115] wurde mittels PCR die Sequenz der Ectodomäne amplifiziert und durch die beiden Primer mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Not I und BamHI versehen. Es sind in allen vier PCR-Ansätzen, mit und ohne 1 mM MgCl₂, die gewünschten Fragmente mit einer Länge von 340 bp zusehen ().

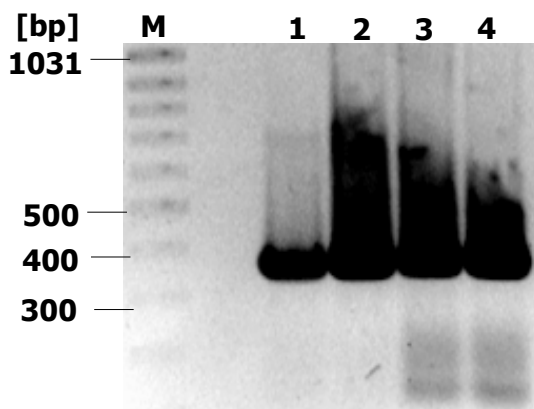


Abbildung 3.15 Agarose-Gel der Amplifikate der PCR aus pCal-n/rp15E

Aus dem Vektor pCal-n/rp15E wurde mit den Primern p15E-BamHI-forward und p15E-Not I-reverse die Ectodomäne von rp15E amplifiziert. Alle 4 Ansätze zeigen ein Fragment in der erwarteten Größe von 340 bp.

M = 100 bp-Ladder, Bahn 1 = 12,5 ng Plasmid, Bahn 2 = 19 ng Plasmid, Bahn 3 = 12,5 ng Plasmid, Bahn 4 = 19 ng Plasmid

Bahn 3 und 4 jeweils mit 1 mM MgCl₂

Der Vektor pMT/BiP/V5-His C wurde dann mit den Restriktionsenzymen Bgl II und Not I, das Insert mit den Enzymen Not I und BamHI, verdaut und zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (Abbildung 3.16). Das Fragment hat eine Länge von 340 bp, der Vektor von 3,6 kb und wurde vollständig verdaut. Das Insert konnte nicht mit Bgl II geschnitten werden, da zwei Schnittstellen dieses Restriktionsenzymes im Insert enthalten sind. Es wurde daher mit BamHI geschnitten. Die Schnittstellen von BamHI und Bgl II sind miteinander kompatibel und konnten problemlos ligiert werden.

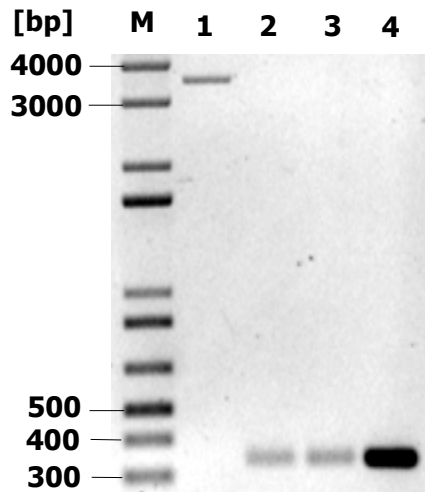


Abbildung 3.16: Agarose-Gel des Kontrollverdau von Vektor und PCR-Produkt

Der Vektor pMT/BiP/V5-His C und das PCR Produkt wurden mit Not I und Bgl II bzw. BamHI vgeschnitten, gereinigt und auf ein 1 %iges Gel aufgetragen. Der Vektor hat die Größe 3,6 kb und das PCR-Fragment eine Länge von 340 bp.

M = 1 kb Plus-Ladder, Bahn 1 = Vektor verdaut, Bahn 2 und 3 = PCR-Produkt verdaut, Bahn 4 = PCR-Produkt unverdaut

Nach der Ligation und Transformation konnten elf Klone von der Selektionsplatte gepickt werden, zur Kontrolle wurde auch eine Kolonie der Vektorkontrolle gepickt. Sowohl eine Colony-PCR (Abbildung nicht gezeigt), als auch ein Kontrollverdau von extrahierter Plasmid-DNS mit BamHI zeigten ein positives Bandenmuster (Abbildung 3.17). Bei den drei Proben 4, 5 und 10 war zuwenig Plasmid-DNS isoliert worden.

Eine anschließende Sequenzierung ergab, dass das Fragment in Frame mit dem Leserahmen des Vektors kloniert worden war und keine Mutationen oder Stoppcodons vorhanden waren. Das Vektorkonstrukt mit der rp15E Sequenz wurde dann mit dem Plasmid Endofree Maxi Kit von Qiagen endotoxinfrei aufgereinigt, um möglichst hohe Transfektionsraten zu erzielen. Endotoxin verringert die Effizienz von Transfektionen und beeinflusst das Wachstumsverhalten der transfizierten Zellen [121, 122]. Die Konstrukte wurden anschließend mittels CaCl_2 -Transfektion in *Drosophila* S2-Zellen gebracht. Nach transienter Transfektion und anschließender Induktion für 48 h konnten im SDS-Gel und im Western Blot mit α -V5-Antikörpern gegen das angehängte V5-Epitop und α -p15E-Immunsereum trotz Aufkonzentrierung über IMAC mit Ni-NTA-Säulen keine Proteinexpression nachgewiesen werden. Ebenso zeigte eine mit einem eGFP-Vektor transfizierte Positivkontrolle keine Proteinexpression.

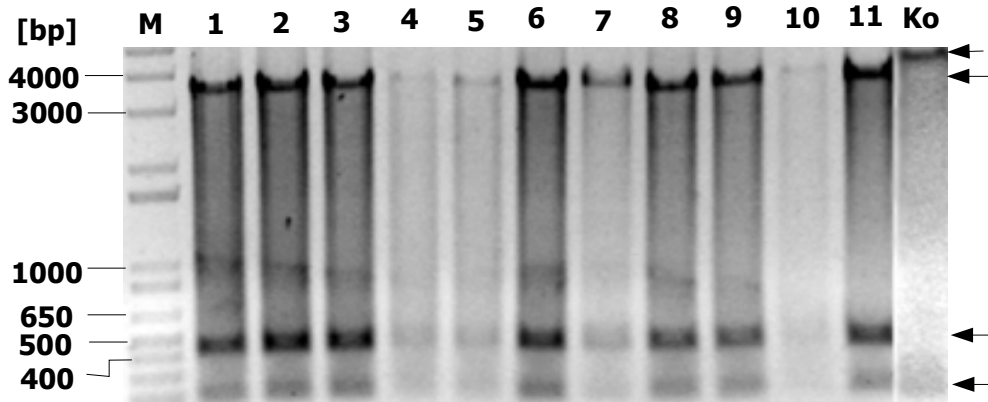


Abbildung 3.17 Agarose-Gel zur Kontrolle der isolierten Kolonien

Minipreps und Negativkontrolle mit dem Vektor pMT/BiP/V5-His C verdaut mit Bam HI und Not I. Positive Proben sollten eine Vektorbande bei 3,6 kb und zwei Insertbanden bei 460 bp und bei 180 bp enthalten, die Kontrolle eine Doppelbande bei 160 bp. Bei fast allen Proben ist eine starke Bande bei 460 bp und eine schwächere bei etwa 200 bp zu sehen, siehe untere Pfeile.

M = 1 kb Plus-Ladder, Bahn 1 -11 = isolierte Plasmid-DNS, Bahn KO = Vektor pMT/BiP/V5-His C

Die Ansätze im 6-Well Format mit nur 3 ml Kulturvolumen ermöglichen bei zu geringer Proteinexpression keine Detektion über SDS-Gel oder Western Blot. Aus diesem Grund wurde eine stabile Transfektion durchgeführt, um mit deutlich größerem Kulturvolumen arbeiten zu können. Nach dreiwöchiger Selektion mit 30 µg/ml Blasticidin konnte ein deutlicher Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen einer nicht-transfizierten Kontrolle und den transfizierten Zellen beobachtet werden. In der nichttransfizierten Kontrolle lag der Anteil lebender Zellen deutlich unter 1 %. Die selektionierten Zellen wurden gesplittet und für Expressionsstudien verwendet.

Die Expression von rp15E in den transgenen S2-Zellen war allerdings ziemlich schwach. Ohne zusätzliche Konzentrierung und Aufreinigung des exprimierten rp15E anhand des angehängten 6x-His-Tags mit Ni-NTA-Säulen (Ni Superflow Columns 1,5 ml, Qiagen) konnte kein Protein im SDS-Gel nachgewiesen werden. Bei einem Kulturvolumen von 20 ml und nach 48 h Induktion ließ sich nach Aufreinigung über IMAC im Eluat im SDS-Gel nur eine schwache Bande bei 15 kDa anfärben, die der Größe des rp15E mit den angehängten V5- und 6x-His Tags entspricht (Abbildung 3.18).

Die Bande ist durch den unteren Pfeil gekennzeichnet. Die Proteinkonzentration des rekombinanten p1E liegt wahrscheinlich nur im Bereich von 1 mg pro Liter Kulturvolumen. Zudem zeigten sich einige Banden im Bereich von 50 kDa aufwärts, die jedoch im Laufe der Aufreinigung deutlich schwächer wurden. Besonders stark war eine Bande bei etwa 65 kDa im Überstand und im Durchlauf ausgeprägt, siehe oberer Pfeil. Es könnte sich hierbei um BSA ($M_r = 67$ kDa) aus dem Medium zugesetzten FKS handeln. Die affinitätschromatographische Aufrei-

nigung über eine Ni-NTA-Säule konnte eine deutliche Reduzierung der unerwünschten Proteine erzielen.

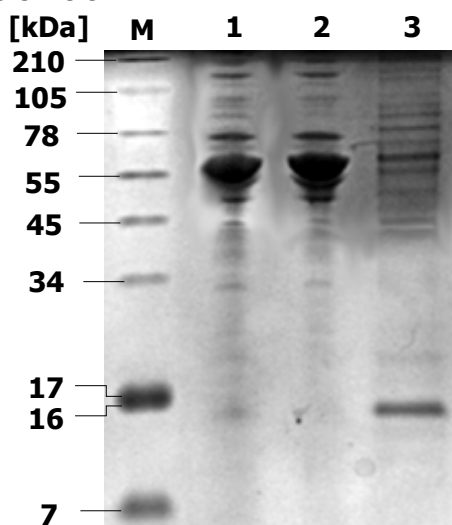


Abbildung 3.18: SDS-Gel von induziertem S2-Kulturüberstand

Der Kulturüberstand von induzierten S2-Kulturen wurde mittels IMAC aufgereinigt und konzentriert. Man kann im Eluat der Ni-NTA-Säule eine Bande bei 15 kDa, markiert durch den unteren Pfeil, erkennen. Zudem gibt es eine Bande bei etwa 65 kDa, oberer Pfeil, anhand derer man einen deutlichen Reinigungserfolg erkennen kann.

M = SeeBlue®Plus2 Standardmarker, Bahn 1 = Zellkulturüberstand, Bahn 2 = Durchlauf Ni-NTA-Säule, Bahn 3 = Eluat der Ni-NTA-Säule

Ein Western Blot mit α -V5-Antikörpern gegen das V5-Epitop zeigte vor allem im Eluat der Ni-NTA-Säule ein deutliches Signal bei 15 kDa (Abbildung 3.19). Eine zweite Bande war bei etwa 30 kDa zu sehen, hierbei handelte es sich vermutlich um Dimere von rp15E. Beide Banden sind auch im Kulturüberstand erkennbar, wenn auch deutlich schwächer. Im Durchlauf sind keine Signale zu sehen.

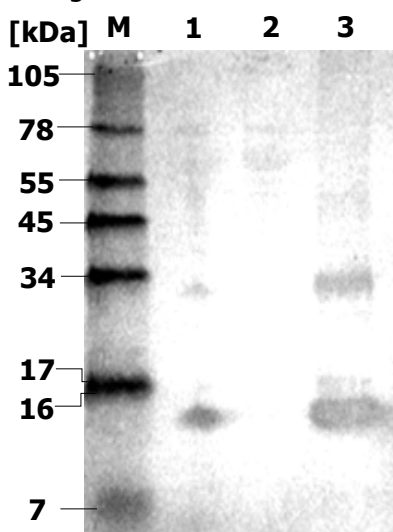


Abbildung 3.19: Western Blot -Analyse der Kulturüberstände von transfizierten S2-Zellen

Es sind dieselben Proben wie in Abbildung 3.18 aufgetragen. Zu sehen sind mit α -V5-Antikörper zwei Anfärbungen bei 15 kDa und 30 kDa. Beide Banden sind sowohl im Eluat als auch im Kulturüberstand zu sehen. Es handelt sich hierbei um Monomere und Dimere des rekombinanten p15E.

M = SeeBlue®Plus2 Standardmarker, Bahn 1 = Zellkulturüberstand, Bahn 2 = Durchlauf Ni-NTA-Säule, Bahn 3 = Eluat der Ni-NTA-Säule

Western Blot-Analysen mit einem Ziegen Serum gegen p15E von PERV-A zeigten wesentlich mehr Banden und die Signale sind deutlich schwächer. Vermutlich war die aufgetragene Proteinmenge für einen Nachweis mithilfe des Ziegen Serums nicht ausreichend.

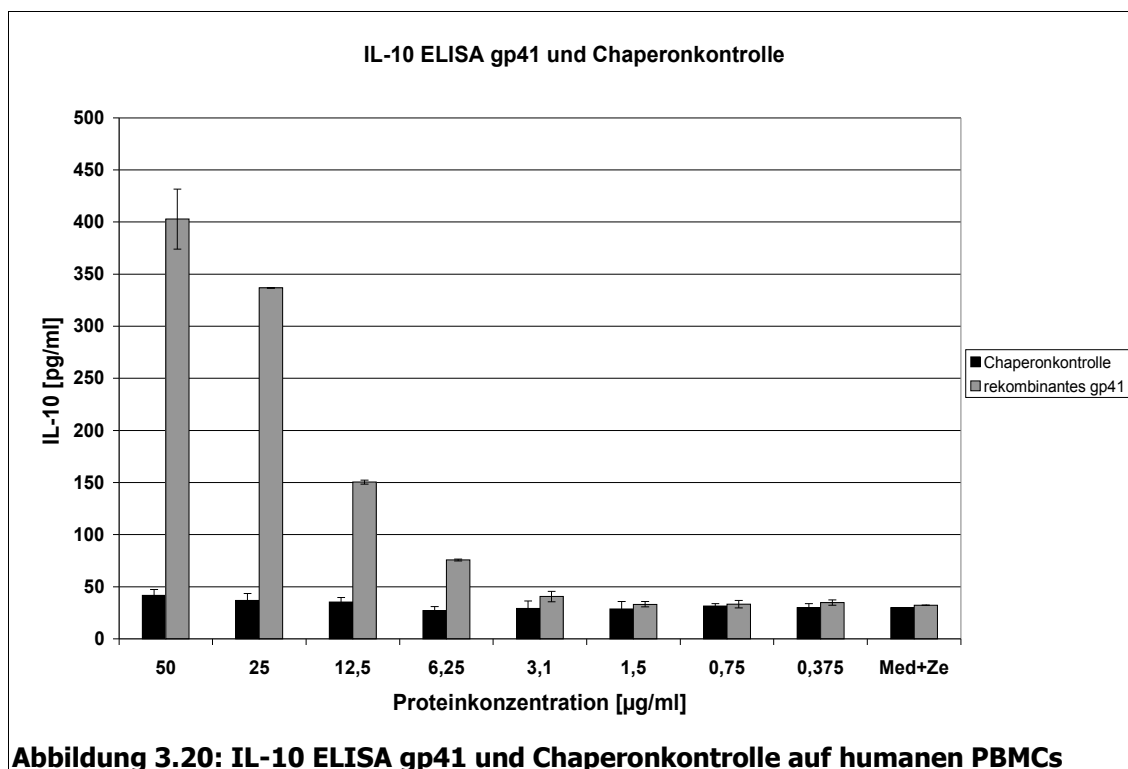
3.3.3 Analyse der Cytokinmodulation durch rekombinantes HIV-1 gp41

Das humane Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) ist für die meisten HIV-Infektionen weltweit verantwortlich. Die Infektion mit HIV führt in fast allen Fällen zu einer lethalen Immundefizienz. Aber auch der Mechanismus dieses Retrovirus zur Induzierung der Immunsuppression ist

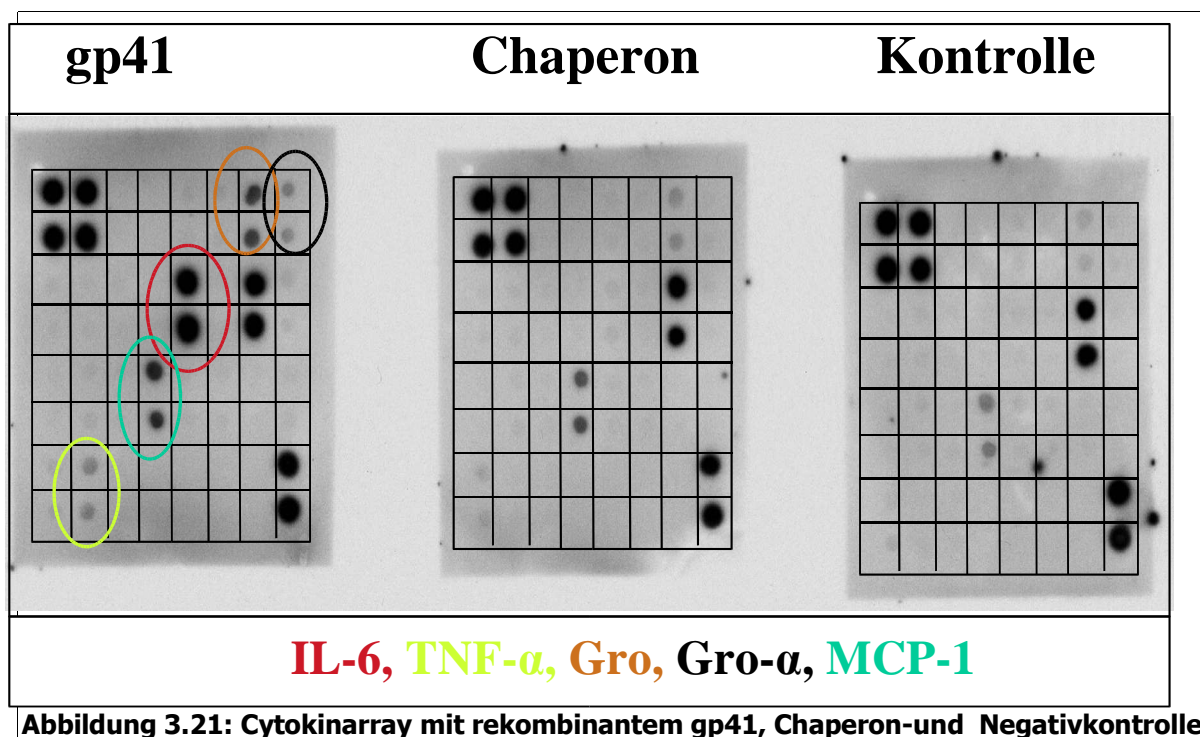
nicht völlig klar. So ist bisher nicht belegt, ob der Lentivirus HIV-1 denselben Mechanismus zur Modulierung des Immunsystems anwendet wie beispielsweise die γ -Retroviren FeLV und PERV.

Aus diesem Grund wurde die Ectodomäne des transmembranen Hüllproteins gp41 des humanen Lentivirus HIV-1, bestehend aus den Aminosäuren 536-681, in dieser Arbeit zur Untersuchung der IL-10 Produktion, sowie für Cytokinarray-Studien zur Untersuchung der Cytokimodulation eingesetzt. Das verwendete rekombinante gp41 wurde von Roche Diagnostics (Penzberg) bezogen und war dort mit dem Chaperon slyD als Tag und Faltungshelfer kloniert und in *E.coli* transgen hergestellt worden. Neben dem Chaperon besitzt das rgp41 noch einen 6x Histidintag und einen flexiblen Glyzin-reichen Linker. Die Aufreinigung erfolgte bei Roche unter chaotropen, also denaturierenden Bedingungen. Die Renaturierung wird durch das angehängte Chaperon deutlich verbessert. Die Abreicherung von Endotoxin wurde bei Roche ebenfalls mit dem EndoTrap Endotoxin Removal System der Fa. Profos durchgeführt. Als Kontrollprotein wurde in dieser Arbeit das Chaperon slyD ohne rekombinanten Anteil verwendet. Die Proteine wurden von Roche bereits auf ihren Endotoxingehalt hin untersucht und konnten auch hinsichtlich dieses Faktors gut verglichen werden.

Es konnte mit gp41 in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ eine deutliche Induktion von IL-10 nachgewiesen werden (Abbildung 3.20). Klar zu sehen war auch eine Abhängigkeit der IL-10 Produktion von der eingesetzten Proteinmenge. Das vergleichbare Kontrollprotein Chaperon slyD zeigte hierbei keinen Anstieg des IL-10 Titers. Die Endotoxinwerte waren in beiden Fällen extrem niedrig und weit unter von uns erreichten Werten. So hatte das verwendete gp41 bei einer Proteinkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ nur einen Wert von 0,075 IE/ml. Der Wert des Chaperons lag mit 0,042 IE/ml bei der höchsten Proteinkonzentration sogar noch niedriger. In beiden Fällen wurde der Schwellenwert von 0,3 IE/ml deutlich unterschritten. Man kann daher davon ausgehen, dass das restliche Endotoxin keine Interferenz mit Assay zeigt.



Ähnlich wie bei den Homopolymeren der ISU-Peptide wurde versucht, einen Überblick über die Modulation verschiedener Cytokine zu erhalten. Mit dem rekombinanten gp41 durchgeführte Cytokinarray-Experimente zeigen ein vergleichbares Ergebnis wie mit den Homopolymeren (Abbildung 3.21).



Das rekombinante Protein induzierte ebenfalls einen Anstieg von IL-6 und TNF- α . Weiterhin konnte man einen Anstieg der beiden Cytokine GRO und GRO- α erkennen. Ein leichter Anstieg von GRO ist allerdings auch beim Chaperon und der Negativkontrolle erkennbar. Zusätzlich zeigt sich bei gp41 ein Anstieg des Chemokins MCP-1. Im Gegensatz zu den gekoppelten Peptiden war beim rekombinanten gp41 im Cytokinarray kein Anstieg des immunregulatorischen Cytokins IL-10 zu sehen.

Das rekombinante gp41 konnte also ebenso wie die polymerisierten Peptide in der Zellkultur einen Anstieg des IL-10 Titers induzieren. Dieser Effekt war nicht durch Endotoxin bedingt, da die Konzentration unter dem Minimalwert lag. Im Cytokinarray konnte zwar der Anstieg anderer Cytokine, aber nicht von IL-10 beobachtet werden.

3.4 Klonierung rgp41-transgener 293-Tumorzellen

Ein weiteres Modell, um die Wirkung von retroviralen TM-Proteinen zu untersuchen, besteht in ihrer Expression als Transmembranproteine in eukaryontischen Zellen speziell in Tumorzellen. Artfremde Tumorzellen können im Tiermodell nur dann Tumore ausbilden, wenn sie nicht vom Immunsystem frühzeitig eliminiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Tumorzellen, die mit unterschiedlichen TM-Proteinen transfiziert waren, im Gegensatz zu nichtveränderten Tumorzellen in immunkompetenten Mäusen Tumore hervorrufen konnten [123-125]. Die Verwendung von veränderten Tumorzellen ermöglicht also ein in vivo-Modell, bei dem der Einfluss immunsuppressiver, retroviraler TM-Proteine im Mausmodell untersucht werden kann.

Im Zuge dessen wurde in dieser Arbeit damit begonnen, ein System zu etablieren, bei dem humane 293-Zellen mit der Ectodomäne und dem Transmembranteil des gp41 transfiziert wurden. Das Protein lag hierfür bereits in den Vektor pDisplay kloniert vor. Von diesem Konstrukt sollte eine zusätzliche Variante erstellt werden, die zudem eine IRES-Sequenz mit der Sequenz des rotfluoreszierenden Proteins DsRed2 enthält. Diese Variante soll die Identifikation der Tumorzellen erleichtern und ihre Sortierung über FACS ermöglichen.

Aus dem Vektor pLV-tTR/KRAB-Red (Prof. D. Trono, Genf, CH) wurde mithilfe der beiden Primer DsRed2_SalI_up und DsRed2_Not I_down das gewünschte etwa 1,3 kb große Fragment amplifiziert (Abbildung 3.22).

Der Vektor pDisplay-gp41 wurde von M.Schmolke, AG Denner, übernommen und mittels Restriktionsverdau auf die richtige Insertgröße von 1,05 kb für gp41 überprüft. Das Ausgangskonstrukt war durch Restriktionsverdau mit den Enzymen Bgl II und Pst I überprüft worden und ergab die erwartete Bande bei 1,1 kb (Abbildung nicht gezeigt).

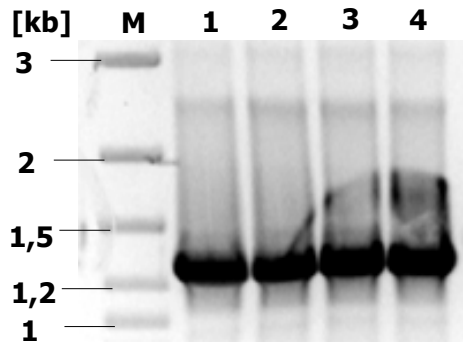


Abbildung 3.22: Agarose-Gel der PCR zur Amplifizierung des IRES-DsRed-Fragments

Aus dem Vektor pLV-TRKRAB-Red wurde mithilfe zweier Primer das IRES-DsRed-Fragment vervielfältigt. Das Gel zeigt eine starke Bande im erwarteten Größenbereich von ca. 1,3 kb.

M = 100 bp Plus-Ladder, Bahn 1 -4 = PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Templatekonzentrationen

Das Ausgangskonstrukt pDisplay-gp41 wurde dann mit den Restriktionsenzymen Not I und Sal I proximal zur gp41-Sequenz in 5'-Richtung verdaut, so dass ein 190 bp großes Fragment aus dem Vektorkonstrukt herausgeschnitten wurde. Zwischen beide Schnittstellen wurde anschließend das mit Not I und Sal I geschnittene IRES-DsRed-Fragment hineinkloniert. Das erhaltene Konstrukt wies nun eine Länge von 7,4 kb auf. Das neue pDisplay-Konstrukt wurde daraufhin in E.coli transformiert und alle Ampicillin-resistenten Kolonien wurden mittels Colony-PCR und den beiden Ausgangsprimern überprüft. Von Klonen, bei denen eine Bande im Größenbereich von 1,3 kb auftrat, wurde zusätzlich ein Verdau der isolierten Plasmid-DNS mit den Enzymen Not I und Sal I durchgeführt. Aus den identifizierten, positiven Klonen wurden anschließend zwei Klone ausgewählt und durch DNS-Sequenzierung überprüft. Bei beiden Klonen ergaben sich keine Abweichungen von der erwarteten Sequenz.

Das klonierte Vektorkonstrukt wurde nun in größeren Mengen endotoxinfrei aufgereinigt, um maximale Transfektionsraten zu erzielen, und mithilfe der beiden Restriktionsenzyme Bgl II und Not I überprüft (Abbildung 3.26). Im Vergleich zum Ausgangsvektor pDisplay-gp41 zeigt sich eine deutliche Verschiebung der Fragmentgröße von 1,2 kb auf 2,3 kb. Das ausgeschnittene Fragment umfasst die Sequenzen für das gp41, für DsRed2 und die IRES-Sequenz.

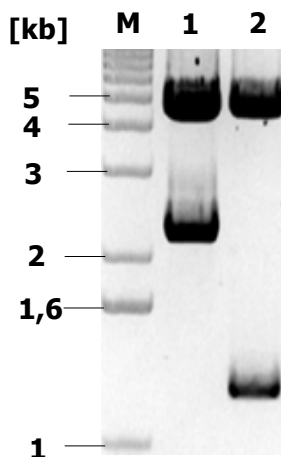


Abbildung 3.23 Agarose-Gel zur Überprüfung des klonierten Plasmidkonstrukts

Das Plasmid pDisplay-gp41-IRES-DsRed wurde über den Endofree Maxi Kit aufgereinigt und mit den beiden Enzymen Bgl II und Not I zur Kontrolle geschnitten. Das Fragmentmuster zeigt einen deutlichen Unterschied zur Kontrolle. Das klonierte Fragment liegt im Bereich von 2,3 kb, im Kontrollvektor pDisplay-gp41 nur bei 1,2 kb

M = 1 kb Plus-Ladder, Bahn 1 = kloniertes Vektorkonstrukt pDisplay-gp41-IRES-DsRed, Bahn 2 = Ausgangsvektor pDisplay-gp41

Mit dem erhaltenen Konstrukt wurden dann humane 293-FDA-Zellen transfiziert. Hierbei handelt es sich um eine embryonale Nierenkarzinomzelllinie. Diese Zelllinie wurde ausgewählt, weil sie sich einfach transfizieren lassen und später in einem in vivo-Modell eingesetzt werden können. Zusätzlich wurden 293-FDA-Zellen auch mit dem Ausgangsplasmid pDisplay-gp41 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit 500 µg/ml Geneticin selektioniert, um stabil transfizierte Klone zu isolieren. Die mit dem IRES-DsRed-Konstrukt transfizierten Zellen wurden mit Immunfluoreszenzmikroskopie auf eine DsRed-Fluoreszenz hin überprüft.

Die Effizienz der Transfektion lag im Bereich von 50-60 %. Aus diesem Grund gestaltete es sich als besonders schwierig, stabil transfizierte Klone zu isolieren. Zellen, die mit dem rotfluoreszierenden Konstrukt transfiziert waren, zeigten ein schwächeres Wachstum und konnten sehr schlecht isoliert werden. Mit dem Ausgangskonstrukt transfizierte Zellen ließen sich wesentlich besser isolieren und zeigten ein schnelleres Wachstum. Aus zwei hieraus isolierten Klonen ließen sich bereits mittels Durchflusscytometrie erste Daten zur Stärke der Oberflächenexpression gewinnen. Die Zellen wurden dabei nicht permeabilisiert, um die Oberflächenexpression des rekombinanten gp41 über den gp41-spezifischen monoklonalen, humanen Antikörper 2F5 nachweisen zu können.

Die nichttransfizierte Negativkontrolle wies hierbei eine minimale Fluoreszenz auf. Im festgelegten Fluoreszenzbereich M1, mit einer Fluoreszenzintensität größer als 30, war nur ein minimaler Bruchteil der Kontrollzellen enthalten (Abbildung 3.24).

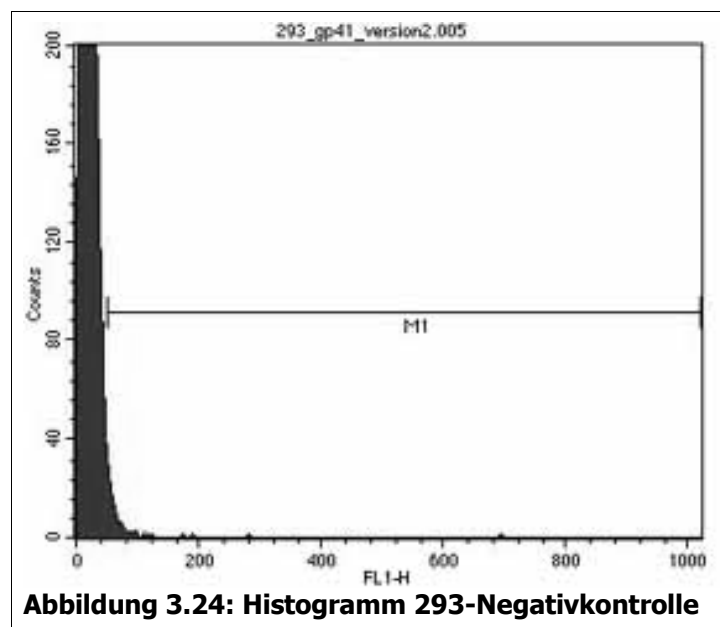
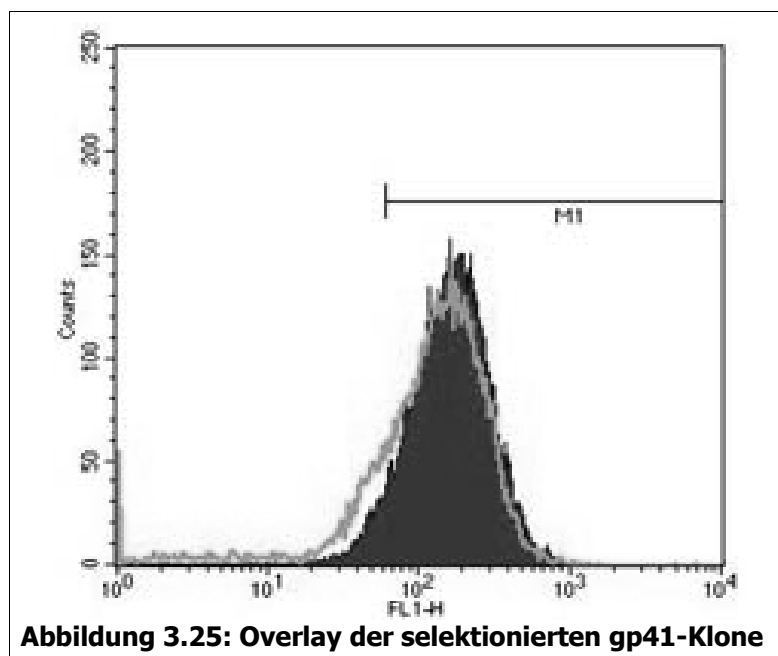


Abbildung 3.24: Histogramm 293-Negativkontrolle

Aus technischen Gründen ist die Fluoreszenzintensität in einer linearen Skala aufgetragen, während sie bei den transformierten Klonen logarithmisch skaliert wurde. Der festgelegte Gatebereich M1 umfasst dennoch denselben Bereich.

Der Histogramm Plot der selektierten, gp41-transgenen 293 FDA-Zellen ließ eine starke Verschiebung in einen höheren Intensitätsbereich der Fluoreszenz erkennen. Ein Overlay zeigt eine vergleichbare Stärke der Oberflächenexpression von gp41 bei den selektierten Zellklonen (Abbildung 3.25).

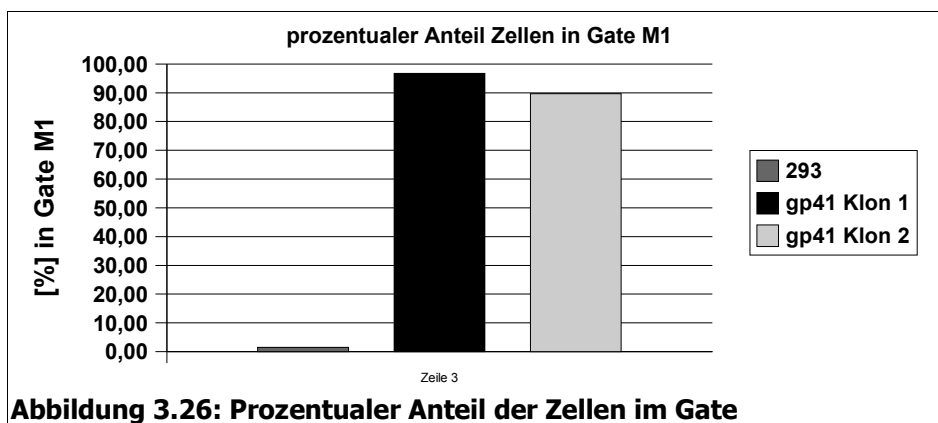


Der Medianwert aller Proben ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Der Median einer nichttransfizierten 293-Zellkontrolle lag bei 17, während der Median der selektierten Klone bei mehr als 140 lag, also beinahe um den Faktor 10 höher. Bei den Zellen, die im festgelegten Bereich M1 gemessen wurden, ist der Unterschied im Vergleich zur 293-Kontrolle lediglich dreimal so hoch.

	Kontrolle	Klon 1	Klon 2
Median	17,00	159,63	142,02
Gate (%)	1,49	96,70	89,69
Median Gate	58,00	164,00	153,99

Tabelle 3.1 Auswertung der Statistik der Immundurchflußcytometrie

Entscheidend ist jedoch der Anteil der erfassten Zellen im ausgewählten Bereich M1. Hier wurde der Unterschied zwischen Negativkontrolle und den beiden selektierten Klonen besonders deutlich (Abbildung 3.26). Während bei der nichttransfizierten Negativkontrolle 293 FDA nur anderthalb Prozent der Zellen im ausgewählten Bereich lagen, betrug der Anteil bei den transfizierten Zellen 90 % oder mehr.



Es konnte folglich gezeigt werden, dass die selektionierten und isolierten Zellklone eine deutliche Oberflächenexpression des rekombinanten gp41 aufweisen. Weitere Nachweise wie die Immunfluoreszenzmikroskopie würden die erhaltenen Daten noch zusätzlich untermauern.

4 DISKUSSION

4.1 Identifizierung von Bindungsproteinen retroviraler TM-Proteine

Bei der Suche nach potentiellen Rezeptoren für die immunsuppressive Wirkung von retroviralen, transmembranen Hüllproteinen wurden mithilfe der Säulenaffinitätschromatographie und der Affinitätspräzipitation mit Magnetbeads drei putative Bindungsproteine des retroviralen TM-Proteins p15E von FeLV identifiziert: Nucleolin, β -Aktin und GAPDH.

Die Säulenaffinitätschromatographie ergab bei Säulenmaterial mit einem Protein : Sepharose Verhältnis von 10 mg Protein pro Milliliter Sepharose eine wesentlich höhere Proteinausbeute. Dadurch waren mehr und stärkere Banden zu erkennen, die bei der ersten Säule, mit einem Protein : Sepharose Verhältnis von 5 mg/ml, nicht eluiert wurden. Dies könnte bedeuten, dass nicht-kovalent gebundene Moleküle während der Säulenherstellung auf der Säule verbleiben, und nur teilweise eluiert werden. Darauf weist auch das Auftreten einer schwachen rp15E-Bande bei der Eluierung mit dem NaCl-Gradienten hin (Abbildung 3.2). Da identische Mengen Lysat aufgetragen wurden, könnte dies ein Hinweis auf eine notwendige Stöchiometrie des gebundenen rp15E darstellen. Die beiden TM-Proteine gp41 von HIV-1 und p15E von FeLV bilden trimere Strukturen [18-20]. Daher könnte die Bildung von Di- oder Trimeren an der Sepharosematrix das Aufreinigen von Bindungsproteinen vermutlich verbessern. Unter Umständen könnte eine vorherige Trimerisierung des rp15E und die anschließende Kopplung an Sepharose noch bessere Ausbeuten liefern und unspezifische Bindungen reduzieren.

Die Affinitätspräzipitation mit Magnetbeads lieferte eine ganze Reihe von Banden, die auch bei unbehandelten Magnetbeads auftraten und eindeutig unspezifischer Natur sein mussten. Daher liegt die Möglichkeit nahe, dass bei mangelnder Blockierung der Magnetbeads nach Kopplung des rekombinanten p15E eine ganze Reihe von Proteinen des Zelllysates an die Beads binden können. Dies würde erklären, warum auch mehrmaliges Waschen der Magnetbeads keine Abreicherung der Nebenbanden brachte. Dieses Problem ließe sich in Zukunft wahrscheinlich umgehen, wenn ein optimiertes Kopplungs- und Blockierungsprotokoll entwickelt und verwendet werden würde.

Mithilfe der chromatographischen Aufreinigung aus dem Lysat der T-Zelllinie C8166 wurden trotz dieser Probleme mehrere Banden im SDS-Gel gefunden, die potentielle Bindungspartner des rp15E darstellen. Aufgrund bereits vorliegender Ergebnisse wurden speziell drei Banden näher untersucht. In verschiedenen Arbeitsgruppen konnten bei Versuchen mit den TM-Proteinen gp41 von HIV-1 und gp36 von HIV-2 auf diversen T- und B-Zelllinien potentielle Bindungsproteine isoliert werden. Bereits Anfang der 90er Jahre konnte die Gruppe um

Henderson mithilfe synthetischer, radioaktiv-markierter Peptide ein putatives Bindungsprotein mit einer Masse von etwa 44 kDa isolieren [106]. Ergebnisse anderer Gruppen zeigten zwei weitere ^{125}I -markierte Zelloberflächenproteine bei 97 kDa und 106 kDa, die mit hoher Affinität mit rekombinantem, löslichem gp41 und gp36 wechselwirkten [126]. Es konnten in der Folge weitere putative Bindungsproteine bei 37 kDa, 40 kDa und 55 kDa in Western Blots gegen gp41 nachgewiesen werden [126, 127]. Die Isolierung dreier Proteine von 40 kDa, 60 kDa und etwa 100 kDa Größe war zuvor in der Arbeitsgruppe Denner ebenfalls mit ^{125}I -markierten Peptiden mithilfe einer Affinitätschromatographie gelungen [102, 103, 120, 128]. Eine kurze Übersicht über bisher nachgewiesene, putative Bindungspartner gibt Tabelle 4.1.

Köder	Bindungspartner	Methode	Quelle
ISU-Peptide an BSA gekoppelt	40 kDa, 60 kDa und 100 kDa	^{125}I -markierte Peptide, Crosslinking	Vogel, Th., 1991 (AG Denner) [102, 103, 120, 128]
ISU-Peptide an HSA gekoppelt	44 kDa	^{125}I -markierte Peptide, Crosslinking	Qureshi, NM.et al., 1990 [106]
Rekombinantes, lösliches (rs) gp41	37 kDa, 40 kDa, 55 kDa, 97 kDa und 108 kDa	Western Blot und ^{125}I -Oberflächenmarkierung	Chen, YH et al., 1992 [127]
Rspg41 und rs-gp36	44 kDa, 98 kDa und 106 kDa (humane Zellen) und 98 kDa, 108 kDa (murine Zellen)	^{125}I -Oberflächenmarkierung und Affinitätschromatographie	Ebenbichler et al., 1993 [126]
rsgp41	45 kDa, 50 kDa und 62 kDa	^{125}I -Oberflächenmarkierung und Affinitätschromatographie / WB	Henderson et al., 1993 [104]
rsp15E	37 kDa, 40 kDa und 100 kDa	Affinitätschromatographie und Sequenzierung	Diese Arbeit
ISU-Peptide	37 kDa, 40 kDa und 100 kDa	Affinitätschromatographie und Sequenzierung	AG Denner

Tabelle 4.1: Bekannte putative Bindungsproteine und ihr Nachweis

Diese Arbeit konzentrierte sich vor allem auf drei Banden bei 37 kDa, 40 kDa und bei 100 kDa, die aufgrund obiger Ergebnisse vielversprechende Kandidaten darstellten. In obigen Arbeiten konnte nur ein Teil der gefundenen Proteine identifiziert werden. Auch die Wechselwirkung mit und Bindung an rekombinantes gp41 konnte nur in wenigen Fällen charakterisiert werden (Tabelle 4.2).

Putativer Rezeptor	Bindung an gp41	Kompetition	Referenz
p45	aa 539-684 aa 583-599 (ISU-Peptid) N-terminale Domäne	Antikörper: α -IFN- α , α -IFN- β oder α -rsgp41	Chen, YH. et al., 1999 [129]
p50 (51 kDA Untereinheit des IFN α / β -Rezeptors)	unbekannt	IFN- β	Yu, T. et al., 2000 [130]
p62 (hsp60)	aa 539-684 aa 646-674 (C-terminale Domäne)	hsp60 aa 646-674	Chen, YH, et al., 1999 [131] Speth, C. et al., 1999 [132]
CR3	unbekannt		Stoiber, H. et al., 1997 [9]
Komplementprotein C1q	aa 59-610 aa 589-603 aa 601-620	aa 601-613 aa 591-613	Ebenbichler, C. et al., 1991 [133] Thielens, NM., 1993 [134]

Tabelle 4.2: Vergleich putativer Bindungsproteine von gp41 des HIV-1

In dieser Arbeit konnten mithilfe der MS/MS-Sequenzierung und anschließender Western Blot Analysen drei Proteine identifiziert werden: β -Aktin und Nucleolin bei der Säulenchromatographie, sowie GAPDH bei der Affinitätspräzipitation. β -Aktin und GAPDH sind allerdings keine bekannten Transmembranproteine, während es für Nucleolin eine Reihe von Daten bezüglich einer Oberflächenlokalisierung gibt. Dennoch scheint es eine spezifische Wechselwirkung mit dem rp15E von FeLV zu geben. Aber welche Art der Wechselwirkung besteht zwischen den cytoplasmatischen bzw. nukleären Proteinen und dem viralen TM-Protein?

4.1.1 Wechselwirkung von rp15E mit Nucleolin und β -Aktin

Nucleolin ist bisher hauptsächlich als ein 707 Aminosäuren langes, ubiquitäres Phosphoprotein in den granulären Regionen von Nucleoli exponentiell wachsendender Zellen bekannt. In dieser Form spielt es eine wichtige Rolle bei der Transkription, der Reifung und dem Zusammenbau ribosomaler RNS. Nach dem heutigen Stand der Forschung hat Nucleolin eine wichtige Bedeutung bei der Regulation von Transkription, Zellproliferation und Zellwachstum [135]. All diese Aspekte implizieren eine cytoplasmatische oder nukleäre Lokalisation des Nucleolins, während eine spezifische Wechselwirkung mit retroviralem rp15E an der Zelloberfläche stattfinden müsste. Es gibt einige Daten, die eine Lokalisation von Nucleolin auf der

Zelloberfläche nachweisen. Bereits Anfang der 80er Jahre bewiesen erste Untersuchungen das Vorkommen von Nucleolin auf der Zelloberfläche von Mausfibroblasten [136]. In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass Nucleolin auf HeLa-Zellen von der extrazellulären Ecto-Protein Kinase phosphoryliert werden kann [137]. Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass Nucleolin apoB- und apoE-enthaltende Lipoproteine auf der Oberfläche von Hep-G2-Zellen bindet [138]. Zudem konnte eine ganze Reihe von Wechselwirkungen mit Viren nachgewiesen werden. So binden Coxsackie B Viren spezifisch an Oberflächennucleolin [139]. Nucleolin konnte auch als Fructosyllysinspezifisches Bindungsprotein auf der Zelloberfläche der Monocytenzelllinie U937 identifiziert werden [140].

Auch für das Lentivirus HIV-1 gibt es Ergebnisse, die auf eine Rolle von Nucleolin bei der Infektion bzw. dem Attachment der Viren hindeuten. So bindet das anti-HIV Cytokin Midkin als Ligand mit niedriger Affinität an Oberflächen-exprimiertes Nucleolin [141]. Dieser Vorgang verhindert das Attachment der HI-Viren an die Oberfläche und somit die Infektion der Zellen [142]. Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass Nucleolin spezifisch mit dem Verpackungssignal von HIV-1 interagiert und zum Budding von viralen Partikeln beiträgt [143].

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass eine Oberflächenlokalisierung von Nucleolin stattfindet. Weiterhin deuten die Ergebnisse auf vielfältige Wechselwirkungen zwischen Nucleolin und Viren bzw. viralen Proteinen hin. Die spezifische Wechselwirkung, die wir mit der Säulenaffinitätschromatographie nachweisen konnten, könnte also eine Relevanz *in vivo* besitzen. Natürlich muss der Mechanismus und die Auswirkung dieser Wechselwirkung weiter eingehend untersucht werden. Hierzu bieten sich Hemmversuche mit rekombinantem Nucleolin bzw. mit α -Nucleolin-Antikörpern im IL-10 Assay, sowie eine nähere Charakterisierung der Bindungsstellen an.

Der Nachweis von β -Aktin bei der Affinitätschromatographie scheint eng mit dem Nachweis von Nucleolin assoziiert zu sein. Das 42 kDa Protein β -Aktin macht etwa 2-5 % des gesamten Zellproteins aus und bildet in seiner filamentösen Form die Mikrofilamente des Cytoskeletts. In dieser Eigenschaft geht β -Aktin vielfältige Wechselwirkungen mit anderen Proteinen ein. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Oberflächennucleolin intensiv mit dem Aktin-Cytoskelett interagiert [144]. Dies deutet darauf hin, dass die Aufreinigung von β -Aktin bei der Affinitätschromatographie eine Art Co-Präzipitation aufgrund der starken Wechselwirkung mit Nucleolin darstellt.

4.1.2 Wechselwirkung von rp15E mit GAPDH

Das 37 kDa Glykolyse-Protein GAPDH ist ein ubiquitäres Haushaltsprotein, das in beinahe allen Geweben stark exprimiert wird. Das Protein wurde bisher hauptsächlich mit einem wichtigen Schritt des Katabolismus in Verbindung gebracht. Neuere Forschungen haben jedoch eine ganze Reihe weiterer Aufgaben von GAPDH zutage gefördert (Übersicht siehe [145]). So ist das äußerst vielseitige GAPDH unter anderem an der Transkription und Reparatur der DNS, am Export von tRNS, der mRNS-Regulation und der Apoptose direkt oder indirekt beteiligt. Eine wichtige Rolle scheint GAPDH zudem bei der Membranfusion und dem Vesikeltransport inne zu haben [146, 147]. Somit ist GAPDH teilweise mit der Membran assoziiert, kommt aber als Oberflächenrezeptor dennoch nicht in Betracht. Aber welcher Art ist dann die Wechselwirkung zwischen rp15E und GAPDH?

Beide Proteine besitzen Sequenzen, die von Mitgliedern der Protein Kinase C (PKC) Familie erkannt werden. PKCs sind Serin-/Threonin-spezifische Proteinkinasen, die unter anderem an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt sind. PKCs zeigen nur eine begrenzte Substratspezifität. Sie benötigen lediglich basische Aminosäuren wie Arginin oder Lysin in der Nähe der Phosphorylierungsstelle [92]. So wird GAPDH in seiner Funktion beim Vesikeltransport und der Vesikelbildung von der PKC ι/λ phosphoryliert. Die Wechselwirkung findet hierbei hauptsächlich an der regulatorischen Untereinheit der PKC statt [145]. Alle PKC-Unterformen besitzen eine solche regulatorische Untereinheit, die eine Pseudosubstratsequenz enthält [148]. Bei den Pseudosubstraten ist lediglich das phosphorylierbare Serin oder Threonin der Substratsequenz gegen Alanin ausgetauscht. Bei den retroviralen TM-Proteinen weisen besonders die immunsuppressiven Domänen eine Homologie zu Pseudosubstratsequenzen der PKC Familie auf (). Eine Übersicht über PKCs und ihre regulatorischen Untereinheiten geben folgende Reviews [92, 148-150].

PKC-Substratsequenz	X	R	X	X	S/T	X	-	K/R
PKC-Pseudosubstrat	A	R	K	G	A	L	-	R
HIV-1gp41	A	R	I	L	A	V	E	R
FeLV p15E	N	R	R	G	L	D	I	L
GAPDH	E	R	D	P	S	K	I	K

Tabelle 4.3: Sequenzvergleich verschiedener PKC Pseudosubstrate

Vergleich einer PKC-Substratsequenz mit verschiedenen Pseudosubstratsequenzen von retroviralen TM-Proteinen und GAPDH. Übereinstimmungen sind dunkelgrau, konservative Austausche sind hellgrau unterlegt.

Diese Homologien können die beobachteten Wechselwirkungen zwischen GAPDH und rp15E bei den Versuchen erklären. Obwohl das retrovirale TM-Protein rp15E unter in vivo Bedingungen nicht mit dem cytoplasmatischen GAPDH wechselwirken kann, können diese sequenzspezifischen Interaktionen bei der Affinitätschromatographie auftreten.

4.2 Modulation der Cytokinproduktion durch immunsuppressive Peptide

Die transmembranen Hüllproteine weisen bei vielen Retroviren eine große Homologie zueinander auf. Besonders ein 26 Aminosäuren langes Segment ist hochkonserviert (Kap. 1.3.3). Von diesem Segment wurde das synthetische Peptid CKS-17 abgeleitet, das eine starke immunsuppressive Wirkung auf verschiedene Immunzellen in vitro besitzt.

Auch HIV-1 besitzt in seinem TM-Protein gp41 eine homologe Sequenz, die sogenannte immunsuppressive (ISU-) Domäne. Die hiervon abgeleiteten ISU-Peptide zeigen nur dann eine immunsuppressive Wirkung, wenn sie an größere Trägermoleküle wie BSA oder KLH gekoppelt werden (Kap. 1.3.2) [49].

Während zu Beginn BSA-ISU-Peptid-Konjugate eine Hemmung der Lymphocytenproliferation zeigten [29, 30], konnten später keine aktiven BSA-Konjugate mehr gewonnen werden. Auch Variationen der unterschiedlichen Kopplungsprotokolle ergaben nur schwach aktive Konjugate [31]. Daher wurde in dieser Arbeit versucht, den Effekt des Trägermoleküls durch eine homologe Kopplung der Peptide nachzuahmen und zu verstärken.

In den ersten vier Versuchen konnten jedoch keine polymerisierten Peptide im SDS-Gel und im Western Blot nachgewiesen werden. Bei den nachfolgenden Ansätzen konnten in der Western Blot Analyse und im SDS-Gel höhermolekulare Polymere nachgewiesen werden. Diese Ansätze zeigten in vitro einen IL-10 induzierenden Effekt. Aber aus welchem Grund zeigen nur hochpolymerisierte Kopplungen einen IL-10 induzierenden Effekt?

4.2.1 Einfluss von Polymerisierung und Konformation

Einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit von Peptiden haben vor allem Größe und Konformation. So sind Peptide, die kleiner als 4 kDa sind, sogenannte Haptene, nur in Verbindung mit größeren Trägermolekülen in der Lage Antikörper zu induzieren. Auch für das ISU-Peptid von HIV-1 konnte gezeigt werden, dass es als Monomer nicht wirksam ist [49].

Einen großen Einfluss dürfte auch die Konformation der hochpolymerisierten Peptide haben. Es gibt eine Reihe von Daten, die eine spezifische Konformation der Peptide als Voraussetzung für eine immunsuppressive Wirkung sehen und spezifische Raumstrukturen, vor allem Schleifen- oder Loopstrukturen, definiert haben [108].

Defensin-ähnliche Strukturen

Sequenzvergleiche in Datenbanken haben ergeben, dass retrovirale ISU-Peptide, wie bereits erwähnt, Homologien zu PKC-Pseudosubstratsequenzen aufweisen. Ganz ähnliche Sequenzen weisen die sogenannten Defensine auf [108], dargestellt in Tabelle 4.4.

Defensine sind kurze Peptide, zwischen 12 und 50 Aminosäuren lang, und stellen einen wichtigen Bestandteil der angeborenen, humoralen Immunantwort dar. Defensine sind positiv geladen und haben eine gefaltete Struktur. Sie sind die häufigsten Proteine in Neutrophilen und können eine ganze Reihe von parasitären Erregern und sogar umhüllte Viren wie HIV inaktivieren.

PKC-Pseudosubstrat	A	R	K	G	A	L	-	R
HIV-1gp41	A	R	I	L	A	V	E	R
FeLV p15E	N	R	R	G	L	D	I	L
Defensin (HNP-2)	A	C	I	-	A	G	E	R

Tabelle 4.4: Sequenzvergleich von HIV-ISU, p15E-ISU und dem humanen Defensin HNP-2

Sequenzvergleich des humanen neutrophilen Defensins HNP-2 mit den ISU-Domänen von gp41 des HIV-1 und p15E des FeLV. Homologe Aminosäuren sind dunkelgrau, konservative Austausch sind hellgrau unterlegt.

Aufgrund ihrer gefalteten Loop-Struktur stellen die Defensine ein interessantes Modell für die gekoppelten Peptide dar. Monell und Strand zeigten [108], dass bei intramolekularen Kopplungen der ISU-Peptide Defensin-ähnliche Konformationen erreicht werden können. Sowohl das ISU-Peptid, als auch das randomisierte Kontrollpeptid ran5 besitzen sechs freie Aminogruppen und drei freie Carboxylgruppen. Man kann also mit einer hohen Wahrscheinlichkeit nach der Kopplung von intramolekularen Bindungen ausgehen. Bei hochmolekularen Kopplungen mit vielen intra- und intermolekularen Crosslinks ist die Zahl solcher potentiell aktiver Loopstrukturen wesentlich größer. Dies bietet eine Erklärung für eine höhere Induktion von IL-10 durch hochmolekulare Homopolymere. Wenn bei einer Kopplung der Kontrollpeptide zufällig eine aktive Konformation erreicht wird, würde dies ebenfalls zu einer IL-10 Induktion bei PBMCs führen. Das wäre eine Erklärung für die Aktivität einzelner Kontrollkopplungen.

Die Konformation der Polymere nach dem Crosslinking ist schwer beeinflussbar. Bei der Anzahl der vorhandenen reaktiven Gruppen ergeben sich pro Peptid 18 mögliche intramolekulare Kopplungen. Zieht man die Möglichkeit von kombinierten inter- und intramolekularen Kopplungen in Betracht, so ergeben sich unzählige Varianten. Die Wahrscheinlichkeit, bei einer Kopplung hauptsächlich aktive Formen zu erhalten, ist äußerst gering. Ein Ausweg könnte die Kopplung von Peptiden mit geschützten Seitengruppen, oder die rekombinante Herstellung der Peptide in einer aktiven Form darstellen.

Viele Defensine besitzen eine amphipathische Domäne, mit der sie in Zellmembranen eindringen können. Auch für die immunsuppressiven Peptide wird diese Möglichkeit diskutiert [151]. Eine Membraninteraktion aufgrund von hydrophilen Abschnitten bietet eine weitere Erklärung, warum auch gekoppelte Kontrollpeptide in einigen Fällen eine Induktion von IL-10 bewirken können.

Interferon Klasse 1-ähnliche Strukturen

Die säurestabilen Interferone (IFN) der Klasse I bilden eine Familie von 16 Cytokinen. Die 20 kDa großen Proteine bestehen aus 166 Aminosäuren und weisen untereinander eine hohe Sequenzhomologie auf. Alle Interferone besetzen einen speziellen Interferon-Rezeptor und aktivieren so den Jak-STAT-Signalweg. Die Interferone der Klasse 1 besitzen normalerweise eine antivirale Wirkung. Strand und Rugg konnten zeigen [152], dass ein Dekapeptid, abgeleitet aus einer Konsensussequenz von 10 IFN- α Genen, die Proliferation von humanen T-Lymphocyten inhibieren kann. Dieses Peptid weist eine 70 %ige Homologie zu der ISU-Domäne von p15E und eine etwas geringere Homologie zum HIV-ISU-Peptid auf (Tabelle 4.4).

HIV-1gp41	L	Q	A	R	I	L	A	V	E	R	Y	L	K
p15E γ -Retroviren	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K
humanes IFN- α 1	L	D	N	R	R	T	L	M	L	L			
humanes IFN- α 7	L	R	N	R	R	A	L	I	L	L			
IFN- α Konsensus	L	G	N	R	R	A	L	I	L	L			

Tabelle 4.4: Sequenzvergleich von ISU-Peptiden und humanen IFN- α

Sequenzvergleich der ISU-Domänen von gp41 bzw. p15E mit zwei IFN- α Isoformen und einer IFN- α Konsensussequenz. Übereinstimmungen sind dunkelgrau und konservative Austausch hellgrau unterlegt.

Die genaue Wirkungsweise dieser kurzen Peptide ist nicht bekannt. Ebenso unklar ist der Ursprung der Sequenzhomologie. Eine Möglichkeit besteht in der zufälligen Integration dieser IFN-Sequenz ins Genom der Retroviren in der Vergangenheit. Dies könnte zu einem Synergismus dieser suppressiven Peptide mit ausgeschüttetem IFN- α führen. Dadurch könnte die Aktivierung von Immunzellen gehemmt werden. Ebenso könnte das kurze IFN-Fragment in vivo eine antivirale Schutzfunktion durch Assoziation mit freien TM-Proteinen ausüben [152]. Diese Homologie könnte interessante Details über die Wechselwirkung von Viren und Immunsystem enthüllen, und bedeutsam für die Entwicklung antiviraler Strategien sein.

4.2.2 Modulation der intrazellulären Signalwege

Für das Peptid CKS-17 und die ISU-Domäne von HIV-1 wurden eine ganze Reihe von Einflüssen auf wichtige intrazelluläre Signalwege nachgewiesen [42].

Es konnte gezeigt werden, dass CKS-17 und das HIV-1 ISU-Peptid die Aktivierung der Protein Kinase C, sowie den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in Zellen inhibieren [97, 98]. Der PKC-Signalweg ist von grundlegender Bedeutung für die Aktivierung des MAP Kinase-Signalweges, der zur Proliferation von aktivierten Immunzellen notwendig ist. Es gibt auch widersprüchliche Hinweise auf eine PKC-stimulierende Wirkung von ISU-Peptiden, die somit den MAP Kinase-Signalweg aktivieren könnten [151].

Desweiteren führen die ISU-Peptide zu einem Anstieg des cAMP-Levels durch Aktivierung der Adenylatzyklase in PBMCs und der Monocytenzelllinie THP-1 [69, 96, 99]. Der Anstieg von cAMP führt zu einer Hemmung der Produktion von antiviralen Typ I-Cytokinen wie IL-2, IFN- γ oder TNF- α , auf der anderen Seite beeinflusst es die Proliferation von $\text{T}_\text{H}1$ -Zellen [42, 69, 72, 153-155]. Dies könnte zu einer Anergie von T- und auch B-Lymphocyten, einer Unterdrückung der zellvermittelten und humoralen Immunität und damit zu der bei AIDS-Patienten beobachteten Immunsuppression führen [87, 156]. Die Auswirkung eines erhöhten cAMP-Spiegels ist jedoch von zusätzlichen Signalen abhängig. Eine Übersicht der hierbei möglichen Crosstalks zwischen den Signalwegen geben folgende Reviews [42, 69]. Die Adenylatzyklase wird über die sogenannten 7 Transmembranhelix-(7-TMH)-Rezeptoren aktiviert. Diese sind mit heterotrimeren G-Proteinen verbunden. Die G_{aS} -Untereinheit dieser Rezeptorkomplexe aktiviert dann die Adenylatzyklase. Die Aktivierung dieses Signalweges ist ein weiterer Hinweis auf die Existenz spezieller immunregulatorischer Rezeptoren auf T-Helferzellen.

Weitere Studien zeigen einen direkten Einfluss des HIV-1 ISU-Peptids und von CKS-17 auf die MAP Kinasen ERK 1 und 2 [157]. Vor allem CKS-17 aktiviert die beiden Kinasen sowie die MEK-Kinase. Zudem scheint ein negativer Crosstalk dieses Signals mit dem oben angeführten cAMP-PKA-Signalweg zu existieren. Alle diese Wechselwirkungen beeinflussen die Cytokinproduktion von Immunzellen und führen zu einer veränderten Immunantwort.

ISU-Peptide beeinflussen eine ganze Reihe von wichtigen Signalwegen. Diese Einflüsse werden zumeist über Rezeptoren vermittelt. Die richtige Konformation der ISU-Peptide ist daher von eminenter Bedeutung. Die Wirkung der ISU-Peptide ist aufgrund des intrazellulären Crosstalks vom Status der Immunzellen, den vorhandenen Rezeptoren und zusätzlichen Signalen abhängig. Auch scheinbar gegensätzliche Daten können so unter bestimmten Bedingungen richtig sein. Die Frage, ob alle Retroviren denselben Mechanismus zur Modulation der Immunantwort verwenden, ist dadurch sehr schwierig zu beantworten. Es bedarf mit Sicherheit weiterer Untersuchungen, um den Mechanismus zweifelsfrei aufzuklären.

4.3 Cytokinmodulation durch rekombinante retrovirale TM-Proteine

Eine wichtige Alternative zur Verwendung synthetisierter Peptide stellen rekombinante TM-Proteine dar. Diese liegen hierbei mit ihrer immunsuppressiven Domäne in einer nativen und vermutlich aktiven Konformation vor. Die TM-Proteine wurden zudem verwendet, um die immunsuppressiven Eigenschaften von inaktiviertem Virus, den transmembranen Hüllproteinen und den ISU-Peptiden in einer klaren und logischen Beweiskette darstellen zu können. Daher wurde der Einfluss der retroviralen TM-Proteine p15E aus FeLV und gp41 aus HIV-1 auf Produktion von IL-10, sowie die Modulation von 22 weiteren Cytokinen und Chemokinen mithilfe eines Cytokinarrays untersucht.

4.3.1 IL-10 Induktion durch bakteriell exprimiertes rp15E von FeLV

Das rekombinante p15E wurde in einem E.coli-System produziert und anschließend unter nativen Bedingungen mit einer CaM-Säulenaffinitätschromatographie aufgereinigt. Die Aufreinigung von rp15 aus dem Bakterienlysat gelang problemlos, und der Anteil an bakteriellen Nebenbanden war gering. Es trat jedoch ein weiteres, schwerwiegendes Problem auf. Bei der Produktion rekombinanter Proteine in E.coli und anschließender Lyse der Bakterien zur Gewinnung dieser Proteine werden immer Endotoxine freigesetzt. Endotoxine können unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen eingehen und sind nur schwer von den gewünschten Proteinen zu trennen [158, 159].

Das CaM-affinitätschromatographisch gereinigte rp15E induzierte eine starke IL-10 Produktion (Abbildung 3.13). Alle Proben enthielten jedoch große Mengen an bakteriellem Endotoxin. Die Messung des Endotoxingehaltes ergab bei der niedrigsten eingesetzten Proteinkonzentration Werte über 5×10^3 IE/ml. Dieser Wert konnte mithilfe der speziellen EndoTrap-Abreicherung um mehr als das 10-fache verringert werden. Er liegt aber immer noch deutlich über dem Schwellenwert von 0,3 IE/ml. Auch eine spezifische Affinitätschromatographie zur Abreicherung mit EndoTrap-Säulen führte also nur zu einer teilweisen Entfernung des Endotoxins und der auftretende Proteinverlust stellt ein weiteres Problem dar. Dennoch zeigte sich bereits eine wesentlich bessere Korrelation zwischen eingesetzter Proteinmenge und der IL-10 Produktion im IL-10 Assay (Abbildung 3.14). Der Einfluss des Endotoxins auf den verwendeten Assay ist nur indirekt zu bestimmen. Hierzu wurde das Chaperon slyD mit einem vergleichbaren Gehalt an Endotoxin als Kontrolle eingesetzt und zeigte nur eine ganz schwache IL-10 Induktion (Daten nicht gezeigt). Eine schwache Interferenz durch das restliche, vorhandene Endotoxin kann dennoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

Problematik der Endotoxinkontamination

Endotoxine stellen einen integralen Bestandteil der äußeren Zellwand von gram-negativen Bakterien, wie E.coli, dar. Ein Endotoxin aus E.coli ist das sehr komplexe Lipopolysaccharid (LPS). Das LPS besteht grundsätzlich aus einem unpolaren Membrananker und einem hydrophilen Zuckergerüst. Der hydrophobe Membrananker (Lipid A) von LPS besteht aus zwei verknüpften Glucosaminen, die mit drei Phosphatgruppen und sechs langkettigen Fettsäuren verbunden sind. An diesem Grundgerüst sind weitere verzweigte Heteropolysaccharide angeknüpft, die sogenannten O-Antigene. Diese Zuckerketten können sehr groß und vielfältig sein und variieren je nach Bakterienstamm [160, 161].

Besondere Probleme bereitet die Wirkung der Endotoxine auf Immunzellen. Sie induzieren eine ganze Reihe von Immunreaktionen und haben somit einen erheblichen Einfluss auf die hier angewendeten Tests. So konnte in einer Reihe von Publikationen ein IL-10 induzierender Effekt von Endotoxinen, speziell von LPS, auf humane und murine Monocyten, sowie auf Makrophagen nachgewiesen werden [162, 163].

4.3.2 Cytokinmodulation durch bakteriell exprimiertes rgp41 von HIV-1

Auch das rgp41 von HIV-1 wurde in einem E.coli-Expressionssystem produziert. Das verwendete gp41 von Roche Diagnostics sowie das Kontrollprotein slyD wiesen äußerst niedrige Endotoxinwerte auf. Der Unterschied zu den Ergebnissen dieser Arbeit liegt in der Aufreinigung der rekombinanten Proteine. In dieser Arbeit wurde eine native Aufreinigung des rp15E über eine CaM-Säule durchgeführt, während bei Roche ein denaturierendes System mit einer immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) über Ni-NTA-Säulen verwendet wurde. Offensichtlich können Endotoxine mithilfe des denaturierenden Systems wesentlich besser von den rekombinanten Proteinen getrennt werden. In dieser Arbeit wurde bei der Endotoxinabreicherung ein Tris-Puffersystem verwendet, während von Roche ein HEPES-Puffersystem verwendet wurde. Dieses Puffersystem könnte die Abreicherung durch EndoTrap-Säulen zusätzlich verbessern.

Das rekombinante gp41 führte zu einem starken Anstieg der IL-10 Produktion von PBMCs in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge. Dieser Effekt ist auch nicht vom Endotoxin abhängig, denn der Endotoxingehalt liegt deutlich unter einem Schwellenwert von 0,3 IE/ml. Dieser Sachverhalt zeigt auch, dass die IL-10 Induktion durch rp15E vermutlich hauptsächlich durch das Protein verursacht wird und die Interferenz durch Endotoxin gering ist. Andere Daten zeigen eine Erhöhung der Spiegel von IL-10 und IL-6 in der Monocytzelllinie THP-1 [77], sowie einen Anstieg von Transkription und Expression von IL-10 in PBMCs durch In-

kubation mit rekombinantem gp41 [76]. Zudem konnte eine erhöhte Expression von IL-10 und Chemokinrezeptoren in unterschiedlichen Zellarten, wie Astrocyten, Monocyten und Neuronen, durch Inkubation mit rekombinantem, löslichem gp41 nachgewiesen werden [132]. Die Auswertung der Cytokinarrays mit rgp41 und der gekoppelten HIV-1 ISU-Peptide zeigt besonders einen Anstieg von klassischen Typ 2 Cytokinen, wie IL-6 und IL-10. Dagegen zeigte sich die Suppression von klassischen Typ 1 Cytokinen wie IL-2. Die Wirkung von inaktivierten Viren, sowohl von γ -Retroviren als auch von HIV, auf Immunzellen und deren Cytokinproduktion konnten bereits gezeigt werden, eine Übersicht unter [42]. Auch der Einfluss retroviraler TM-Proteine und davon abgeleiteter Peptide, wie CKS-17 und dem ISU-Peptid von HIV-1, auf die Proliferation und Aktivierung von Immunzellen konnte bereits nachgewiesen werden [42, 49, 51, 52, 59, 60, 69]. Ebenso wurden im Serum HIV-infizierter Patienten erhöhte IL-10 Spiegel und eine reduzierte Konzentration von IL-12 nachgewiesen [64, 82, 83, 87]. Man vermutet hierbei einen Zusammenhang mit der Progression zu AIDS [42, 63-65, 67, 87, 164, 165].

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die transmembranen Hüllprotein vieler Retroviren denselben Mechanismus zur Modulation der Immunantwort verwenden. Eine wichtige Rolle scheint die Dysregulation der Immunantwort durch Induktion verschiedener Cytokine wie IL-10 oder IL-6 zu spielen, was zur Hemmung der T_H1-Helferzellen und cytotoxischen T-Lymphocyten führt. Dies hat eine Suppression der wichtigen zellvermittelten Immunität zur Folge, die bei der Bekämpfung von viralen Erregern von essentieller Bedeutung ist. Aber auch eine Hemmung der B-Lymphocyten und damit der humoralen Immunantwort hat vermutlich einen Anteil an der Progression der erworbenen Immunschwächen. Die immunsuppressive Domäne scheint hierbei maßgeblich für die Dysregulation verantwortlich zu sein. Denn die ISU-Peptide haben dieselbe Wirkung auf Immunzellen wie inaktivierte Viren oder die transmembranen Hüllproteine. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Einzelmechanismen und Wechselwirkungen der ISU-Domänen mit den Immunzellen bis ins letzte Detail zu entschlüsseln.

Probleme bei der Verwendung primärer PBMCs

Für alle in vitro Versuche wurden PBMCs aus dem Blut freiwilliger nichtinfizierter Spender isoliert und in den Assays eingesetzt. Alle Assays zeigten in Bezug auf Aktivität und Sensitivität der isolierten PBMCs große Unterschiede. Insbesondere zeigten sich Schwankungen in der Aktivität auch bei demselben Spender bei PBMCs aus verschiedenen Blutproben. Die Zellzusammensetzung der Blutproben scheint ein wichtiger Faktor zu sein. Dabei ist die Zusammensetzung der isolierten PBMCs vom Zustand des Spenders abhängig. Der Immunstatus

des Spenders ist allerdings ein schwer zu kontrollierender Faktor, selbst unbemerkte Infektionen könnten durch Ausschüttung diverser Cytokine einen starken Effekt auf in vitro Assays mit isolierten PBMCs haben. Eine teilweise Abhilfe könnte die Standardisierung der Zellzusammensetzung durch Immundurchflusscytometrie schaffen. So könnte der Anteil der wichtigen, IL-10 produzierenden Monocyten bestimmt und die Messwerte vergleichbarer gemacht werden.

4.3.3 Etablierung eines Drosophila-Expressionssystems

Eine elegante Methode, die Problematik der Endotoxinkontamination zu umgehen, stellt die Expression rekombinanter Proteine in eukaryontischen Systemen dar. Hierzu bieten sich unterschiedliche Systeme an: Expression in Hefen, in Insektenzellen oder in Säugetierzellen. Hefen und Insektenzellen bieten den Vorteil, wesentlich einfachere Kulturbedingungen zu benötigen, sowie höhere Reproduktionsraten und Produktausbeuten zu liefern.

Einen weiteren Vorteil stellt die Möglichkeit zur Expression glykosylierter Proteine dar. Gerade bei hochglykosylierten Proteinen ist die Funktion eng mit den vorhandenen Zuckerketten verknüpft. Ein Nachteil sind die niedrigen Expressionsraten von etwa 1 mg pro Liter Kulturvolumen, die deutlich unter der Ausbeute von Bakterienkulturen liegen.

In dieser Arbeit ist es gelungen, das TM-Protein p15E von PERV-A mithilfe des Drosophila-Expressionssystems rekombinant in Schneider 2-Zellen herzustellen. Die exprimierten Proteine konnten mithilfe einer IMAC über Ni-NTA-Säulen gereinigt und konzentriert werden. Die Ausbeute liegt bei 1 mg rp15E je Liter Kulturüberstand. Mit dem Einsatz entsprechender Volumina und der Verwendung spezieller Kulturflaschen kann das rp15E in Zukunft in großer Menge endotoxinfrei hergestellt werden. Somit besteht die Möglichkeit, den Einfluss von rp15E auf die IL-10 Produktion und Cytokinmodulation ohne Endotoxin-Interferenz zu untersuchen.

4.3.4 Etablierung einer 293-Zelllinie mit rgp41-Oberflächenexpression

Als Alternative zu den in vitro Assays wurde damit begonnen, ein System zu etablieren, dass die Untersuchung der immunsuppressiven Wirkung retroviraler TM-Proteine in einem Mausmodell in vivo ermöglicht.

Es gibt Untersuchungen, die eine immunsuppressive Wirkung von retroviralen TM-Proteinen anhand der Tumorinduktion in Mäusen zeigen konnten. Hierbei wurde die mausspezifische Tumorzelllinie CL 8-1 mit den TM-Proteinen dreier unterschiedlicher Retroviren, dem Moloney murines Leukämievirus (MoMuLV), dem Mason-Pfizer Affenvirus (MPMV) und dem humanen endogenen Retrovirus HERV-H, transfiziert und selektioniert. Diese transgenen Tumorzellen wurden in immunkompetente Mäuse gespritzt, und nach vier Wochen wurde die Bildung von

Tumoren in Abhängigkeit von der Expression des transmembranen Hüllproteins beobachtet [123-125].

Vor diesem Hintergrund wurde damit begonnen, zwei transgene Zelllinie zu etablieren, die das TM-Protein gp41 von HIV-1 mit und ohne rotfluoreszierendem Protein DsRed2 exprimieren. Hierzu wurde die humane Karzinomzelllinie 293 verwendet, da sich die CL 8-1-Zellen nicht selektionieren ließen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Oberflächenexpression von gp41 auf den transgenen Zellen nur bei den nichtfluoreszierenden Zellen nachgewiesen werden. Von den rotfluoreszierenden Zellen konnten bisher keine stabilen Klone selektioniert werden, da diese Zellen ein deutlich geringeres Wachstum aufweisen. Mit der Selektion stabil transfizierter Klone ohne DsRed2 ist die Basis für weitere Untersuchungen zur in vivo Suppression des Immunsystems, zumindest im Mausmodell, gelegt. Die Isolierung rotfluoreszierender Klone schafft eine Reihe von zusätzlichen Möglichkeiten, und kann das Sortieren von Zellklonen über FACS, sowie die Lokalisation injizierter Tumorzellen in vivo erleichtern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Mechanismus der Immunsuppression durch viele Retroviren ist nur in Ansätzen verstanden. Es gibt einige Hinweise auf eine Beteiligung der transmembranen Hüllproteine an der Modulation der Immunzellen. In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, den Einfluss der beiden TM-Proteine rp15E von FeLV und gp41 von HIV-1 bei der Pathogenese der Immunschwächen näher zu charakterisieren. Die immunsuppressive Domäne von gp41 wurde in Form des abgeleiteten ISU-Peptids durch Crosslinking polymerisiert und ebenfalls auf seine modulierende Wirkung hin untersucht.

Mithilfe der Säulenaffinitätschromatographie und einer Affinitätspräzipitation mit magnetischen Beads konnten verschiedene potentielle Bindungspartner des rekombinanten p15E von FeLV isoliert werden. Als putative Bindungspartnern wurden Nucleolin, β -Aktin und GAPDH durch MS/MS-Sequenzierung und mit Western Blot Analysen identifiziert.

Die Untersuchung der IL-10 Induktion durch rp15E und gp41 zeigte bei beiden Proteinen einen Anstieg des IL-10 Titers im Kulturüberstand. Zudem konnte die Aktivierung von Typ 2 Cytokinen mithilfe des Cytokinarrays nachgewiesen werden. Hierzu zählt die Aktivierung von IL-6, IL-10 und der Chemokine GRO und GRO- α . Hingegen wurden die typischen Typ 1 Cytokine wie IL-2, IL-5 und auch IFN- γ und TNF- α in beiden Fällen gehemmt.

Ein schwerwiegendes Problem stellte die Kontamination des rekombinanten p15E mit bakteriellem Endotoxin dar, das mit obigen Assays interferiert. Dieses Problem konnte auch durch eine spezielle Affinitätschromatographie zur Endotoxinanreicherung nicht gelöst werden.

Um dieses Problem in Zukunft zu umgehen, wurde in dieser Arbeit einerseits ein Drosophila-Expressionsystem etabliert, mithilfe dessen das rekombinante p15E des porcinen endogenen Retrovirus-A (PERV-A) in Drosophila Schneider 2-Zellen exprimiert und sezerniert werden konnte. Diese Methode wird in Zukunft die Verwendung rekombinanter TM-Proteine deutlich erleichtern. Andererseits wurde mit der Etablierung eines transgenen Tumormodells begonnen. Hierfür wurden 293-Karzinomzellen mit unterschiedlichen gp41-Plasmidkonstrukten transfiziert und selektioniert. Die Oberflächenexpression von rekombinantem gp41 konnte mithilfe der Immundurchflusscytometrie nachgewiesen werden. Die erhaltenen, stabil transfizierten Zellen können in Zukunft für in vivo Studien im Mausmodell verwendet werden.

Es konnten in dieser Arbeit weitere Beweise für eine Beteiligung der retroviralen TM-Proteine und ihrer ISU-Peptide bei der Pathogenese erhalten werden. Die Isolierung putativer Bindungsproteine und der Nachweis der Cytokinmodulation sprechen für eine Immunsuppression durch die spezifische Aktivierung regulatorischer Cytokine wie IL-10.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen, *Molekulare Virologie*. Vol. 2.Auflage. 2003, Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH. 390-448.
2. Gibbs, A.J., et al., What's in a virus name? *Nature*, 1966. **209**(22): p. 450-4.
3. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus, *Retroviruses*. 1. Edition ed. 1997: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. Baltimore, D., RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, 1970. **226**(252): p. 1209-11.
5. Specke, V. and J. Denner, [Porcine endogenous retroviruses (PERVs) and xenotransplantation. A risk for the recipient and for society?]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2003. **128**(23): p. 1301-6.
6. Denner, J., Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. **862**: p. 75-86.
7. Armstrong, J.A., J.S. Porterfield, and A.T. De Madrid, C-type virus particles in pig kidney cell lines. *J Gen Virol*, 1971. **10**(2): p. 195-8.
8. Breese, S.S., Jr., Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report. *Arch Gesamte Virusforsch*, 1970. **30**(4): p. 401-4.
9. Specke, V., et al., Porcine endogenous retroviruses: in vitro host range and attempts to establish small animal models. *J Gen Virol*, 2001. **82**(Pt 4): p. 837-44.
10. Specke, V., et al., Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates. *Transpl Immunol*, 2002. **9**(2-4): p. 281-8.
11. Specke, V., et al., Productive infection of a mink cell line with porcine endogenous retroviruses (PERVs) but lack of transmission to minks in vivo. *Arch Virol*, 2002. **147**(2): p. 305-19.
12. Specke, V., S. Rubant, and J. Denner, Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology*, 2001. **285**(2): p. 177-80.
13. Denner, J., et al., Porcine endogenous retroviruses (PERVs): adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Ann Transplant*, 2001. **6**(3): p. 25-33.
14. Shnaper, S., et al., The C- and the N-terminal regions of gp41 ectodomain fuse membranes enriched and not enriched with cholesterol, respectively. *J Biol Chem*, 2004.
15. Caffrey, M., Model for the structure of the HIV gp41 ectodomain: insight into the intermolecular interactions of the gp41 loop. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1536**(2-3): p. 116-22.
16. Chan, D.C., et al., Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, 1997. **89**(2): p. 263-73.
17. Tan, K., et al., Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(23): p. 12303-8.
18. Weissenhorn, W., et al., Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, 1997. **387**(6631): p. 426-30.
19. Gallo, S.A., A. Puri, and R. Blumenthal, HIV-1 gp41 six-helix bundle formation occurs rapidly after the engagement of gp120 by CXCR4 in the HIV-1 Env-mediated fusion process. *Biochemistry*, 2001. **40**(41): p. 12231-6.
20. Gallo, S.A., et al., The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1614**(1): p. 36-50.
21. Bosch, B.J., et al., The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol*, 2003. **77**(16): p. 8801-11.

22. Bullough, P.A., et al., Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*, 1994. **371**(6492): p. 37-43.
23. Colman, P.M. and M.C. Lawrence, The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(4): p. 309-19.
24. Fass, D., S.C. Harrison, and P.S. Kim, Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution. *Nat Struct Biol*, 1996. **3**(5): p. 465-9.
25. Suzuki, T., et al., Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors. *J Exp Med*, 1995. **182**(2): p. 477-86.
26. Alcami, A. and S. Efstathiou, Soluble chemokine binding proteins are also encoded by herpesviruses. *Immunol Today*, 2000. **21**(10): p. 526-7.
27. Alcami, A. and U.H. Koszinowski, Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today*, 2000. **21**(9): p. 447-55.
28. Dent, P.B., R.D. Peterson, and R.A. Good, A Defect in Cellular Immunity During the Incubation Period of Passage a Leukemia in C3h Mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1965. **119**: p. 869-71.
29. Peterson, R.D., R. Hendrickson, and R.A. Good, Reduced Antibody Forming Capacity During the Incubation Period of Passage a Leukemia in C3h Mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1963. **114**: p. 517-20.
30. Cotter, S.M., W.D. Hardy, Jr., and M. Essex, Association of feline leukemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat. *J Am Vet Med Assoc*, 1975. **166**(5): p. 449-54.
31. Hebebrand, L.C., L.E. Mathes, and R.G. Olsen, Inhibition of concanavalin A stimulation of feline lymphocytes by inactivated feline leukemia virus. *Cancer Res*, 1977. **37**(12): p. 4532-3.
32. Denner, J., V. Wunderlich, and D. Bierwolf, Suppression of human lymphocyte mitogen response by disrupted primate retroviruses of type C (baboon endogenous virus) and type D (PMFV). *Acta Biol Med Ger*, 1980. **39**(11-12): p. K19-26.
33. Denner, J., V. Wunderlich, and G. Sydow, Suppression of human lymphocyte mitogen response by retroviruses of type D. I. Action of highly purified intact and disrupted virus. *Arch Virol*, 1985. **86**(3-4): p. 177-86.
34. Denner, J., V. Wunderlich, and D. Bierwolf, Suppression of human lymphocyte mitogen response by proteins of the type-D retrovirus PMFV. *Int J Cancer*, 1986. **37**(2): p. 311-6.
35. Orosz, C.G., et al., Retrovirus-mediated immunosuppression. II. FeLV-UV alters in vitro murine T lymphocyte behavior by reversibly impairing lymphokine secretion. *J Immunol*, 1985. **135**(1): p. 583-90.
36. Orosz, C.G., et al., Retrovirus-mediated immunosuppression. I. FeLV-UV and specific FeLV proteins alter T lymphocyte behavior by inducing hyporesponsiveness to lymphokines. *J Immunol*, 1985. **134**(5): p. 3396-403.
37. Oostendorp, R.A., C.J. Meijer, and R.J. Scheper, Immunosuppression by retroviral-envelope-related proteins, and their role in non-retroviral human disease. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1993. **14**(3): p. 189-206.
38. Engelman, R.W., et al., Suppression of gamma interferon production by inactivated feline leukemia virus. *Science*, 1985. **227**(4692): p. 1368-70.
39. Liu, W.T., et al., Remission of leukemia and loss of feline leukemia virus in cats injected with Staphylococcus protein A: association with increased circulating interferon and complement-dependent cytotoxic antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(20): p. 6471-5.

40. Pahwa, S., et al., Influence of the human T-lymphotropic virus/lymphadenopathy-associated virus on functions of human lymphocytes: evidence for immunosuppressive effects and polyclonal B-cell activation by banded viral preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(23): p. 8198-202.
41. Pahwa, S., et al., Stimulatory and inhibitory influences of human immunodeficiency virus on normal B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(23): p. 9124-8.
42. Haraguchi, S., et al., Immunosuppressive retroviral peptides: immunopathological implications for immunosuppressive influences of retroviral infections. *J Leukoc Biol*, 1997. **61**(6): p. 654-66.
43. Mathes, L.E., et al., Immunosuppressive properties of a virion polypeptide, a 15,000-dalton protein, from feline leukemia virus. *Cancer Res*, 1979. **39**(3): p. 950-5.
44. Mathes, L.E., et al., Abrogation of lymphocyte blastogenesis by a feline leukaemia virus protein. *Nature*, 1978. **274**(5672): p. 687-9.
45. Ikeda, H., et al., Chromatographic separation and antigenic analysis of proteins of the oncornaviruses. V. Identification of a new murine viral protein, p15(E). *J Virol*, 1975. **16**(1): p. 53-61.
46. Hebebrand, L.C., et al., Inhibition of human lymphocyte mitogen and antigen response by a 15,000-dalton protein from feline leukemia virus. *Cancer Res*, 1979. **39**(2 Pt 1): p. 443-7.
47. Copelan, E.A., et al., The mechanism of retrovirus suppression of human T cell proliferation in vitro. *J Immunol*, 1983. **131**(4): p. 2017-20.
48. Cianciolo, G.J., R.J. Kipnis, and R. Snyderman, Similarity between p15E of murine and feline leukaemia viruses and p21 of HTLV. *Nature*, 1984. **311**(5986): p. 515.
49. Denner, J., S. Norley, and R. Kurth, The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *Aids*, 1994. **8**(8): p. 1063-72.
50. Patarca, R. and W.A. Haseltine, Similarities among retrovirus proteins. *Nature*, 1984. **312**(5994): p. 496.
51. Cianciolo, G.J., et al., Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to envelope proteins of human and animal retroviruses. *Trans Assoc Am Physicians*, 1985. **98**: p. 30-41.
52. Cianciolo, G.J., et al., Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science*, 1985. **230**(4724): p. 453-5.
53. Ruegg, C.L., C.R. Monell, and M. Strand, Inhibition of lymphoproliferation by a synthetic peptide with sequence identity to gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 1989. **63**(8): p. 3257-60.
54. Harrell, R.A., et al., Suppression of the respiratory burst of human monocytes by a synthetic peptide homologous to envelope proteins of human and animal retroviruses. *J Immunol*, 1986. **136**(10): p. 3517-20.
55. Harris, D.T., et al., Inhibition of human natural killer cell activity by a synthetic peptide homologous to a conserved region in the retroviral protein, p15E. *J Immunol*, 1987. **138**(3): p. 889-94.
56. Ogasawara, M., et al., Inhibition of murine cytotoxic T lymphocyte activity by a synthetic retroviral peptide and abrogation of this activity by IL. *J Immunol*, 1990. **145**(2): p. 456-62.
57. Collette, Y., et al., Similarity between Nef of primate lentiviruses and p15E of murine and feline leukaemia viruses. *Aids*, 1996. **10**(4): p. 441-2.
58. Ruegg, C.L. and M. Strand, A synthetic peptide with sequence identity to the transmembrane protein GP41 of HIV-1 inhibits distinct lymphocyte activation pathways dependent on protein kinase C and intracellular calcium influx. *Cell Immunol*, 1991. **137**(1): p. 1-13.

59. Wang, H., P. Nishanian, and J.L. Fahey, Characterization of immune suppression by a synthetic HIV gp41 peptide. *Cell Immunol*, 1995. **161**(2): p. 236-43.
60. Denner, J., et al., The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1996. **12**(5): p. 442-50.
61. Wain-Hobson, S., et al., Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell*, 1985. **40**(1): p. 9-17.
62. Faxvaag, A., T. Espevik, and A. Dalen, 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*, 1995. **102**(3): p. 487-95.
63. Clerici, M. and G.M. Shearer, The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today*, 1994. **15**(12): p. 575-81.
64. Clerici, M., et al., Type 1 and type 2 cytokines in HIV infection -- a possible role in apoptosis and disease progression. *Ann Med*, 1997. **29**(3): p. 185-8.
65. Clerici, M. and G.M. Shearer, Cellular immunity and a type 1 cytokine profile in protection against HIV infection and progression to AIDS. *Res Immunol*, 1994. **145**(8-9): p. 635-41; discussion 641-3.
66. Naito, T., et al., Immune abnormalities induced by human endogenous retroviral peptides: with reference to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol*, 2003. **23**(5): p. 371-6.
67. Kedzierska, K. and S.M. Crowe, Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemother*, 2001. **12**(3): p. 133-50.
68. Kedzierska, K., et al., The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol*, 2003. **13**(1): p. 39-56.
69. Haraguchi, S., R.A. Good, and N.K. Day, Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns. *Immunol Today*, 1995. **16**(12): p. 595-603.
70. Kleinerman, E.S., et al., A synthetic peptide homologous to the envelope proteins of retroviruses inhibits monocyte-mediated killing by inactivating interleukin 1. *J Immunol*, 1987. **139**(7): p. 2329-37.
71. Haraguchi, S., et al., A synthetic peptide homologous to retroviral envelope protein down-regulates TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression. *J Leukoc Biol*, 1992. **52**(4): p. 469-72.
72. Haraguchi, S., et al., Differential modulation of Th1- and Th2-related cytokine mRNA expression by a synthetic peptide homologous to a conserved domain within retroviral envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(8): p. 3611-5.
73. Trinchieri, G., Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*, 1994. **84**(12): p. 4008-27.
74. Hall, S.S., IL-12 holds promise against cancer, glimmer of AIDS hope. *Science*, 1994. **263**(5154): p. 1685-6.
75. Hall, S.S., IL-12 at the crossroads. *Science*, 1995. **268**(5216): p. 1432-4.
76. Koutsonikolis, A., et al., HIV-1 recombinant gp41 induces IL-10 expression and production in peripheral blood monocytes but not in T-lymphocytes. *Immunol Lett*, 1997. **55**(2): p. 109-13.
77. Takeshita, S., et al., Induction of IL-6 and IL-10 production by recombinant HIV-1 envelope glycoprotein 41 (gp41) in the THP-1 human monocytic cell line. *Cell Immunol*, 1995. **165**(2): p. 234-42.
78. de Waal Malefyt, R., et al., Interleukin-10. *Curr Opin Immunol*, 1992. **4**(3): p. 314-20.

79. Howard, M., et al., Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol*, 1992. **12** (4): p. 239-47.
80. Moore, K.W., et al., Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*, 1993. **11**: p. 165-90.
81. Moore, K.W., et al., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 683-765.
82. Clerici, M., et al., Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest*, 1994. **93** (2): p. 768-75.
83. Denis, M. and E. Ghadirian, Dysregulation of interleukin 8, interleukin 10, and interleukin 12 release by alveolar macrophages from HIV type 1-infected subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994. **10**(12): p. 1619-27.
84. Maggi, E., et al., Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science*, 1994. **265**(5169): p. 244-8.
85. Masood, R., et al., IL-10 inhibits HIV-1 replication and is induced by tat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **202**(1): p. 374-83.
86. Borghi, P., et al., Induction of interleukin-10 by human immunodeficiency virus type 1 and its gp120 protein in human monocytes/macrophages. *J Virol*, 1995. **69**(2): p. 1284-7.
87. Barcellini, W., et al., TH1 and TH2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients. *Aids*, 1994. **8**(6): p. 757-62.
88. Graziosi, C., et al., Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. *Science*, 1994. **265**(5169): p. 248-52.
89. Graziosi, C., G. Pantaleo, and A.S. Fauci, Comparative analysis of constitutive cytokine expression in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals. *Res Immunol*, 1994. **145**(8-9): p. 602-5; discussion 605-7.
90. Weiss, A. and D.R. Littman, Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 263-74.
91. Chan, A.C., D.M. Desai, and A. Weiss, The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 555-92.
92. Krauss, G., *Biochemistry of signal transduction and regulation*. second edition ed. 2001, Weinheim: Wiley-VCH.
93. Kammer, G.M., The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response. *Immunol Today*, 1988. **9**(7-8): p. 222-9.
94. Feng, G.J., et al., Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol*, 1999. **163**(12): p. 6403-12.
95. Cianciolo, G.J., H. Bogerd, and R. Snyderman, Human retrovirus-related synthetic peptides inhibit T lymphocyte proliferation. *Immunol Lett*, 1988. **19**(1): p. 7-13.
96. Haraguchi, S., et al., Induction of intracellular cAMP by a synthetic retroviral envelope peptide: a possible mechanism of immunopathogenesis in retroviral infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(12): p. 5568-71.
97. Ruegg, C.L. and M. Strand, Inhibition of protein kinase C and anti-CD3-induced Ca²⁺ influx in Jurkat T cells by a synthetic peptide with sequence identity to HIV-1 gp41. *J Immunol*, 1990. **144**(10): p. 3928-35.
98. Gottlieb, R.A., et al., Inhibition of protein kinase C by a peptide conjugate homologous to a domain of the retroviral protein p15E. *J Immunol*, 1990. **145**(8): p. 2566-70.

99. Hofmann, B., et al., Human immunodeficiency virus proteins induce the inhibitory cAMP/protein kinase A pathway in normal lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(14): p. 6676-80.
100. Hofmann, B., et al., Restoration of T-cell function in HIV infection by reduction of intracellular cAMP levels with adenosine analogues. *Aids*, 1993. **7**(5): p. 659-64.
101. Novak, T.J. and E.V. Rothenberg, cAMP inhibits induction of interleukin 2 but not of interleukin 4 in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(23): p. 9353-7.
102. Denner, J., et al., The immunosuppressive (ISU-)peptide of HIV-1: Binding to lymphocyte surface proteins. *J Cancer Research and Clinical Oncology*, 1993. **119**(Suppl 1): p. 28.
103. Denner, J.V., T. Norley, S. Hoffman, A. and Kurth, R., The immunosuppressive (ISU-) peptide of HIV-1: Binding proteins on lymphocytes detected by different methods. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 1995. **supplement 1 to volume 121**.
104. Henderson, L.A. and M.N. Qureshi, A peptide inhibitor of human immunodeficiency virus infection binds to novel human cell surface polypeptides. *J Biol Chem*, 1993. **268** (20): p. 15291-7.
105. Kizaki, T., et al., Specific association of retroviral envelope protein, p15E, with human cell surfaces. *Immunol Lett*, 1991. **28**(1): p. 11-8.
106. Qureshi, N.M., et al., Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides. *Aids*, 1990. **4**(6): p. 553-8.
107. Chen, Y., et al., The C domain of HIV-1 gp41 binds the putative cellular receptor protein P62. *AIDS*, 1999. **13**(9): p. 1021-1024.
108. Monell, C.R. and M. Strand, Structural and functional similarities between synthetic HIV gp41 peptides and defensins. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994. **71**(3): p. 315-24.
109. Wyborski, D.L., et al., An Escherichia coli expression vector that allows recovery of proteins with native N-termini from purified calmodulin-binding peptide fusions. *Protein Expr Purif*, 1999. **16**(1): p. 1-10.
110. Wang, W.C., K. Zinn, and P.J. Bjorkman, Expression and structural studies of fasciclin I, an insect cell adhesion molecule. *J Biol Chem*, 1993. **268**(2): p. 1448-55.
111. Johansen, H., et al., Regulated expression at high copy number allows production of a growth-inhibitory oncogene product in Drosophila Schneider cells. *Genes Dev*, 1989. **3** (6): p. 882-9.
112. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987. **155**: p. 335-50.
113. Saiki, R.K., et al., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
114. Saiki, R.K., et al., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
115. Fiebig, U., et al., Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation? *Virology*, 2003. **307**(2): p. 406-13.
116. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
117. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.

118. Schagger, H. and G. von Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 1987. **166**(2): p. 368-79.
119. Schneider, I., Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol*, 1972. **27**(2): p. 353-65.
120. Vogel, T., Untersuchungen zur Funktion der immunsuppressiven Domäne von HIV-1, in Diplomarbeit. 1991, J. W. Goethe- Universität: Frankfurt/Main. p. 77.
121. Zang-Gandor, M., Improved transfection of CHO cells using endotoxin-free plasmid DNA, in *QIAGEN News*. 1997. p. 1.
122. Weber, M., et al., Short technical reports. Effects of lipopolysaccharide on transfection efficiency in eukaryotic cells. *Biotechniques*, 1995. **19**(6): p. 930-40.
123. Mangeney, M. and T. Heidmann, Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(25): p. 14920-5.
124. Mangeney, M., et al., The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol*, 2001. **82**(Pt 10): p. 2515-8.
125. Blaise, S., M. Mangeney, and T. Heidmann, The envelope of Mason-Pfizer monkey virus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol*, 2001. **82**(Pt 7): p. 1597-600.
126. Ebenbichler, C., et al., Cell surface proteins binding to recombinant soluble HIV-1 and HIV-2 transmembrane proteins. *AIDS*, 1993. **7**(4): p. 489-495.
127. Chen, Y.H., et al., HIV-1 gp41 contains two sites for interaction with several proteins on the helper T-lymphoid cell line, H9. *Aids*, 1992. **6**(6): p. 533-9.
128. Denner, J., et al., The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte proliferation, inhibits HIV-1 replication and binds to lymphocyte receptor proteins. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1995. **11**, **Sup. 1**: p. 113.
129. Chen, Y., et al., 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*, 1999. **69**(2): p. 253-257.
130. Yu, T., et al., Human interferon-beta inhibits binding of HIV-1 gp41 to lymphocyte and monocyte cells and binds the potential receptor protein P50 for HIV-1 gp41. *Immunol Lett*, 2000. **73**(1): p. 19-22.
131. Chen, Y.H., H. Stoiber, and M.P. Dierich, Increased levels of antibodies against interferon-alpha in HIV-1 positive individuals may be explained by a common immunological epitope on the human interferon-alpha and HIV-1 gp41. *Immunol Lett*, 1997. **55**(1): p. 15-8.
132. Speth, C., et al., HIV-1 envelope protein gp41 modulates expression of interleukin-10 and chemokine receptors on monocytes, astrocytes and neurones. *Aids*, 2000. **14**(6): p. 629-36.
133. Ebenbichler, C.F., et al., Human immunodeficiency virus type 1 activates the classical pathway of complement by direct C1 binding through specific sites in the transmembrane glycoprotein gp41. *J Exp Med*, 1991. **174**(6): p. 1417-24.
134. Thielens, N.M., et al., Further characterization of the interaction between the C1q subcomponent of human C1 and the transmembrane envelope glycoprotein gp41 of HIV-1. *J Immunol*, 1993. **151**(11): p. 6583-92.
135. Srivastava, M. and H.B. Pollard, Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *Faseb J*, 1999. **13**(14): p. 1911-22.
136. Pfeifle, J. and F.A. Anderer, Isolation and characterization of phosphoprotein pp 105 from simian virus 40-transformed mouse fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1983. **762**(1): p. 86-93.

137. Jordan, P., et al., Major cell surface-located protein substrates of an ecto-protein kinase are homologs of known nuclear proteins. *Biochemistry*, 1994. **33**(49): p. 14696-706.
138. Semenkovich, C.F., et al., A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin. *Biochemistry*, 1990. **29**(41): p. 9708-13.
139. de Verdugo, U.R., et al., Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses. *J Virol*, 1995. **69**(11): p. 6751-7.
140. Krantz, S., et al., Purification and partial amino acid sequencing of a fructosyllysine-specific binding protein from cell membranes of the monocyte-like cell line U937. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1266**(1): p. 109-12.
141. Said, E.A., et al., The anti-HIV cytokine midkine binds the cell surface-expressed nucleolin as a low affinity receptor. *J Biol Chem*, 2002. **277**(40): p. 37492-502.
142. Nisole, S., et al., The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 binds the C-terminal end of nucleolin and prevents anchorage of virus particles in the plasma membrane of target cells. *J Biol Chem*, 2002. **277**(23): p. 20877-86.
143. Ueno, T., et al., Nucleolin and the packaging signal, psi, promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol Immunol*, 2004. **48**(2): p. 111-8.
144. Hovanessian, A.G., et al., The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res*, 2000. **261**(2): p. 312-28.
145. Sirover, M.A., Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *J Cell Biochem*, 1997. **66**(2): p. 133-40.
146. Tisdale, E.J., Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase Ciota /lambda and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway. *J Biol Chem*, 2002. **277**(5): p. 3334-41.
147. Glaser, P.E. and R.W. Gross, Rapid plasmenylethanolamine-selective fusion of membrane bilayers catalyzed by an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: discrimination between glycolytic and fusogenic roles of individual isoforms. *Biochemistry*, 1995. **34**(38): p. 12193-203.
148. Orr, J.W. and A.C. Newton, Intra-peptide regulation of protein kinase C. *J Biol Chem*, 1994. **269**(11): p. 8383-7.
149. Kemp, B.E., R.B. Pearson, and C.M. House, Pseudosubstrate-based peptide inhibitors. *Methods Enzymol*, 1991. **201**: p. 287-304.
150. Pearson, R.B., et al., Proteolytic cleavage sites in smooth muscle myosin-light-chain kinase and their relation to structural and regulatory domains. *Eur J Biochem*, 1991. **200**(3): p. 723-30.
151. Luangwedchakarn, V., et al., A retroviral-derived peptide phosphorylates protein kinase D/protein kinase Cmu involving phospholipase C and protein kinase C. *Peptides*, 2003. **24**(5): p. 631-7.
152. Ruegg, C.L. and M. Strand, Identification of a decapeptide region of human interferon-alpha with antiproliferative activity and homology to an immunosuppressive sequence of the retroviral transmembrane protein P15E. *J Interferon Res*, 1990. **10**(6): p. 621-6.
153. Haraguchi, S., et al., Transcriptional down-regulation of tumor necrosis factor-alpha gene expression by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope protein. *J Immunol*, 1993. **151**(5): p. 2733-41.

154. Haraguchi, S., et al., Suppression of human interferon-gamma production by a 17 amino acid peptide homologous to the transmembrane envelope protein of retroviruses: evidence for a primary role played by monocytes. *Cell Immunol*, 1992. **141**(2): p. 388-97.
155. Ogasawara, M., et al., Human IFN-gamma production is inhibited by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope protein. *J Immunol*, 1988. **141**(2): p. 614-9.
156. Meroni, L., et al., Evidence for type 2 cytokine production and lymphocyte activation in the early phases of HIV-1 infection. *Aids*, 1996. **10**(1): p. 23-30.
157. Takahashi, A., et al., A retroviral-derived immunosuppressive peptide activates mitogen-activated protein kinases. *J Immunol*, 2001. **166**(11): p. 6771-5.
158. Petsch, D., et al., Membrane adsorbers for selective removal of bacterial endotoxin. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997. **693**(1): p. 79-91.
159. Petsch, D. and F.B. Anspach, Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol*, 2000. **76**(2-3): p. 97-119.
160. Rietschel, E.T., et al., The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology*, 1993. **187**(3-5): p. 169-90.
161. Rietschel, E.T., et al., Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J*, 1994. **8**(2): p. 217-25.
162. Knolle, P., et al., Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol*, 1995. **22**(2): p. 226-9.
163. Gao, B. and M.F. Tsan, Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **317**(4): p. 1149-54.
164. Denner, J., How does HIV induce AIDS? The virus protein hypothesis. *J Hum Virol*, 2000. **3**(2): p. 81-2.
165. Sher, A., et al., Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev*, 1992. **127**: p. 183-204.

7 DANKSAGUNG