

Interaktion des transmembranen Hüllproteins von HIV-1
mit humanen Immunzellen

Diplomarbeit
der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

vorgelegt von

Lauck Michael

Tübingen, September 2008

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Tübingen, den 15. September 2008

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Reinhard Kurth

Robert Koch-Institut, Berlin

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Andreas Peschel

Eberhard Karls Universität Tübingen

Für meine Eltern, Hermann und Monika

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1	<u>Retroviren</u>	1
1.1.1	<u>Einteilung der Retroviren</u>	2
1.1.2	<u>Morphologie retroviraler Partikel am Beispiel von HIV-1</u>	3
1.1.3	<u>Genomstruktur</u>	4
1.1.4	<u>Retrovirale Proteine</u>	5
1.1.5	<u>Retroviraler Replikationszyklus am Beispiel von HIV-1</u>	9
1.2	<u>Überblick des humanen Immunsystems</u>	10
1.3	<u>Retrovirus-induzierte Immunsuppression</u>	13
1.3.1	<u>Die immunsuppressive (Isu-) Domäne</u>	13
1.3.2	<u>Zytokinmodulation durch TM-Proteine und Isu-Peptide</u>	17
1.4	<u>Modulation der Genexpression durch das HIV-1 Isu-Peptid</u>	18
1.5	<u>Zielsetzung</u>	21
2.	<u>Material und Methoden</u>	22
2.1	<u>Material</u>	22
2.1.1	<u>Antikörper & Fluorochrome</u>	22
2.1.2	<u>Chemikalien</u>	22
2.1.3	<u>Geräte</u>	24
2.1.4	<u>Peptide</u>	25
2.1.5	<u>Primer, Sonden & siRNAs</u>	26
2.1.6	<u>Puffer</u>	27
2.1.7	<u>Verbrauchsmaterialien</u>	29
2.2	<u>Methoden</u>	30
2.2.1	<u>Molekularbiologische Methoden</u>	30
2.2.1.1	<u>One-Step Real Time Quantitative PCR</u>	30
2.2.1.2	<u>Proteinaufreinigung</u>	32
2.2.1.3	<u>Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen</u>	33
2.2.1.4	<u>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</u>	33
2.2.1.5	<u>RNA-Interferenz</u>	34

2.2.2	<u>Proteinbiochemische Methoden</u>	35
2.2.2.1	Kopplung von Peptiden	35
2.2.2.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	36
2.2.2.3	Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.2.2.4	Silberfärbung	37
2.2.2.5	Crosslinking von Peptiden	37
2.2.3	<u>Immunologische Methoden</u>	38
2.2.3.1	Durchflusszytometrie	38
2.2.3.2	Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	39
2.2.3.3	Immunfluoreszenz	41
2.2.3.4	Western Blot	42
2.2.4	<u>Zellkulturtechniken</u>	43
2.2.4.1	Kultivierung von C8166-Zellen	43
2.2.4.2	Kultivierung von humanen PBMCs	43
2.2.4.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	43
2.2.4.4	Isolation humaner PBMCs aus Vollblut	44
3.	<u>Ergebnisse</u>	45
3.1	<u>Analyse der Bindung des Isu-Peptides an humanen Immunzellen</u>	45
3.1.1	Immunfluoreszenzanalyse der Bindung des Isu-Peptides an C8166 Zellen	45
3.1.2	Quantifizierung der Bindung des Isu-Peptides an PBMCs mittels Durchflusszytometrie	47
3.1.3	Quantifizierung der Bindung des Konstruktes $\Delta E1$ NHR-4H an PBMCs mittels Durchflusszytometrie	51
3.2	Gewinnung und Charakterisierung von Peptid-Polymeren	53
3.3	Einfluss der HIV Isu- und HIV Ran-Polymere auf die IL-10 Sekretion und die IL-10 Genexpression humaner PBMCs <i>in vitro</i>	54
3.4	Einfluss der HIV Isu- und HIV Ran-Polymere auf die Genexpression von MMP-1 und TREM-1 in humanen PBMCs	59
3.5	Einfluss der HIV Isu- und HIV Ran-Polymere auf die Sekretion von MMP-1 und TREM-1 durch humane PBMCs <i>in vitro</i>	67
3.6	Einfluss des IL-10 <i>gene silencing</i> auf die Expression von MMP-1 und TREM-1	69

4.	<u>Diskussion</u>	73
4.1	<u>Analyse der Bindung des Isu-Peptides an humanen Immunzellen</u>	73
4.2	Gewinnung und Charakterisierung von Peptid-Homopolymeren.....	76
4.3	Einfluss der HIV Isu- und HIV Ran-Homopolymere auf die IL-10 Sekretion und die IL-10 Genexpression humaner PBMCs <i>in vitro</i>	78
4.4	Einfluss der HIV Isu- und HIV Ran-Polymere auf die Genexpression von MMP-1 und TREM-1 in humanen PBMCs.....	81
4.5	Einfluss der HIV Isu- und HIV Ran-Polymere auf die Sekretion von MMP-1 und TREM-1 durch humane PBMCs <i>in vitro</i>	87
4.6	Einfluss des IL-10 <i>gene silencing</i> auf die Expression von MMP-1 und TREM-1.....	89
5.	<u>Zusammenfassung</u>	91
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	92

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	<u>Morphologie des HIV-1 Viruspartikels</u>	3
Abbildung 1.2:	<u>RNA-Genom eines infektiösen HIV-1 Partikels</u>	4
Abbildung 1.4:	<u>Aufbau retroviraler TM-Proteine am Beispiel von HIV-1</u>	8
Abbildung 1.5:	Schematische Darstellung der Konformationsänderungen der HIV-1 Hüllproteine	8
Abbildung 1.6:	<u>Replikationszyklus von HIV-1</u>	10
Abbildung 1.7:	<u>Sequenzvergleich der immunsuppressiven (Isu-) Domänen</u>	14
Abbildung 1.8:	Sequenzhomologien zwischen den Isu-Domänen verschiedener Retroviren und unterschiedlichen Interferonen	16
Abbildung 1.9:	Darstellung der 25 am stärksten hochregulierten Gene nach Inkubation von PBMCs mit dem HIV-1 Isu-Peptid	19
Abbildung 2.1:	<u>IL-10 Gensequenz mit Bindestellen für die IL-10 siRNA</u>	27
Abbildung 2.2:	<u>Modell für die RNA-Interferenz in Säugerzellen</u>	34
Abbildung 3.1:	Bindung des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides an die Oberfläche von C8166-Zellen	46
Abbildung 3.2:	Vergleich der Bindung des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides an die Oberfläche von PBMCs bei Verwendung verschiedener Methoden	48
Abbildung 3.3:	Quantifizierung der Bindung des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides an die Oberfläche von PBMCs mittels Durchflusszytometrie	50
Abbildung 3.4:	Kinetik der Bindung des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides an die Oberfläche von PBMCs mittels Durchflusszytometrie über einen Zeitraum von 17h	51
Abbildung 3.5:	Schematische Darstellung der gp41-Ektodomäne und der daraus abgeleiteten Deletionsmutante Δ NHR-4K	52
Abbildung 3.6:	<u>Silbengel zur Überprüfung der Expression von GST</u>	52
Abbildung 3.7:	Quantifizierung der Bindung des Konstruktes Δ E1 NHR-4K bzw. von GST an die Oberfläche von humanen PBMCs mittels Durchflusszytometrie	53
Abbildung 3.8:	Exemplarische Darstellung der Peptid-Homopolymere mittels SDS-PAGE und Western Blot	54
Abbildung 3.9:	Analyse der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Peptid bzw. dem randomisierten HIV Isu-Peptid mittels ELISA	55
Abbildung 3.10:	Analyse der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV Isu-Homopolymer über einen Zeitraum von 24h mittels ELISA	56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.11:	Kinetik der IL-10 Transkription humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV Isu-Homopolymer über 24h mittels real time PCR	58
Abbildung 3.12:	Untersuchung des Auftretens von Primer Interferenzen beim gleichzeitigen Verwenden von 2 Primerpaaren	60
Abbildung 3.13:	Quantifizierung der MMP-1 Transkription humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Peptid bzw. dem randomisierten HIV Isu-Peptid mittels real time PCR	61
Abbildung 3.14:	Quantifizierung der TREM-1 Transkription humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Peptid bzw. dem randomisierten HIV Isu-Peptid mittels real time PCR	62
Abbildung 3.15:	Kinetik der MMP-1 Transkription humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV Isu-Homopolymer über einen Zeitraum von 24h mittels real time PCR	63
Abbildung 3.16:	Kinetik der TREM-1 Transkription humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV Isu-Homopolymer über einen Zeitraum von 24h mittels real time PCR	65
Abbildung 3.17:	Kinetik der MMP-1 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV Isu-Homopolymer über einen Zeitraum von 24h mittels ELISA	68
Abbildung 3.18:	Kinetik der TREM-1 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV Isu-Homopolymer über einen Zeitraum von 24h mittels ELISA	69
Abbildung 3.19:	Einfluss der RNA-Interferenz auf die Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV Isu-Homopolymer mittels ELISA	70
Abbildung 3.20:	Einfluss der RNA-Interferenz auf die MMP-1 und TREM-1 Transkription humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV Isu-Homopolymer mittels real time PCR	71
Abbildung 4.1:	Vorläuferpeptid von GP1 und GP2 des Ebola-Virus	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	<u>Sequenz und Herkunft der verwendeten Peptid-Polymer</u>	26
Tabelle 3.1:	<u>Vergleich der Inkubationsbedingungen von Methode 1 und Methode 2</u>	47
Tabelle 3.2:	<u>Vergleich der Inkubationsmethoden von Methode 1-4</u>	49

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin, <i>antigen-presenting cell</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
dest.	destilliert
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid hydrochlorid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HERV-K	Humanes endogenes Retrovirus K
HEX	Hexachlorfluorescein
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Isu	immunsuppressiv
kDa	Kilodalton
LP	Lysepuffer
LPS	Lipopolysaccharid
μ	mikro
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MMP-1	Matrix Metalloprotease 1

Abkürzungsverzeichnis

MuLV	Murines Leukämie-Virus
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
n.g.	nicht getestet
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PERV	Porcines endogenes Retrovirus
rpm	<i>rotations / rounds per minute</i>
RPMI	<i>Rosswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
RTQ-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
s	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TM	Transmembranes Hüllprotein
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TREM-1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
o/N	über Nacht
v/v	Volumenanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
w/v	Gewichtsanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
WB	WesternBlot
z.B.	zum Beispiel
ZS	Ziegenserum

Einbuchstabencodes für Aminosäuren

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

Einbuchstabencodes für Nukleinsäuren

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

1. Einleitung

Während in den vergangenen Jahrhunderten große Pandemien hauptsächlich durch bakterielle Infektionen wie die Pest (*Y.pestis*), Cholera (*V.cholerae*) oder Tuberkulose (*M.tuberculosis*) ausgelöst wurden, haben in den letzten Jahrzehnten Virusinfektionen einen immer größer werdenden Stellenwert erlangt. Im Jahre 2007 waren 33 Millionen Menschen weltweit mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert, 2,7 Millionen Menschen wurden neu infiziert und 2 Millionen Menschen starben an den Folgen einer HIV-Infektion (UNAIDS report on the global AIDS epidemic, 2008). Das zur Gattung der Lentiviren gehörende Retrovirus HIV kann im infizierten Wirt eine Immunschwäche (AIDS) auslösen, die den Ausgangspunkt für opportunistische Sekundärinfektionen stellt. Aufgrund des Unvermögens des Immunsystems, diese Sekundärerkrankungen zu bekämpfen, kommt es bei fehlender Medikation zum Tode des Patienten. Obwohl das HI-Virus sehr gut untersucht ist und der Verlauf der AIDS-Erkrankung klinisch charakterisiert werden konnte, ist immer noch unklar, wie HIV die Immunschwäche auslöst. Es konnte gezeigt werden, dass während einer HIV-1 Infektion die Progression zu AIDS mit der Viruslast korreliert (Fauci et al. 1993), daher kann der direkte Einfluss eines viralen Proteins bei der AIDS-Erkrankung nicht ausgeschlossen werden (Denner 2000). Das transmembrane Hüllprotein gp41, sowie ein synthetisches Peptid, welches einer hochkonservierten Domäne in der N-terminalen-Helix-Region des gp41 entspricht (Isu-Peptid), waren in der Lage, *in vitro* die Proliferation humaner Immunzellen zu hemmen und deren Zytokinproduktion zu verändern (Denner 2001). Daher besteht die Möglichkeit, dass das transmembrane Hüllprotein von HIV eine Rolle bei der Immunpathogenese der AIDS-Erkrankung spielt.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde untersucht, in wie weit das Isu-Peptid in der Lage ist, an humanen Immunzellen zu binden bzw. deren Genexpression zu modulieren.

1.1 Retroviren

Vor fast 100 Jahren wurden Retroviren zum ersten Mal beschrieben. 1908 konnten Ellermann und Bang zeigen, dass die Mäuseleukämie durch zellfreie Ultrafiltrate auf andere Mäuse übertragbar ist. 3 Jahre später gelang Peyton Rous der Nachweis, dass mit zellfreien, durch einen Bakterien-undurchlässigen Filter extrahierten Überständen aus Hühnersarkomen, eine Tumorerkrankung auf gesunde Hühner übertragen werden konnte (Rous, 1911). Damit unterschied sich dieser virale Erreger als filtrierbares Agens von Bakterien. Dieses erste beschriebene Tumorstoff wurde später nach seinem Entdecker *Rous-Sarkom-Virus* benannt, der im Jahre 1966 für diese Entdeckung mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde. Einen weiteren Hinweis auf das pathogene Potential der

Retroviren und ihre Assoziation mit Tumorerkrankungen wurde 1936 von John J. Bittner mit seinen Untersuchungen zur Entstehung von malignen Milchdrüsenerkrankungen der Maus, verursacht durch das mouse mammary tumor virus (MMTV), erbracht. MMTV zeichnete sich durch einen bis dahin unbekanntem Übertragungsmodus aus, indem es nicht nur als exogenes Partikel übertragen werden konnte (horizontale Transmission), sondern auch eine Übertragung als endogener Bestandteil des Genoms von Keimzellen auf die Folgegeneration möglich war (vertikale Transmission). Die ersten humanpathogenen Retroviren wurden zu Beginn der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts beschrieben. Es handelte sich dabei um das humane T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV, Poiesz et al. 1980, Kalyanaraman et al. 1982) und das humane Immundefizienzvirus (HIV, Gallo et al. 1983, Barre-Sinoussi et al. 1983).

Das gemeinsame, elementare Merkmal aller Retroviren liegt im Vorhandensein der Reversen Transkriptase. Mit diesem Enzym sind Retroviren in der Lage, das Dogma des genetischen Informationsflusses von der DNA über die RNA zum Protein zu durchbrechen. Durch die Reverse Transkriptase, die 1970 erstmals von Temin und Baltimore beschrieben wurde (Baltimore 1970, Temin et al. 1970) kann das retrovirale einzelsträngige RNA-Genom in doppelsträngige DNA überführt werden.

1.1.1 Einteilung der Retroviren

Die taxonomische Einteilung der Retroviren basiert auf Unterschieden in der Morphologie, der Genomsequenz, der Wirtsspezifität, den antigenen Eigenschaften und in der Pathogenese. Zur Zeit werden sieben Genera unterschieden: *Alpharetroviren*, *Betaretroviren*, *Gammaretroviren*, *Deltaretroviren*, *Epsilonretroviren*, *Spurmaviren* und *Lentiviren* (Regenmortel et al. 1998). Retroviren infizieren hauptsächlich Wirbeltiere und können dort Krankheiten verschiedener Symptomatik auslösen, wie z.B. Immundefizienzen (Virelizier 1975), Tumorerkrankungen (Geissler und Theile 1983) oder neurologische Effekte (Andrews und Gardner 1974). Zusätzlich zu der Unterteilung in die oben genannten Genera kann man bei den Retroviren zwischen exogenen und endogenen Viren unterscheiden. Endogene Retroviren sind, im Gegensatz zu den exogenen Vertretern, ein integraler Bestandteil des Genoms ihrer Wirtsspezies. Daher sind diese Viren neben der horizontalen Transmission von Organismus zu Organismus auch zu einer vertikalen Übertragung über die Keimbahn von einer Generation zur Nächsten im Stande (Coffin 1997). Alle untersuchten Vertebraten besitzen endogene Retroviren als Bestandteil ihres Erbgutes (Herniou et al. 1998), diese können bis zu acht Prozent des menschlichen Genoms ausmachen (Mallet, Prudhomme 2004). Während die meisten endogenen Retroviren keine offensichtliche Funktion ausüben und als parasitäre DNA bezeichnet werden (Doolittle, Sapienza 1980; Orgel, Crick 1980), spielen andere endogene Retroviren eine wichtige Rolle in der Biologie

des Wirtes. So wurde die Regulation von Transkriptions- und Translationsvorgängen (Medstrand et al. 2001), die Kontrolle von Zellfusionsprozessen während der plazentalen Entwicklung (Blond et al: 2000, Rote et al. 2004, Heidmann et al. 2007) und die Vermittlung von Resistenzen gegenüber exogenen retroviralen Infektionen (Ponferrada et al. 2003) beschrieben. Das humane Immundefizienz-Virus zählt zu den exogenen Retroviren, während es sich dem porzinen endogenen Retrovirus (PERV) um Vertreter der endogenen Retroviren handelt. Das feline Leukämievirus (FeLV) liegt sowohl exogen, als auch endogen vor (Hoover et al. 1991).

Exogene Retroviren sind zur Expression aller retroviraler Proteine und somit auch zur Partikelfreisetzung im Stande. Dies resultiert in der Möglichkeit der horizontalen Transmission von Organismus zu Organismus. Bis auf wenige Ausnahmen, wie z.B. das humane endogene Retrovirus-K (HERV-K), besitzen endogene Retroviren nicht die Fähigkeit, Partikel zu bilden (Boller et al. 2008). Daher sind diese Viren nur zu einer vertikalen Übertragung über die Keimbahn von einer Generation zur Nächsten im Stande (Coffin 1997).

1.1.2 Morphologie retroviraler Partikel am Beispiel von HIV-1

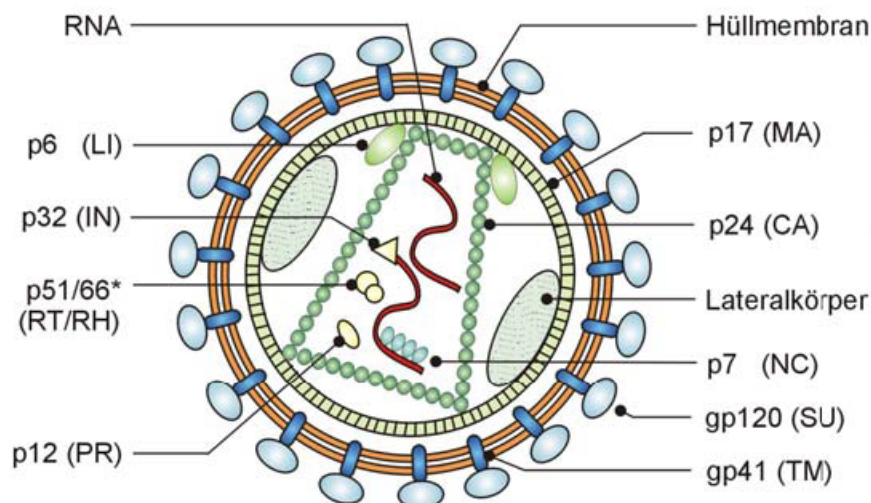


Abbildung 1.1: Morphologie des HIV-1 Viruspartikels (Gelderblom et al. 1987)

Hüllmembran mit externen (SU; gp 120) und transmembranen (TM; gp41) Glykoproteinen, konisches Kapsid aus Kapsidproteinen (CA; p24), zwei virale RNA-Genome im Komplex mit Nukleokapsidproteinen (NC; p7), Matrixprotein (MA; p17), Linkprotein (LI; p6), Lateralkörperchen (Funktion bislang unbekannt) und die Enzyme Reverse Transkriptase/ RNase H (RT/RH; p66*/ p51), Integrase (IN; p32) und Protease (PR; p12). * Heterodimer

Retroviren sind umhüllte RNA-Viren mit einem Durchmesser von 80-120 nm. Die Viren werden von einer Lipidmembran umschlossen, die im Zuge der Virusknospung von der

Zytoplasmamembran der Wirtszelle erworben wurde. Die Virusmembran ist mit viralen Glykoproteinen assoziiert, welche sich aus zwei Polypeptiden zusammensetzen. Es handelt sich dabei um das Oberflächenhüllprotein gp120 (surface glycoprotein, SU) und das transmembrane Hüllprotein gp41 (TM), die sich jeweils zu trimeren Komplexen zusammenlagern und so mit Rezeptoren und Korezeptoren auf Zielzellen interagieren und die Infektion initiieren können. Die Innenseite der viralen Hüllmembran wird von einer Schicht von Matrixproteinen (MA, p17) ausgekleidet, die über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Hüllmembran verbunden sind. Das virale Genom, bestehend aus zwei ungespleissten RNA-Molekülen, ist mit Nukleokapsidproteinen (NC, p7) komplexiert und wird von einem konischen Kapsid, bestehend aus Kapsidproteinen (CA, p24), umgeben. Das Linkprotein (LI, p6) stellt eine Verbindung zwischen dem Kapsid und der Virushülle dar. Die Enzyme Integrase (IN), Protease (PR) und reverse Transkriptase (RT) finden sich in allen Retroviren wieder und sind essentieller Bestandteil des Replikationszykluses dieser Viren. Die RT kommt mit 50 – 100 Kopien im retroviralen Partikel vor und besitzt 4 distinkte katalytische Domänen. Die Abschnitte für die DNA-abhängige- bzw. die RNA-abhängige-DNA-Polymerisation sowie die Helikase-Funktion befinden sich alle in einer Domäne, die RNase H (RH), die für die Hydrolyse der RNA im RNA-DNA-Heteroduplex zuständig ist, besitzt eine eigene Domäne. Das Lateralkörperchen, dessen Funktion noch immer unbekannt ist, sowie das p6 Protein sind keine für alle Retroviren typische Proteine, sondern kommen nur bei komplexen Retroviren wie HIV vor

1.1.3 Genomstruktur

Das retrovirale Genom besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen mit einer durchschnittlichen Länge von 10.000 bp. Die RNA weist eine positive Polarität auf und besitzt mit der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA. Infektiöse Retroviren weisen in ihrem Genom mindestens drei Regionen auf, die für die viralen Proteine kodieren. Sie werden in 5'-3'-Richtung als *gag/pol* und *env* bezeichnet.

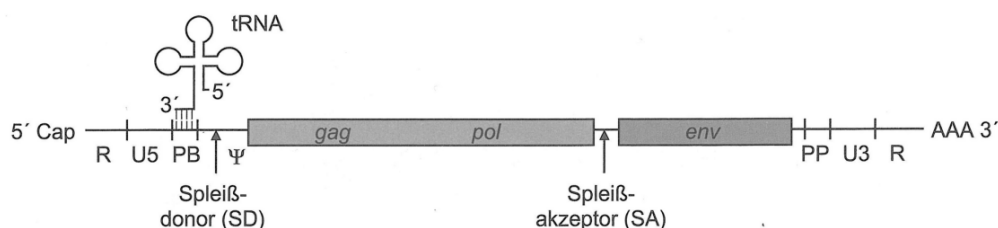


Abbildung 1.2: RNA-Genom eines infektiösen HIV-1 Partikels (Modrow und Falke, 2003)

R=redundant, U=unique, PB=Primerbindungsstelle, SD=Spleißdonor, SA=Spleißakzeptor, PP=Polypurintrakt

Das Gen für das gruppenspezifische Antigen (*gag*) kodiert für das Matrixprotein, das Kapsidprotein, das Nukleokapsidprotein und, sofern vorhanden, für das Link-Protein. Durch den *pol*-Bereich werden die Enzyme reverse Transkriptase, Integrase und virale Protease verschlüsselt. Die Oberflächenhüllproteine werden durch den *env*-Genbereich kodiert. Am 5'- und am 3'-Ende der RNA befinden sich identische R-Regionen („redundant“), die Signale für den Start bzw. für die Beendigung der Transkription tragen. Auf den 5'-R-Bereich folgt die U5-Region („unique“), die invertierte Sequenzen enthält, welche für die Integration des Provirus in das Zellgenom wichtig sind. In direkter Nachbarschaft findet sich die Primerbindungsstelle (PBS), deren Sequenz komplementär zum 3'-Ende einer spezifischen tRNA der Wirtszelle ist. Auf die PBS-Region folgt die sogenannte leader-Region, die eine Spleißdonorstelle (SD) sowie eine ψ -Stelle enthält. Die Spleißdonorstelle wird für die Produktion aller gespleißten mRNA-Moleküle verwendet, wohingegen die ψ -Stelle ein Verpackungssignal darstellt, mittels dessen sich die RNA-Genome bei der Morphogenese an die Nucleokapsidabschnitte der sich bildenden Viruspartikel anlagern können. Am Ende der Region, die für *pol* kodiert, befindet sich die Spleißakzeptorstelle (SA). Der aus mindestens 9 Basen bestehende Polypurintrakt (PP) dient als Primer für die Synthese des zweiten DNA-Stranges und befindet sich *downstream* der kodierenden Region für das *env* Gen. Der U3-Bereich weist mit Verstärker- (enhancer) und Promoterbereichen wichtige Motive für die Regulation der viralen Transkription auf. In der proviralen DNA treten die U3- sowie die U5-Region aufgrund des besonderen Mechanismus der reversen Transkription an beiden Enden auf und bilden mit den R-Regionen die identischen langen terminalen Wiederholungssequenzen (long terminal repeats, LTR).

1.1.4 Retrovirale Proteine

Gruppenspezifische Antigene (*gag*-Genprodukte)

Von der integrierten proviralen DNA werden Vollängen-mRNA Transkripte synthetisiert. Da das *gag*-Gen mit dem *pol*-Gen überlappt, werden von diesen Transkripten sowohl die Gag- als auch Gag/ Pol-Vorläuferproteine translatiert (Jacks et al. 1988). Die Gag-Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein (Polyprotein) synthetisiert und im Laufe der Virusmorphogenese durch die virale Protease in die einzelnen Strukturproteine MA, CA, NC und LI gespalten. Von den Gag-Proteine werden unterschiedliche Funktionen ausgeübt, die zur Infektiosität der Viren beitragen: Durch Interaktionen der Matrix- und Kapsidproteine im Gag-Polyprotein sammeln sich diese an der Zelloberfläche an (*assembly*), schnüren sich in Form von Lipid-Proteinpartikeln mit Membrananteilen ab und sind somit für die Freisetzung

der Viruspartikel essentiell. Das Matrixprotein p17 fördert den Transport der viralen DNA in den Zellkern der infizierten Zelle und ermöglicht die Infektion ruhender Zellen; eine Fähigkeit, die HIV von anderen Retroviren unterscheidet (Valentin et al. 1990; von Schwedler et al. 1994).

Enzyme (pol-Genprodukte)

Die pol-Genprodukte kodieren für die Integrase, die Protease und die reverse Transkriptase (RT). Voraussetzung für die Synthese des Gag/Pol-Fusionsproteins ist die Verschiebung des ribosomalen Leserasters während der Translation. Dies erfolgt in ungefähr fünf Prozent aller Fälle aufgrund einer Uridin-reichen Region in der mRNA. Aufgrund dieser homologen Basenabfolge kommt es zur Bildung einer Haarnadelstruktur, was zum Einen die Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese verlangsamt und zum Anderen zu einer fehlerhaften Erkennung der Codongrenzen durch die Ribosomen führt. Im Falle von HIV resultiert dies in einer Verschiebung des Leserasters um +1 und zum Überlesen des Stopcodons für die gag-Genprodukte. Die Gag/Pol-Fusionsproteine werden ebenfalls am aminoterminalen Ende myristyliert und sind über diese Modifikation mit der Zytoplasmamembran assoziiert. Während der Virus-Maturation schneidet sich die virale Protease autokatalytisch aus dem Gag/Pol-Polyprotein aus um anschließend die Gag- und Pol-Vorläuferproteine in funktionale Proteine zu prozessieren.

Die Integrase besitzt Endonuklease- und Ligaseaktivität. Durch die Verkürzung der 3'-Enden der proviralen doppelsträngigen DNA und durch die Erzeugung von *sticky ends* in der Ziel-DNA katalysiert die Integrase die Integration der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle.

Die reverse Transkriptase erfüllt während der Virusreplikation verschiedene Aufgaben. Neben der Funktion als RNA- bzw. DNA-abhängige DNA-Polymerase zeichnet sich das Enzym auch durch RNase-Aktivität aus. Zusätzlich katalysiert die RT die Umschreibung der viralen RNA in provirale DNA und baut nach der Synthese der DNA/RNA-Hybriddoppelstränge den RNA-Anteil katalytisch ab. Da die reverse Transkriptase keine *proof-reading* Funktion besitzt, werden falsche Basen mit einer Wahrscheinlichkeit von $1:10^3$ – $1:10^4$ in den neusynthetisierten DNA-Strang eingebaut. Diese hohe Sequenzvariabilität resultiert in einer ausgeprägten strukturellen Variabilität, was dem Virus bei immunologischem Druck durch den Wirt einen Vorteil beschert.

Virale Hüllproteine (env-Genprodukte)

Die in die Hüllmembran der Retroviren eingelagerten Glykoproteine sind verantwortlich für die Bindung der Viren an die Rezeptoren der Wirtszelle und für die Fusion der viralen mit der zellulären Membran (D'Souza 2000). HIV-1 besitzt zwei Glykoproteine, die in einem nicht-kovalent verbundenen Komplex aus einem externen (SU, gp120) und einem transmembranen Protein (TM, gp41) vorliegen (Chan et al. 1997, Hunter 1997). Die Synthese von gp 120 und gp41 erfolgt über das Vorläuferprotein gp160, welches durch Translation einer einfach gespleißten mRNA am rauen endoplasmatischen Retikulum entsteht, an dem auch die Glykosylierung stattfindet (Stein et al. 1990). Anschließend erfolgt die Zusammenlagerung zu trimeren Komplexen sowie die Spaltung des gp160 in die reifen Proteine gp120 und gp41 durch zelluläre, mit dem Golgi-Apparat assoziierte, Proteasen (Risser et al. 1989, Weissman et al. 1988). Vergleicht man die gp120 Aminosäuresequenzen verschiedener HIV-Isolate, so findet man fünf hypervariable Bereiche, die als V1-V5 bezeichnet werden (Arthos et al. 1989). Unter diesen, oberflächenexponierten, immunogenen Regionen, ist V3 hauptsächlich für die Bildung gp120-spezifischer Antikörper zuständig (Hwang et al. 1991, Evans et al. 2001). Zusammen mit der hohen Fehlerrate der RT tragen diese variablen Bereiche zur kontinuierlichen Bildung von neuen gp120 Varianten bei, die der neutralisierenden Wirkung der Immunglobuline (IG) entgehen können. Neben diesen variablen Bereichen gibt es auch fünf konstante Domänen, die als C1-C5 bezeichnet werden (Arthos et al. 1989). Die konstanten Regionen sind meist für die Interaktion mit zellulären Rezeptoren verantwortlich, wodurch sich die Konservierung in diesem Bereich erklären lässt. Die C4-Domäne des gp120 ist für die Bindung an den CD4-Rezeptor (cluster of differentiation 4) der Zielzelle verantwortlich (Robey et al. 1995), zusätzlich konnte aber auch für die C2- und C3-Domäne eine Rolle bei der Interaktion mit CD4 aufgezeigt werden (Olshevsky et al. 1990).

Das über eine hydrophobe Sequenz in der Membran verankerte transmembrane Hüllprotein lässt sich in eine Ekto- und eine Endodomäne unterteilen und ist im Gegensatz zu gp120 in seiner Aminosäurezusammensetzung hochkonserviert (Bénil et al. 2001). Die gp41 Ektodomäne setzt sich aus dem N-terminalen Fusionspeptid, der N-terminalen Helixregion (NHR) mit immunsuppressiver (Isu-) Domäne (Denner et al. 1994), der über eine Disulfidbrücke stabilisierten Cysteinschleife (C-C-loop), einer C-terminalen Helixregion (CHR) und einem kurzen C-terminalen membranproximalen Bereich zusammen. Das hydrophobe Fusionspeptid dringt während der Infektion in die Membran der Wirtszelle ein, destabilisiert diese und erleichtert dadurch die Fusion der viralen Membran mit der Wirtszellmembran (Brasseur et al. 1988). Die gp41 Endodomäne besteht aus hochkonservierten und zum Teil hydrophoben Bereichen, darunter die sogenannten

lentivirus lytic peptides (LLP) (Chen et al. 2001). Funktionell ist die Endodomäne an der Membranassoziation und der Multimerisierung der gp41 Moleküle beteiligt (Lee et al. 2000).

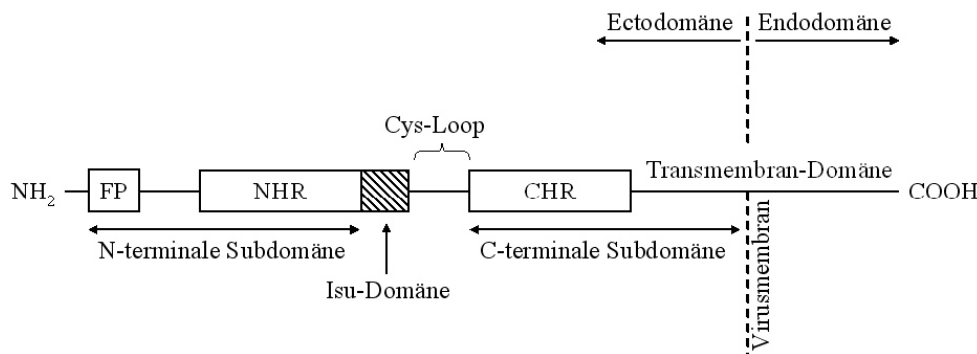


Abbildung 1.4: Aufbau retroviraler TM-Proteine am Beispiel von HIV-1 (Shapner et al. 2001)

Schematische Struktur des TM-Proteins von HIV-1. FP=Fusionspeptid, NHR=N-terminale Helixregion, CHR= C-terminale Helixregion, Isu-Domäne=Immunsuppressive Domäne

Die Bindung der C4-Domäne des gp120 an den CD4-Rezeptor (Montagnier et al. 1984, Weiss et al. 1984), der hauptsächlich auf der Oberfläche von T-Helferzellen, Makrophagen und Monozyten exprimiert wird, induziert eine Konformationsänderung in der Proteinstruktur des gp120, die es der V3-Region erlaubt, mit weiteren Rezeptoren auf der Zielzelle zu interagieren. Es handelt sich dabei um die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 (Sodroski et al. 1996, Landau et al. 1996), die auf T-Zellen bzw. auf T-Zellen und Makrophagen exprimiert werden. Diese Interaktion resultiert in einer weiteren strukturellen Umlagerung, diesmal im gp41, und führt zur Exposition und dem darauf folgenden Eindringen des Fusionspeptides in die Wirtszellmembran. Durch hydrophobe Wechselwirkungen der NHR- mit den CHR-Region kommt es zu Konformationsänderungen in der Proteinstruktur des gp41 und zur Verringerung der Abstände zwischen der viralen und der zellulären Membran, das sogenannte Sechs-Helix-Bündel (six-helix-bundle) hat sich gebildet (Chan et al. 1997, Weissenhorn et al. 1997, Sacket et al. 2003).

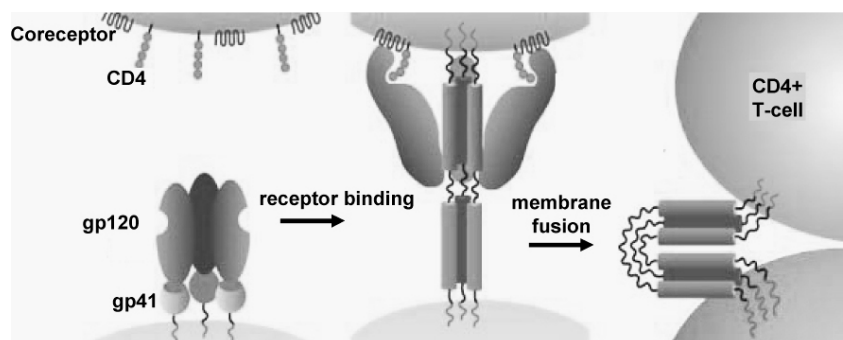


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Konformationsänderungen der HIV-1 Hüllproteine (Bosch et al. 2000)

1.1.5 Retroviraler Replikationszyklus am Beispiel von HIV-1

Der retrovirale Replikationszyklus beginnt mit der Bindung des Oberflächenhüllproteins gp120 an die spezifischen Rezeptoren auf der Wirtszellmembran. In der Folge kommt es zur Verschmelzung von viraler und zellulärer Membran sowie der Freisetzung des viralen Kapsids in das Cytoplasma der Zielzelle. Die Partikelstruktur des Kapsids bleibt dabei erhalten, die Konformation ändert sich jedoch. Nach der Aufnahme von freien Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) aus dem Cytoplasma in das Kapsid beginnt die reverse Transkriptase mit der Umschreibung der beiden identischen Positiv-Strang-RNA-Moleküle in doppelsträngige DNA. Das provirale Genom wird anschließend im Komplex mit der Kapsid-Komponente MA und dem viralen akzessorischen Protein Vpr in den Zellkern transportiert. Dieser kurzzeitig auftretende Komplex wird als Präintegrationskomplex bezeichnet. Im Zellkern wird das doppelsträngige, provirale DNA-Molekül durch die virale Integrase in das Wirtsgenom integriert (Allan *et al.*, 1987). Je nach Stelle der Integration können zelluläre Gene zerstört werden oder unter der Kontrolle des viralen 5'LTR-Promotors aktiviert werden. Dieser Prozess ist einer der Mechanismen, über den Retroviren Tumore induzieren können (Robinson *et al.*, 1985; Sourvinos *et al.*, 2000). Nach Aktivierung einer infizierten Zelle erfolgt die Bindung der zellulären Transkriptionsfaktoren NF κ B (*nuclear factor B*) und SP1 an die *cis*-regulatorischen Elemente der LTR der integrierten proviralen DNA, wodurch die Transkription der viralen Gene durch die zelluläre RNA Polymerase II ausgelöst wird (Rosen *et al.*, 1985). In der Folge findet eine Transkription auf niedrigem Niveau (basale Transkription) statt. Durch die Bindung der viralen Tat-Proteine an das TAR-Element (*transactivation response*) am 5'-Ende der naszierenden viralen RNA wird eine transaktivierende Wirkung auf die Promotorregion der LTR vermittelt, wodurch die RNA-Produktion verstärkt wird (bis zu 100x höher) (Jones und Peterlin, 1994). In dieser frühen Infektionsphase findet man daher überwiegend mehrfach gespleißte mRNAs, die für die Proteine Tat und Rev kodieren. Die Akkumulation des Tat- und Rev-Proteins ist die Voraussetzung für den Übergang von der frühen zur späten Phase des Infektionszyklus. Bei dem Rev-Protein handelt es sich um RNA-Bindeproteine, das eine spezifische Sequenz in der env-mRNA erkennt, die als sogenanntes *Rev-Response-Element* bezeichnet wird (RRE). Rev aktiviert dadurch den nukleären Export aller RNAs, die eine RRE-Region enthalten und verhindert dadurch die Transkription von einfach oder mehrfach gespleißten mRNAs. Durch diesen Mechanismus kann einerseits sichergestellt werden, dass genügend Strukturproteine und Enzyme synthetisiert werden und dass *full-length* genomische RNA für die Verpackung in die viralen Partikel zur Verfügung steht. Die Env-Proteine werden über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. Haben sich genügend Gag- und Gag/Pol-Proteine an der Zellmembran angehäuft (*assembly*),

knospt das unreife Virion unter Mitnahme des zellulären Membrananteils aus (*budding*). Jetzt beginnt der Reifungsprozess der Virionen. Die Proteasedomäne spaltet sich in einem autokatalytischen Schritt aus den Gag/ Pol-Vorläuferproteinen heraus, um die Gag und Gag/ Pol-Vorläuferproteine anschließend in die Matrix-, Capsid-, Nukleocapsid-, Link- Proteine sowie die Reverse Transkriptase und die Integrase zu prozessieren. Erst bei diesen Maturationsprozessen erlangen die Virionen ihre Infektiosität (Kaplan *et al.*, 1994a).

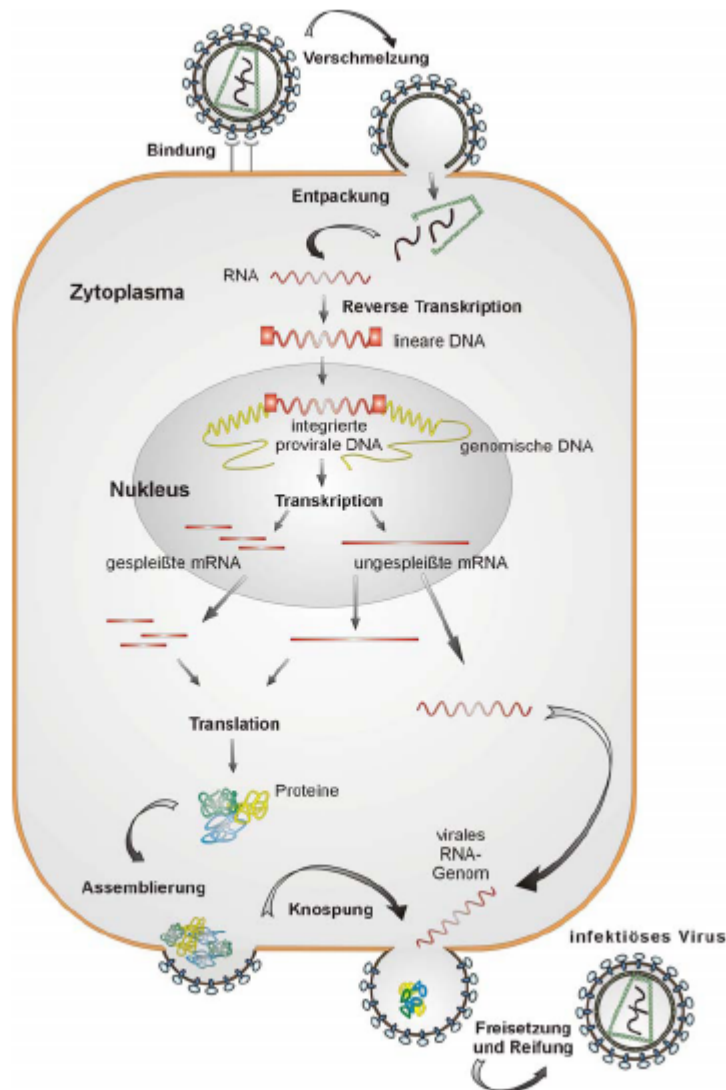


Abbildung 1.6: Replikationszyklus von HIV-1 (Somogyi 2003)

1.2 Überblick über das humane Immunsystem

Als Immunität bezeichnet man die Fähigkeit eines höheren Organismus, sich gegen eine Infektion zur Wehr zu setzen. Der menschliche Körper wird jeden Tag mit Viren, Bakterien und anderen Krankheitserregern konfrontiert, denen er über Atemluft, Nahrung, Wasser oder zwischenmenschlichen Kontakt ausgesetzt ist. Zusätzlich müssen entartete, körpereigene Zellen erkannt und entfernt werden, bevor diese dem Organismus schaden können. Dabei muss das Immunsystem stets eine Balance zwischen akkurater Abwehr und der Toleranz von Antigenen wahren. Im Laufe der Evolution haben sich zwei miteinander kooperierende Abwehrsysteme gebildet, die als unspezifische, nichtadaptive sowie als spezifische, adaptive Abwehr bezeichnet werden.

Die nichtadaptive, auch als angeboren bezeichnete Immunantwort, zeichnet sich dadurch aus, dass ihre Abwehrmechanismen sofort bzw. innerhalb weniger Stunden wirksam werden. Neben physikalischen Barrieren wie Haut oder Schleimhaut werden auch chemische Barrieren, die sich z.B. aus einem niedrigem pH oder der Sekretion von Lysozymen zusammensetzen können, wirksam. Auf zellulärer Ebene greift das nichtadaptive Immunsystem auf phagozytische Zellen (Neutrophile, Monozyten, Makrophagen), eosinophile Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie auf lösliche Faktoren wie das Komplementsystem, Zytokine oder Chemokine zurück. Auf die Funktion von Zytokinen wird im Abschnitt 1.4.2 näher eingegangen.

Die adaptive Immunantwort reagiert im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem erst im Laufe mehrerer Tage gegen ein eingedrungenes Pathogen, dafür aber mit einer höheren Spezifität. Die volle Ausprägung bedarf im Schnitt zwischen 10-14 Tagen, weshalb Mikroorganismen mit einer kurzen Inkubationszeit bei Erstkontakt die Möglichkeit haben, den Wirt ernsthaft zu schädigen, insofern sie in der Lage sind, der unspezifischen Immunantwort zu entkommen. Als Effektorzellen für die Antigen-spezifischen Abwehrreaktionen dienen T- und B-Lymphozyten (T- und B-Zellen). B-Zellen sind Teil der humoralen Immunität, die sich durch die Produktion und Sezernierung von Antikörpern in das Blutplasma sowie die Lymphflüssigkeit auszeichnet. Nach ihrer Entwicklung aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks wandern die B-Lymphozyten in die Milz, wo sie reifen. Nach der Reifung bewegen sie sich in die Lymphfollikel der Lymphknoten. Bindet dort eine T-Helferzelle an den B-Zell-Rezeptor und aktiviert dadurch den B-Lymphozyten, erfolgt die Differenzierung zur Gedächtnis- oder zur Antikörper produzierenden Plasmazelle. Plasmazellen wandern zum großen Teil ins Knochenmark und bilden dort verschiedene Immunglobuline (Ig). Die Bindung durch Antikörper inaktiviert Mikroorganismen oder Toxine durch Verhinderung der Wechselwirkung mit Oberflächenrezeptoren. Desweiteren sorgt die Bindung für eine Markierung der Pathogene zur Zerstörung, entweder durch Erleichterung der Phagozytose

oder durch Aktivierung des Komplementsystems. Neben der humoralen spielt auch die zellvermittelte Immunität eine entscheidende Rolle. Sie beruht auf der direkten Wirkung von T-Zellen, die entweder infizierte Zellen selbstständig eliminieren oder andere Zellen des Immunsystems aktivieren. Die Reifung dieser Zellen erfolgt im Thymus. Grundsätzlich werden $CD4^+$ T-Helferzellen (T_H -Zellen) und $CD8^+$ cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) unterschieden. T-Helferzellen sind hauptsächlich für die Antigenpräsentation zuständig und binden mit dem auf ihrer Oberfläche exprimierten CD4-Molekül an MHC-Klasse II Antigenen (*major histocompatibility complex II*), wohingegen die CTLs über ihren CD8-Rezeptor an MHC-Klasse I Antigenen binden und die präsentierende Zelle lysieren. MHC-Klasse I Moleküle befinden sich auf sämtlichen kernhaltigen Zellen, also nahezu auf allen Körperzellen. Da über die MHC-Klasse I Peptide präsentiert werden, die zuvor aktiv in der Zelle synthetisiert wurden, ist eine infizierte Zelle, in der sich ein replizierender Mikroorganismus befindet, in der Lage, durch die Präsentation von Peptiden des jeweiligen Mikroorganismus, das Immunsystem auf eine intrazelluläre Infektion aufmerksam zu machen. CTLs sind in der Lage, die infizierten Zellen durch gezielte Sekretion von Granzymen oder Perforinen direkt zu lysieren bzw. durch Bindung an den Fas-Liganden die Zelle in die Apoptose zu überführen. Somit wird die Ausbreitung einer Infektion durch Zerstörung der Infektionsherde eingeschränkt. Moleküle des Typs MHC-Klasse II finden sich auf Zellen, die mit T_H -Zellen interagieren können, also auf B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen. Daher präsentieren diese Zellen nur Peptide, die durch Spaltung von phagozytierten Proteinen entstanden sind. Nach dem Kontakt von naiven T-Helfer-Zellen (T_H0) mit Antigenen reifen diese zu T-Helfer-Zellen des Typs 1 (T_H1) oder des Typs 2 (T_H2) heran und sind in der Lage durch Sezernierung von Zytokinen die Aktivität des Immunsystems zu regulieren. $TH1$ -Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Unterstützung der zellulären pro-inflammatorischen Immunantwort indem sie die Reifung von zytotoxischen T-Zellen durch die Freisetzung der Zytokine Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-12 (IL-12) fördern. Desweiteren sind T_H1 -Zellen durch die Freisetzung der oben genannten Zytokine in der Lage, die Aktivität von Makrophagen und dendritischen Zellen zu erhöhen. In der Anwesenheit von Interleukin-4 (IL-4) differenzieren T_H0 -Zellen zu T_H2 -Zellen, was in einer Verstärkung der humoralen Immunantwort resultiert. Die Sekretion der Interleukine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 induziert die Reifung von B-Zellen und fördert dadurch die Produktion von Antikörpern. Die T_H1 - und T_H2 -Antwort stehen in einem direkten, gegensätzlichen Verhältnis zueinander: Die verstärkte Produktion von T_H1 -Zytokinen wie IFN- γ sorgt zum Einen für Verstärkung der $TH1$ Antwort, zum Anderen inhibiert sie die Synthese von IL-4 und IL-5 durch T_H2 -Zellen und damit die T_H2 -Antwort an sich. Auf der anderen Seite sorgt die Freisetzung von IL-10 durch T_H2 -Zellen für eine Inhibierung der Freisetzung von T_H1 -Zytokinen, was in einer Einschränkung bzw. Beendigung der pro-

inflammatorischen T_H1 -Antwort resultiert. Die immunsuppressiven Effekte von IL-10 werden in Abschnitt 1.4.2 genauer betrachtet.

1.3 Retrovirus induzierte Immunsuppression

Retrovirale Infektionen zeichnen sich, ebenso wie einige andere virale Infektionen, durch eine Suppression der zellulären sowie der humoralen Immunantwort aus. Diese Immunsuppression konnte unter anderem für die Gattung der Lentiviren, insbesondere bei HIV-1, HIV-2 sowie bei einigen Simianen-Immundefizienz-Viren (SIV), für die Gattung der β -Retroviren bei dem Simianen Retrovirus (SRV), für die Gattung der γ -Retroviren bei dem feline- und dem murinen-Leukämie-Virus (FeLV, MuLV) sowie dem Koala-Retrovirus (KoRV) und für die Gattung der δ -Retroviren bei dem humanen T-Zell-lymphotropen Virus (HTLV) nachgewiesen werden (Denner 1987, 1998, Canfield et al. 1988, Hanger et al. 2000). Aus diesem Grund ist der Mechanismus, mit dem diese Retroviren fatale Immundefizienzen auslösen, von großer Bedeutung. Es ist bisher unklar, ob jedes Retrovirus seine eigene Strategie verfolgt oder ob es einen allgemeinen Mechanismus gibt, der von Virus zu Virus spezifisch angewendet wird. Während einer HIV-1 Infektion korreliert die Viruslast im Patienten mit der Progression zu AIDS (Fauci et al. 1993), daher kann der direkte Einfluss eines viralen Proteins bei der AIDS-Erkrankung nicht ausgeschlossen werden (Denner 2000). Zum Einen konnte gezeigt werden, dass inaktivierte retrovirale Partikel in der Lage sind, die Proliferation von immunkompetenten Zellen *in vitro* zu inhibieren. Dies wurde für HIV-1 (Denner et al. 1996, Pahwa et al. 1985), für γ Retroviren wie FeLV (Olsen et al. 1977), das endogene Retrovirus der Paviane (BaEV) (Denner et al. 1980, Weislow et al. 1981) oder das porcine endogene Retrovirus (PERV) (Denner et al. 1998, Tacke et al. 2000) und für δ -Retroviren (Denner et al. 1980, 1985) gezeigt. Zum Anderen konnten alle transmembranen Hüllproteine (TM), die bisher *in vitro* getestet wurden, eine immunsuppressive Wirkung aufweisen (Denner et al. 1986, Mathes et al. 1975). Die immunsuppressive Wirkung des TM konnte auch *in vivo* bestätigt werden. Die Expression des TMs eines γ -Retrovirus (Mangenev et al. 1998) oder eines humanen endogenen Retrovirus HERV-H (Mangenev et al. 2001) in einer Maus-Tumor-Zelllinie, die normalerweise nur in immungeschwächten Mäusen wächst, führte zur Verhinderung der Tumor-Abstoßung in immunkompetenten Mäusen aufgrund einer lokalen Immunsuppression.

Neben dem transmembranen Hüllprotein können noch weitere virale Proteine eine Rolle bei der durch Retroviren induzierten Unterdrückung des Immunsystems spielen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl die Inkubation von gp120 als auch von Tat zu einer erhöhten Expression des immunsuppressiv wirksamen Zytokins Interleukin-10 (IL-10) in

Monozyten/Makrophagen bzw. PBMCs führt (Koutsonikolis et al. 1997, Gupta et al. 2008) sowie zusätzlich die Auslösung des programmierten Zelltodes in T-Zellen stimuliert (Anand et al. 2006, Cohen et al. 1999). Für das Tat-Protein wurde des Weiteren eine proliferationshemmende Wirkung auf Lymphozyten beschrieben (Gallo et al. 2002). Auch das Nef-Protein hat eine kritische Funktion bei der AIDS-Pathogenese, indem es durch Herunterregulation der MHC-I Expression die Erkennung von HIV-infizierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen erschwert (Schwartz et al. 1996, Collins et al. 1998) und durch Herunterregulation der CD4 Expression Superinfektionen der gleichen Zelle reduziert (Benson et al. 1993). Zusätzlich ist Nef beteiligt bei der Induktion der Apoptose, indem es in HIV-infizierten Zellen die Expression des Fas-Liganden (FASL) auf der Zelloberfläche erhöht (Xu et al. 1997) sowie die Caspase-Aktivität innerhalb der Zelle moduliert (Yoon et al. 2001, Rasola et al. 2001).

1.3.1 Die immunsuppressive (Isu-) Domäne

Sequenz- und Strukturanalysen der transmembranen Hüllproteine von Retroviren haben gezeigt, dass es einen 17 Aminosäuren langen Bereich zwischen dem Cystein-loop und dem NHR-Bereich gibt, der als besonders konserviert bezeichnet werden kann. Aus diesem Bereich wurde 1985 von Cianciolo eine Konsensussequenz abgeleitet und synthetisiert, die als CKS-17 Peptid bezeichnet wurde. Aufgrund der inhibierenden Effekte des CKS-17 Peptides auf die Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten sowie der Homologie zu Bereichen in den retroviralen transmembranen Hüllproteinen, wurde dieser Bereich in der Folge als Immunsuppressive (Isu-) Domäne bezeichnet (Ruegg et al. 1989, Denner et al. 1994). Auch für das Latenzmembranprotein (LMP) des Epstein-Barr-Virus, welches ebenfalls Sequenzhomologien zur CKS-17 aufweist (siehe Abbildung 1.7), konnte eine immunsuppressive Wirkung beschrieben werden (Dukers et a. 2000).

CKS-17	L Q N R R G L D L L F L K E G G L
PERV-A	L Q N R R G L D L L F L K E G G L
KoRV	L Q N R R G L D L L F L K E G G L
MuLV	L Q N R R G L D L L F L K E G G L
FeLV-A	L Q N R R G L D L L F L K E G G L
HTLV-1	A Q N R R G L D L L F W E Q G G L
HIV-1 (env 583-599)	L Q A R I L A V E R Y L K D Q Q L
EBV-LMP	- - - - - L A L L F W L - - - -

Abbildung 1.7: Sequenzvergleich der immunsuppressiven (Isu-) Domänen

Von der CKS-17 abweichende Sequenzen sind fett gedruckt. PERV: porcines endogenes Retrovirus, KoRV: Koala-Retrovirus, MuLV: murines Leukämievirus, FeLV: felines Leukämievirus, HTLV: humanes T-Zell-Leukämie-Virus, HIV=humanes Immundefizienzvirus

Es konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass sich das CKS-17 Peptid neben der inhibierenden Wirkung auf Lymphozyten noch durch weitere immunsuppressive *in vitro*-Effekte auszeichnet. So wirkt es inhibierend auf den *respiratory burst* von humanen Monozyten (Harrel et al. 1986), auf die IL-1 Aktivität (Kleiner mann et al. 1987) und die IFN- γ Produktion (Ogasawara et al. 1988), auf die Immunglobulin Sekretion (Mitani et al. 1987) sowie auf die durch NK-Zellen vermittelte Zytotoxizität (Harris et al. 1987). Desweiteren konnten immunsuppressive Effekte durch Veränderung des intrazellulären cAMP-(zyklisches Adenosin-Monophosphat) Levels, durch Aktivierung von MAP-(Mitogen-aktiviertes protein) Kinasen, durch Phosphorylierung verschiedener Phospholipasen (Raf-1, MEK, ERK1/2, PLC- γ 1) (Fan et al. 2005) sowie durch eine Beeinflussung der T_H1/T_H2-Cytokinantwort beobachtet werden (Haraguchi et al. 1995). Allerdings ist das immunsuppressive Peptid nur biologisch aktiv, wenn es an ein Trägermolekül gekoppelt wurde (Denner et al. 1994). Wahrscheinlich überführt die Kopplung das Peptid in eine Konformation, die der biologisch wirksamen Konformation ähnlich ist und für die Interaktion mit den Zielzellen benötigt wird. Eine weitere Eigenschaft der Isu-Domäne ist ihre Homologie zu den Domänen der Klasse-I-Interferone (Chen et al. 1997, 1999). Die humane Klasse I-Interferon (IFN) Familie zählt 14 Interferon- α Moleküle, ein Interferon- β Molekül sowie ein Interferon- ω Molekül. Alle Klasse I Interferone benutzen den gleichen Rezeptor, der sich aus den zwei Untereinheiten IFN α R1 und IFN α R2 zusammensetzt (Uze et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass das Interferon- α sowie ein Peptid, korrespondierend zu einer IFN- α Domäne, durch Hemmung der Proliferation von B- und T-Lymphozyten, immunsuppressiv wirksam sind (Ruegg et al. 1990). Zusätzlich waren gegen das Isu-Peptid gerichtete Antikörper auch in der Lage, mit Interferon- α kreuzzureagieren (Chen et al. 1999, Denner et al. 2000). Daher besteht die Möglichkeit, dass

die Isu-Domäne durch Interaktion mit dem Interferon-Rezeptor, die Interferon Wirkung mimikrieren könnte.

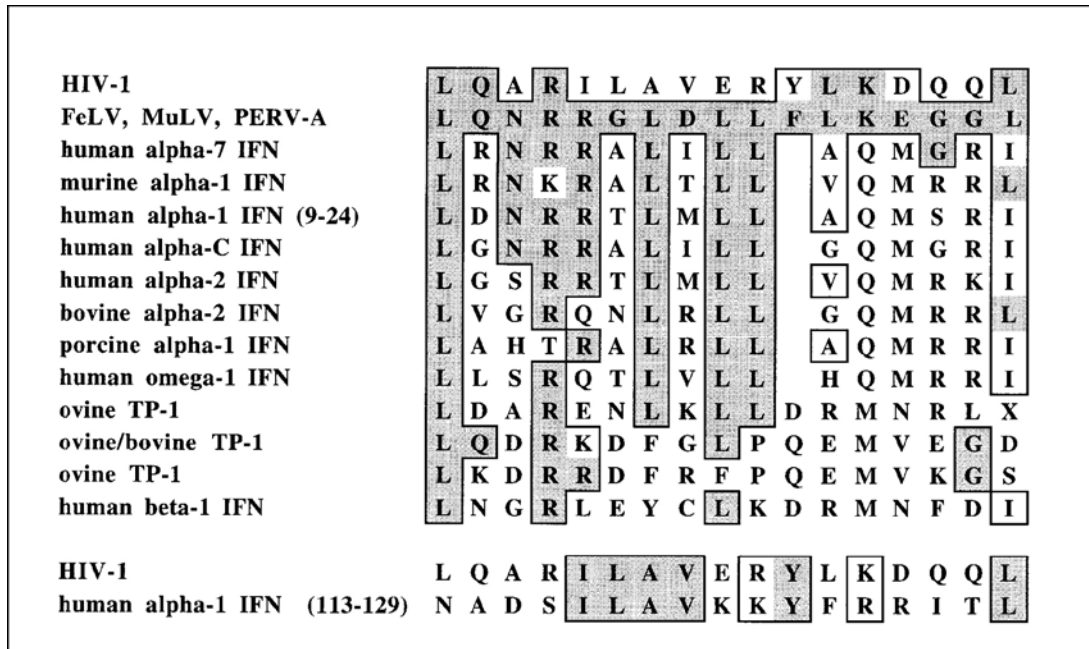


Abbildung 1.8: Sequenzhomologien zwischen den Isu-Domänen verschiedener Retroviren und unterschiedlichen Interferonen (Denner et al. 1998)

Umrandete und grau unterlegte Aminosäuren sind identisch mit denen der Isu-Domäne von FeLV, MuLV und PERV-A. Umrandete Aminosäuren zeigen konservierte Aminosäureaustausche (R=K, L=I=V, F=Y). FeLV=felines Leukämievirus, MuLV=murines Leukämievirus, PERV=porcines endogenes Retrovirus, TP=Trophoblastenprotein.

Die immunsuppressiv aktive Domäne des gp41 von HIV-1 erstreckt sich von AS 583-599 (Denner et al. 1994, GeneBank Accession Number K03455). Das HIV-1 Isu-Peptid hemmt in vitro die Mitogen- und Lymphokin-abhängige Proliferation von humanen und murinen Lymphozyten (Ruegg et al. 1989, Denner et al. 1996) und moduliert ebenfalls die T_{H1}/T_{H2}-Cytokinantwort (Denner et al. 1998).

Die N-terminale Leucin-Zipper Domäne des gp41 (dp107), die die Isu-Domäne beinhaltet, interagiert während der Virus-Infektion mit einer C-terminalen Helixregion des gp41 (dp178). Diese Interaktion resultiert in der anschließenden Membranfusion sowie der Internalisierung des Virus (Chen et al. 1998, Wild et al. 1992, 1995). Synthetische Peptide, die zu den Domänen dp107 und dp178 korrespondieren, konnten die oben erwähnte Interaktion verhindern und dadurch das Eindringen des Virus in die Zelle unterdrücken (Chen et al. 1998, Wild et al. 1995). Das Eindringen des Virus konnte ebenfalls durch ein an BSA-gekoppeltes Isu-Peptid verhindert werden (Denner et al. 1995, Henderson et al. 1993).

1.3.2 Zytokinmodulation durch TM-Proteine und Isu-Peptide

Wie bereits beschrieben, sind die TM-Proteine sowie die korrespondierenden Isu-Domänen in der Lage, das Zytokin-Sekretionsmuster einer Lymphozytenpopulation zu modulieren. Zur Gruppe der Zytokine rechnet man neben den Interleukinen, Interferonen und Tumornekrosefaktoren (TNF) auch die koloniestimulierenden Faktoren, die Chemokine und die *Transforming Growth Factors* (TGF) und ihre Aufgabe besteht in der Regulation und Koordination der Interaktionen der immunologischen Effektorsysteme. Die Entfaltung der biologischen Aktivität der Zytokine erfolgt durch die Bindung an spezifische Rezeptoren in der Zytoplasmamembran der Zielzellen. Es konnte gezeigt werden, dass ein Ungleichgewicht von den zum Teil antagonistisch wirkenden T_H1 (=Typ1) und T_H2 (=Typ2) Zytokinen die Progression eines Infektes begünstigen kann (Faxvaag et al 1995, Clerici et al. 1994, 1997). So resultierte die Inkubation einer Lymphozytenpopulation mit dem CKS-17 Peptid in einer verringerten Sekretion der Typ-1 Zytokine IL-12, IL-2 und IFN- γ und damit in einer Verringerung der zellulären, pro-inflammatorischen Immunantwort (Kleinerman et al. 1987, Haraguchi et al. 1992, 1995). Gleichzeitig wurde ein Anstieg an Typ-2 Cytokinen wie IL-10 und IL-6 detektiert, nicht aber an IL-4, IL-5 oder IL-13 (Haraguchi et al. 1992, 1995, Koutsonikolis et al. 1997). Durch Experimente mit dem rekombinanten gp41 von HIV-1 konnte ebenfalls eine erhöhte Sekretion von IL-10 und IL-6 erreicht werden (Barcova et al. 1998, Koutsonikis et al. 1997, Speth et al. 2000, Takeshita et al. 1995).

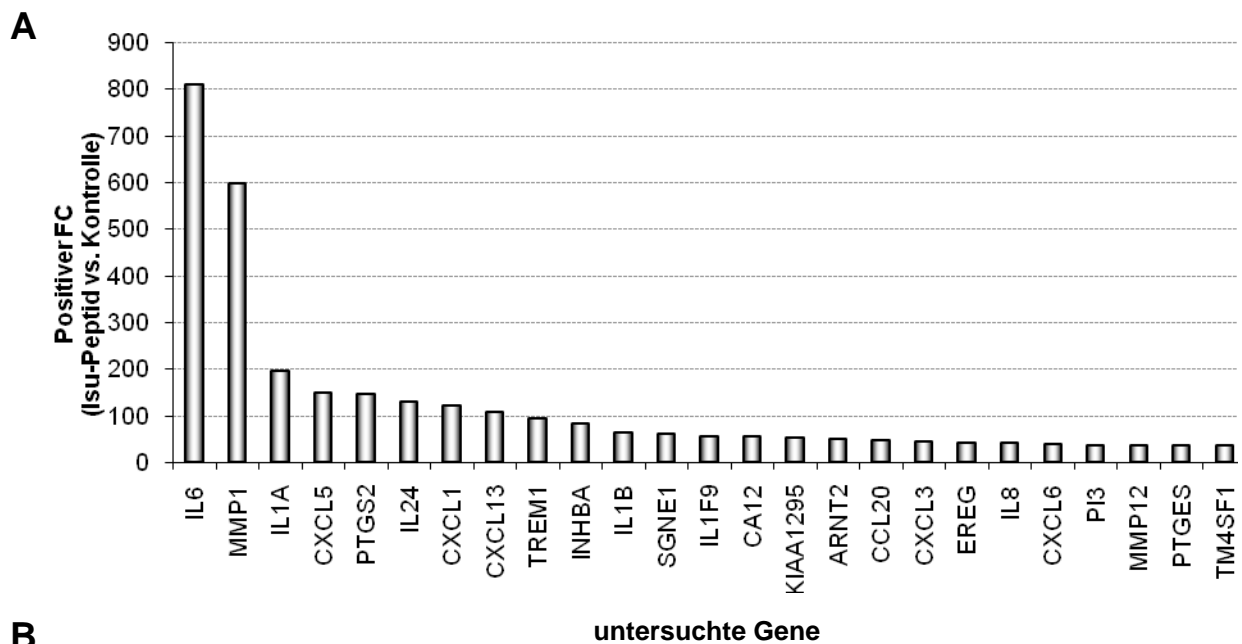
Die Expression von Interleukin-10 führt zu diversen immunsuppressiven und antiinflammatorischen Effekten im Körper. Funktionell wirksam ist das zur Familie der 4- α -Helix gehörende IL-10 als Homodimer (Delves et al. 1998). Die Produktion erfolgt hauptsächlich in T_H2 -Zellen, aber auch einige aktivierte B-Zellen (Lund et al. 2005) und Makrophagen (Riemann et al. 2005), humane T_H1 -Zellen (Del Prete et al. 1993), Monozyten (de Waal Malefyt et al. 1991), Keratinozyten (Enk et al. 1992) und Melanomzellen (Enzmann et al. 1998) sind in der Lage, Interleukin-10 zu produzieren. Im Vergleich zu anderen, immunregulatorisch wirksamen Zytokinen, erfolgt die IL-10 Ausschüttung verzögert und ein Maximum wird erst nach 24-48 h erreicht (de Waal Malefyt et al 1991). Auf zellulärer Ebene erfolgt die Regulation der IL-10 Transkription einerseits durch die weit verbreiteten Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 sowie durch post-transkriptionelle Modifikationen. Daraus lässt sich folgendes Modell ableiten: Durch die ubiquitäre und konstitutive Regulation der IL-10 Transkription durch Sp1 und Sp3 kommt es zur Transkription des IL-10 Gens in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen. In nicht-stimulierten Zellen wird die konstitutiv exprimierte IL-10 mRNA durch intrinsische, destabilisierende mRNA-Signale auf einem niedrigen Niveau gehalten. Erfolgt eine Stimulation, wird einerseits die IL-10 Transkription erhöht, andererseits erfolgt eine zusätzliche Stabilisierung der mRNA durch regulatorische

Sequenzen in der 3'-UTR (Powell et al. 2000). Durch diese Kombination von niedriger, ubiquitärer Transkription und post-transkriptioneller Modifikation nach Aktivierung kann einerseits eine allgemeine Kontrolle pro-inflammatorischer Zytokin Expression erfolgen, die zu einer Einschränkung autoinflammatorischer Prozesse dienen könnte. Andererseits kann bei starken inflammatorischen Prozessen die IL-10 Produktion schnell hochreguliert werden um die pro-inflammatorische Zytokin-Kaskade einzuschränken und das T_H1/T_H2 -Zytokin Gleichgewicht wieder herzustellen.

Erhöhte IL-10 Transkription konnte durch *in vitro* Versuche mit HIV-1 an humanen Monozyten und T-Zelllinien beschrieben werden (Borghesi et al. 1995, Barcellini et al. 1994, Graziosi et al. 1994). Dies ist von Bedeutung, da auch für eine HIV-Infektion ein Anstieg der IL-10 Transkription und Sekretion beobachtet wurde (Denis et al. 1994, Masood et al. 1994). Durch den Einsatz eines Zytokinarrays konnte gezeigt werden, dass auch durch die Inkubation des HIV-1 Isu-Peptides mit Lymphocyten eine Veränderung der T_H1/T_H2 -Zytokin Gleichgewichts erreicht werden kann. Es wurden 93 verschiedenen Zytokine untersucht. Es hat sich dabei gezeigt, dass das Isu-Peptid von HIV-1 in der Lage ist, die Expression der Zytokine IL-10, IL-6, IL-8, RANTES, MCP-1, MCP-2, TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3, IL-1 β , Gro- (α , β , γ), Gro- α hochzuregulieren, wohingegen die Zytokine IL-2, MIG (CXCL9) herunterreguliert wurden (Denner et al. unveröffentlicht). Diese Ergebnisse korrespondieren mit den bisher gezeigten Einflüssen von HIV-1 gp41 auf die Zytokinexpression in Lymphocyten (Takeshita et al. 1995). Die Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Isu-Domäne des HIV-1 gp41 für dessen immunsuppressive Eigenschaften verantwortlich ist.

1.4 Modulation der Genexpression durch das HIV-1 Isu-Peptid

In einem von der Arbeitsgruppe durchgeführten Microarray wurde die Expression von 29098 humanen Genen in PBMCs nach Inkubation mit dem HIV-1 Isu-Peptid untersucht. Dabei konnte die Hochregulation von 400 Genen detektiert werden. Unter den 25 am stärksten hochregulierten Genen fanden sich mehrere Zytokine, Membranrezeptoren sowie extrazelluläre Proteine (Abbildung 1.9).



	Name	Gen Symbol	Positiver FC (Isu-Peptid vs. Kontrolle)
1	interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	809,0713157
2	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	597,5369856
3	interleukin 1, alpha	IL1A	196,4714691
4	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	149,6634121
5	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2	146,4068825
6	interleukin 24	IL24	130,5778268
7	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1	122,5932741
8	chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (B-cell chemoattractant)	CXCL13	108,0206457
9	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	TREM1	94,91572336
10	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	INHBA	81,86018931
11	interleukin 1, beta	IL1B	64,24622153
12	secretory granule, neuroendocrine protein 1 (7B2 protein)	SGNE1	62,31107142
13	interleukin 1 family, member 9	IL1F9	56,58606945
14	carbonic anhydrase XII	CA12	54,62701247
15	KIAA1295	KIAA1295	52,34003564
16	aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	ARNT2	51,31531056
17	chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	46,36120405
18	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	43,93287627
19	epiregulin	EREG	42,16065279
20	interleukin 8	IL8	41,98138234
21	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CXCL6	40,49744326
22	peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	PI3	36,83637282
23	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	MMP12	36,71434923
24	prostaglandin E synthase	PTGES	36,51012971
25	transmembrane 4 L six family member 1	TM4SF1	36,04368702

Abbildung 1.9: Darstellung der 25 am stärksten hochregulierten Gene nach Inkubation von PBMCs mit dem HIV-1 Isu-Peptid

Humane PBMCs gesunder Spender wurden für 24h mit dem HIV Isu-Peptid inkubiert, die RNA wurde isoliert und in einem Microarray wurden die Änderungen der Genexpression detektiert. **A:** graphische Darstellung. **B:** tabellarische Darstellung. Positiver FC = Fold change der hochregulierten Gene

Die Erhöhung der Expression der dargestellten Gene bezieht sich jeweils auf eine Lymphozytenpopulation, die nicht mit dem HIV-1 Isu-Peptid inkubiert wurde. Die gezeigten Daten ergänzen bzw. bestätigen die im Cytokinarray beobachteten Ergebnisse in Bezug auf die Modulation der Cytokinantwort durch das Isu-Peptid. So konnte eine erhöhte Expression von IL-6 (Nr.1) und IL-8 (Nr.20) beobachtet werden. Außerdem konnte die Expression von zusätzlichen Cytokinen wie IL-1 α , CXCL-5, IL-24, CXCL-1, CXCL-13, IL-1 β u. a. gezeigt werden. Neben der Änderung des Zytokin-Expressionsprofils wurde auch eine Hochregulation des membranständigen Rezeptors TREM-1 (*triggering receptor expressed on myleoid cells 1*) und des extrazellulären Proteins MMP-1 (Matrix-Metalloproteinase 1) beobachtet. Da der Microarray das Expressionsprofil der PBMCs nach 24h widerspiegelt, sollten die Ergebnisse durch eine Kinetik mit anschließender Auswertung durch eine realtime-PCR ergänzt werden. Bereits im Jahre 2002 konnten Vahey et al. in einem von ihnen durchgeführten Microarray, bei dem PBMCs mit dem Laborstamm HIV-1 RF inkubiert wurden, zeigen, dass die Mehrheit der Gene, die mit der Immunantwort assoziiert sind, auf mRNA-Ebene nach 12h am stärksten hochreguliert wurden (23 Gene), wohingegen nach 24h nur noch 4 Gene der Immunantwort hochreguliert waren (Vahey et al. 2002). In einem weiteren, ebenfalls von der Arbeitsgruppe durchgeführtem Microarray, bei dem PBMCs mit dem transmembranen Hüllprotein von HERV-K inkubiert wurden, konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden.

1.5 Zielsetzung

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) löst im infizierten Wirt eine Immunschwäche-Krankheit aus, die als erworbenes Immundefizienz-Syndrom (AIDS) bezeichnet wird. Zur Zeit sind weltweit mehr als 33 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert und obwohl das Virus sehr gut charakterisiert ist, bleibt der Mechanismus der Auslösung dieser Immundefizienz noch unklar. Es konnte gezeigt werden, dass während einer HIV-1 Infektion die Progression zu AIDS mit der Viruslast korreliert, daher kann der direkte Einfluss eines viralen Proteins bei der AIDS-Erkrankung nicht ausgeschlossen werden. Das transmembrane Hüllprotein gp41, sowie ein synthetisches Peptid, welches einer hochkonservierten Domäne in der N-terminalen-Helix-Region des gp41 entspricht (Isu-Peptid), können *in vitro* die Proliferation humaner Immunzellen hemmen sowie deren Zytokinproduktion modulieren. Daher besteht die Möglichkeit, dass das transmembrane Hüllprotein von HIV eine Rolle bei der Immunpathogenese der AIDS-Erkrankung spielt.

Bisher ist noch nicht geklärt, wie das transmembrane Hüllprotein bzw. das Isu-Peptid die Immunantwort modulieren, daher soll im Rahmen dieser Diplomarbeit zum Einen untersucht werden, ob das Isu-Peptid durch spezifische Bindung an einen putativen Rezeptor auf der Oberfläche von Immunzellen zur Vermittlung der immunsuppressiven Effekte im Stande ist. Neben der humanen T-Zelllinie C8166 sollen auch periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) mit Hilfe der Immunfluoreszenz sowie der Durchflusszytometrie auf eine mögliche Interaktion mit dem HIV Isu-Peptid untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll analysiert werden, welchen Einfluss das Isu-Peptid auf die Änderung der Interleukin-10 (IL-10) Sekretion humaner PBMCs hat. In der Arbeitsgruppe konnte durch einen Zytokinarray bereits gezeigt werden, dass Inkubation von PBMCs mit dem Isu-Peptid in einer Erhöhung der IL-10 Sekretion resultiert, allerdings gibt es noch keine Daten zum zeitlichen Verlauf der IL-10 Expression. Daher soll in einer Kinetik einerseits die Änderung der IL-10 Sekretion mittels ELISA auf Proteinebene untersucht werden, andererseits soll durch real time PCR Analysen die Veränderung auf mRNA-Ebene detektiert werden. Des Weiteren sollen erste Hinweise auf eine Spenderabhängigkeit der IL-10 Sekretion genauer analysiert werden.

Neben der Änderung der Zytokinantwort hat sich gezeigt, dass das Isu-Peptid auch die Genexpression humaner PBMCs moduliert. In einem von der Arbeitsgruppe durchgeführten Microarray konnte die Hochregulation von über 400 Genen detektiert werden. Unter den 25 am stärksten hochregulierten Genen fanden sich TREM-1 und MMP-1. Durch real time PCR Analysen soll die Hochregulation dieser Gene bestätigt und durch eine Kinetik genauer charakterisiert werden. Zusätzlich soll die Expression von TREM-1 und MMP-1 durch Verwendung eines ELISAs auch auf Proteinebene analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper & Fluorochrome

Name	Herkunft/Firma	Verdünnung
<u>Primärantikörper</u>		
Ziegenserum 1	AG Denner, RKI, immunisiert mit Isu-Peptid	1:250
<u>Sekundärantikörper</u>		
Anti-Goat IgG HPRT	Sigma Aldrich, München, Deutschland	1:3000
<u>Fluorochrom-Konjugate</u>		
Anti-CD3-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich	0,25 µg/10 ⁶ Zellen
Anti-GST-FITC	Abcam, Cambridge, USA	1 µg/10 ⁶ Zellen
Streptavidin-FITC	Sigma Aldrich, München, Deutschland	1 µg/10 ⁶ Zellen

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Acrylamid-Lösung Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Standard	Pierce, Rockford, USA
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS ³)	Pierce, Rockford, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G-250	Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTP-Mix, 10mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol reinst	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FKS (fötale Kälberserum, 10 %)	PAA, Pasching, Österreich
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES-Puffer (1 M)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ilomastat (GM6001), 2,5 mM	Chemicon International, Temecula, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin (200 mM, Low Endotoxin)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Lymphocyte Separation Medium	PAA, Pasching, Österreich
Magermilchpulver	Sucofin TSI GmbH, Zeven, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂ , 25 mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 0.1 μ g/ μ l	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PCR-Puffer (10 x)	Roche, Mannheim, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (10000 U /10000 μ g/ μ l)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RNase-freies Wasser	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold™, 5 U/ μ l)	Roche, Mannheim, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	USB Corporation, Cleveland, USA
Tricin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TrisHCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserbadkonservierer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Geräte

Gerät	Firma
96 Plate Washer™ accu-jet® (Pipettierhilfe)	Tecan, Crailsheim, Deutschland Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
CO2-Inkubator Sanyo MCO-20AIC	Sanyo Biomedical, Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland
ELISA Reader Spectra Classic	Tecan, Crailsheim, Deutschland
FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, USA
Fluoreszenzmikroskop Eclipse E600	Nikon, Tokyo, Japan
GelDoc 2000	BioRad, Hercules, USA
Innova 4330 Inkubator	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlzentrifuge 5804R q	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop ID 03	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland
Mikrowelle Micro-Chef FM B930	Moulinex, Deutschland
Mx4000® Multiplex Quantitative PCR System	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000	peQLab, Erlangen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Power Pac 200 bzw. 300	BioRad, München, Deutschland
Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Schüttler Sartorius Certomat IS	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
SDS-Gelkammer	Hoefer-SE 250 Amersham / GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe KS12	Thermo Electron Corporation (Kendro), Langenselbold, Deutschland
Sterilbank SterilGARD, Class II Type A / B3	

Analysen zur IL-10 Sekretion und zur Modulation der Genexpression

Die Monomere der folgenden von HIV-1 gp41 bzw. PERV A p15E abgeleiteten Peptide wurden von den Firmen Genaxxon (Biberach, Deutschland) und Jerini (Berlin, Deutschland) geliefert und mittels EDC zu Peptid-Polymeren gekoppelt (siehe 2.2.2.1).

Tabelle 2.1: Sequenz und Herkunft der verwendeten Peptid-Polymere

Name	Typ	Abkürzung	Sequenz	Herkunft
HIV Isu/ PERV A Isu	Heteropolymer	K156	NH ₂ -KQLQARILAVERYLKDQQL-COOH NH ₂ -VLQNRRLDLDLFLKEGGLC-COOH	Jerini, Berlin Genaxxon, Biberach
HIV Isu	Homopolymer	K169	NH ₂ -KQLQARILAVERYLKDQQL-COOH	Genaxxon, Biberach
HIV Isu	Homopolymer	K194	NH ₂ -KQLQARILAVERYLKDQQL-COOH	Genaxxon, Biberach
HIV Isu	Homopolymer	K172	NH ₂ -KQLQARILAVERYLKDQQL-COOH	Genaxxon, Biberach
HIV Ran	Homopolymer	K51	NH ₂ -QQEKVAADKLRILIQYQLLR-COOH	Genaxxon, Biberach
HIV Ran	Homopolymer	K200	NH ₂ -QQEKVAADKLRILIQYQLLR-COOH	Genaxxon, Biberach

2.1.5 Primer , Sonden & siRNAs**Primer und Sonden:**

Name	5'-3' Sequenz	Fragment- größe [bp]
hs GAPDH 2 fwd	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	
hs GAPDH 2 rev	TGGTCCACACCCATGACGA	149
hs GAPDH 2 Sonde	6CTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGG[3BQ1]	
hs TREM-1 fwd	GCCTCACATGCTGTTTCGAT	
hs TREM-1 rev	GGTACAAATGACCTCAGCGT	578
hs TREM-1 Sonde	6CAGCCAGGAGAATGACAATGTTGA[3BQ1]	
hs MMP-1 fwd	CATCCAAGCCATATATGGACG	
hs MMP-1 rev	TCTGGAGAGTCAAATTCTCT	610
hs MMP-1 Sonde	6CTGGGCTGTTTCAGGGACAGAA[3BQ1]	

hs IL-10 fwd	CCACGCTTTCTAGCTGTT	
hs IL-10 rev	CTCCCTGGTTTCTCTTCCTAA	92
hs IL-10 Sonde	TCTTGTCTCTGGGCTT	

Die Primer und Sonden für GAPDH, TREM-1 und MMP-1 wurden von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland bezogen, die Primer und Sonden für IL-10 stammen von Qiagen, Hilden, Deutschland.

siRNAs:

Name	5'-3' Sequenz	Zielsequenz
Hs_IL10_6:	AGAAGCCTACATGACAATGAA	Interleukin-10 ORF
Hs_IL10_7:	CAGCTGGACAACCTTGTTGTTA	Interleukin-10 ORF
Hs_IL10_8:	TGAGTTTGACATCTTCATCAA	Interleukin-10 ORF
Ctrl_AllStars_1	-	keine Homologie zu humanen ORFs

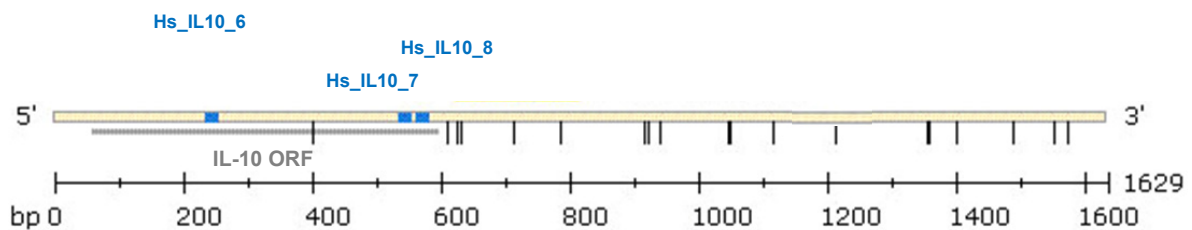


Abbildung 2.1: IL-10 Gensequenz mit Bindestellen für die IL-10 siRNA

Grauer Balken = IL-10 ORF, blaue Balken = Bindestellen der IL-10 siRNA

Die siRNAs wurden von Qiagen, Hilden, Deutschland bezogen und in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Als Kontrolle diente die Ctrl_AllStars_1 siRNA, die keine Homologien zu bekannten humanen ORFs aufweist.

2.1.6 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
PBS „ohne“	136,9 mM NaCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2

Bei PBS „ohne“ wird im Vergleich zu PBS kein $MgCl_2$ verwendet; im Folgenden wird die Abkürzung PBS „ohne“ genutzt.

Agarosegelelektrophorese

10 x DNA-Ladepuffer	50 % (v/v) Glycerin 2 % (v/v) 1 x TAE 1 Spatelspitze Orange G
50 x TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Eisessig 50 mM EDTA

FACS-Messungen

FACS-Puffer	PBS, 2 % (v/v) Formaldehyd
-------------	----------------------------

Immunfluoreszenz

IF-Puffer	PBS, 0,2% Gelatine
-----------	--------------------

SDS-PAGE

Anodenpuffer	200 mM Tris, pH 8,9
Gelpuffer	3 M TrisHCl, pH 8,4 0,3 % SDS
Kathodenpuffer	100 mM Tris, pH 8,25 100 mM Tricin 0,1 % (w/v) SDS
Probenpuffer	50 mM TrisHCl, pH 6,8 12 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol 4 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250

Crosslinking

Quenching-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,4
------------------	------------------------

Silbergel-Färbung

Fixierungspuffer	40 % Methanol + 10 % Essigsäure
Stopplösung	5 % Essigsäure

IL-10 ELISA

Waschpuffer	PBS „ohne“ + 0,05 % Tween-20
-------------	------------------------------

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial

96-well-Platten (ELISA),

Kanüle Sterican Gr. 1

Leucosep®-Röhrchen

NuncloTM delta Surface 96-Well-Platte

Optical Cap 8x Strip

Parafilm®

PCR SoftStrip 0,2 ml

Pipettenspitzen mit Filter

Plastibrand® Einmal-Küvetten,

Plastibrand® Reaktionsgefäße, 1,5/2 ml

RNase-free Microfuge Tubes

Serologische Pipetten à 1, 5, 10 und 25 ml

Spectra/Por® Biotech Cellulose Ester

Sterilfilter FP30/0,2 CA-S

Strip Tube 8 x 0,2 ml

Vacutainer® Brand Safety-LokTM Blood

Collection set

Vacutainer® Tube Sodium Heparin

Zellkulturflasche Standard 150 cm²

Zentrifugenröhrchen, PP, 15 und 50 ml

Firma

Microlon Greiner Bio-One,

Frickenhausen, Deutschland

BBraun Melsungen AG, Melsungen,
Deutschland

Greiner bio-one, Frickenhausen,
Deutschland

Nunc A/S Roskilde, Dänemark

Stratagene, Cedar Creek, USA

M Brand GmbH + Co. KG, Wertheim,
Deutschland

Biozym Scientific GmbH, Hessisch
Oldendorf, Deutschland

nerbe plus, Gesellschaft für medizinische
und labortechnische Einmalartikel mbH,
Winsen/Luhe, Deutschland

PS Brand GmbH + Co. KG, Wertheim,
Deutschland

Brand GmbH + Co. KG, Wertheim,
Deutschland

Applied Biosystems, Darmstadt,
Deutschland

TPP, Trasadingen, Schweiz

Rotring, Dassel, Deutschland

Stratagene, Cedar Creek, USA

Becton Dickinson, Heidelberg,
Deutschland

Becton Dickinson, Heidelberg,
Deutschland

TPP, Trasadingen, Schweiz

TPP® (Techno Plastic Products AG),
Trasadingen, Schweiz

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 One-Step Real-Time Quantitative PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion [Mullis et al. 1986] bietet die Möglichkeit der selektiven *in vitro* Amplifikation eines DNA Abschnittes. Es handelt sich dabei um eine zyklische Reaktion, die das Aufschmelzen der komplementären DNA-Stränge (Denaturierung), die Anlagerung kurzer Oligonukleotide *upstream* bzw. *downstream* der Zielsequenz (primer annealing) und die Neustrangsynthese/Kettenverlängerung (Elongation) umfasst. Während der Elongation verlängert die aus *T.aquaticus* gewonnene thermostabile Taq-Polymerase die Primer am 3'OH-Ende durch kovalentes Anfügen von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) unter Abspaltung von Pyrophosphat. Die Menge der Ziel-DNA wird in jedem Zyklus verdoppelt und die neusynthetisierte DNA dient im nächsten Zyklus als Matrize (template), so dass es zu einer exponentiellen Amplifikation des DNA-Fragmentes kommt.

Bei der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Weiterentwicklung der PCR. Die Grundlage für diese Methode wurde 1992 durch Higuchi et al geschaffen [Higuchi et al. 1992]. Zur Detektion der amplifizierten DNA-Fragmente können sowohl sequenzspezifische als auch nicht-sequenzspezifische fluoreszierende Reporterfarbstoffe verwendet werden, wobei die Fluoreszenz proportional zur Produktmenge ansteigt. Die Quantifizierung der Amplifikate basiert bei allen Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem sogenannten Threshold Cycle oder CT-Wert. Der CT-Wert beschreibt denjenigen PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich sequenzspezifische TaqMan-Sonden verwendet. Bei TaqMan-Sonden handelt es sich um Oligonukleotide, die am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluorochrom (z.B. 6-Carboxyfluorescein = FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher (z.B. Black Hole Quencher 1, BHQ1) hybridisiert sind und inmitten der zu amplifizierenden Sequenz binden. Nach Anregung des Fluorochroms gibt dieses die Energie durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) an den Quencher weiter, sofern sich beide in hinreichender räumlicher Nähe (10-100 Å) zueinander befinden [Livak et al. 1995]. Solange das Oligonukleotid intakt ist, ist die Lichtstärke des Fluorochroms gering, wird aber der Reporter durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase freigesetzt, steigt die Lichtproduktion bei dieser Wellenlänge an. Je mehr DNA produziert wird, desto mehr Reporter-Moleküle werden freigesetzt und dem entsprechend steigt die Signalstärke. Da eine Hydrolyse der TaqMan-Sonde durch die Taq-Polymerase nur erfolgen kann, wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Template kommt, wird das Fluoreszenzsignal nur generiert, falls es zu einer Amplifikation der Zielsequenz kommt.

Die Messung der Reporterfluoreszenz erfolgte mit dem Mx4000 Multiplex Quantitative PCR System [Stratagen], die Erfassung der Daten mit der dazugehörigen Software. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen, Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate wurden mit Microsoft Excel berechnet. Um die Zytotoxizität der Konjugate zu untersuchen und um die Replikate untereinander vergleichen zu können, wurde das „house keeping“-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) parallel zu den „genes of interest“ amplifiziert. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Livak und Schmittgen [Livak et al. 2001]. Als Negativkontrolle wurde ein Reaktionsansatz mit H₂O bidest statt mit RNA untersucht. Zusätzlich wurde von jeder RNA-Probe ein Aliquot mit der AmpliTaq Gold und ohne reverser Transkriptase angesetzt, um mögliche DNA-Kontaminationen feststellen zu können. Um zu untersuchen, ob Interferenzen zwischen den gleichzeitig verwendeten Primerpaaren auftreten, wurden die verwendeten Primerpaare in Vortests auch einzeln getestet.

2.2.1.2 Proteinaufreinigung

GST Spin Purification Kit

Mit dem B-PER GST Spin Purification Kit [Pierce, Rockford, USA] ist eine schnelle Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien möglich. Nach der Extraktion des Fusionsproteins durch Aufschliessen der Bakterien mit dem B-PER Lysepuffer erfolgt die Aufreinigung durch immobilisiertes Glutathione, an welches GST spezifisch bindet.

Zur Aufreinigung von GST wurde eine Vorkultur mit 10 ml LB-Medium und 20 µl der Glycerinkultur BL21-pGEX angesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit 2,5 ml dieser Vorkultur wurde eine 250 ml Hauptkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0,5-0,8 angezogen. Anschließend erfolgte die Induktion der GST Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG bei 37°C über einen Zeitraum von 3h. Nach der Zentrifugation der Zellen (13000 x g, 4°C, 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet durch Zugabe von 10 ml B-PER Reagenz aufgeschlossen. Das Pellet wurde so lange gevortext, bis sich eine homogene Lösung ergab, die anschließend bei RT für 10 min geschüttelt wurde. Zur Trennung der löslichen von den unlöslichen Proteinen wurde das Homogenat für 15 min bei 27000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Um das GST von den restlichen löslichen Proteinen zu trennen, wurde 1 ml immobilisiertes Glutathion, welches kovalent an Agarose-beads gekoppelt wurde, zugegeben und für 10 min bei RT geschüttelt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1200 x g wurde der Überstand entfernt, das Gemisch aus immobilisiertem Glutathion und gebundenem GST in 250 µl Waschpuffer resuspendiert und anschließend in einer Handee Spin Cup Säule für 2

min bei 2000 x g zentrifugiert. Zur Entfernung von nicht-gebundenen Proteinen wurde mit 500 µl Waschpuffer über 5 min gewaschen und in der Folge bei 2000 x g für 2 min zentrifugiert. In der Folge wurden 500 µl des Elutionsbuffers, in dem reduziertes Glutathion enthalten ist, auf die Säule gegeben und für 5 min inkubiert. Hierbei erfolgt durch das reduziertes Glutathion eine Verdrängung des immobilisierten Glutathions am GST-Protein. Nach Zentrifugation bei 2000 x g für 2 min wurde das im Elutionspuffer enthaltene GST bei -80°C gelagert. Es wurden insgesamt 4 Elutionschritte durchgeführt.

2.2.1.3 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolation von RNA aus PBMCs wurde das RNeasy Kit der Firma Qiagen verwendet [Qiagen, Hilden, Deutschland]. Es basiert auf der Lyse und Homogenisation der Zellen durch einen Guanidin-Isothiocyanat Puffer (RLT) und der anschließenden Bindung der RNA an eine Silikamembran. Anschließende Waschschrte und ein DNA-Verdau mit DNaseQ dienen zur Erhöhung der Reinheit der RNA. Pro Säule wurden ungefähr $1,8 \times 10^6$ Zellen eingesetzt und für 5 min bei 2000 x g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde für weitere ELISA Messungen bei -80°C eingefroren, das Zellpellet wurde mit 800 µl PBS „ohne“ gewaschen und erneut bei 2000 x g für 5 min zentrifugiert. Nach Zugabe von 600 µl RLT-Puffer und 6 µl Mercaptoethanol wurde die Zellsuspension mit der Pipette homogenisiert und danach stark gevortext. Nachdem 700 µl Ethanol (70% in DEPC-Wasser) zugesetzt wurden, wurde die Suspension in 2 Schritten von jeweils 700 µl und 600 µl auf die RNeasy Minisäule gegeben und bei 10000 x g für 15 s zentrifugiert. Die Säule wurde mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen (15s, 10000 x g) und dann mit 80 µl einer Mischung aus DNaseQ und RDD-Puffer (Verhältnis 1:7, RNase-Free DNase Set, [Qiagen]) für 15 min inkubiert. Es folgten Waschschrte mit 350 µl Puffer RW1 und 2 x 500 µl Puffer RPE (jeweils 15 s, 10000 x g). Zur Entfernung aller Pufferreste wurde die Säule noch einmal für 15s bei 10000 x g zentrifugiert. Im letzten Schritt erfolgte die Elution der RNA durch Zugabe von 50 µl DEPC-Wasser (1 min, 10000 x g). Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt und es wurden nur RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet. Nach dem Messen der RNA-Konzentration wurde die RNA auf 10 ng/µl verdünnt und bei -80°C gelagert.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop Spectrophotometers ND-1000 [peQLab] gemessen. Als Kalibrierungsprobe wurde DEPC-Wasser verwendet. Es wurde jeweils 1 µl der zu untersuchenden Probe eingesetzt und der RNA-Gehalt wurde in ng/µl bestimmt. Die Reinheit der Proben wurde durch den Quotient der Wellenlängen 260 nm

/ 280 nm ermittelt. Nucleinsäuren absorbieren bei 260 nm, wogegen die zyklischen Seitenketten einiger Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin, die als Bestandteile von Proteinen mögliche Verunreinigungen darstellen, bei 280 nm absorbieren. Ergibt der Quotient beider optischer Dichten 1,8 bis 2,0, so wird die Nucleinsäurelösung als frei von Proteinen bezeichnet.

2.2.1.5 RNA-Interferenz (RNAi)

RNA-Interferenz beschreibt einen durch doppelsträngige RNA (dsRNA) ausgelösten hoch konservierten Mechanismus zur sequenzspezifischen Stilllegung von Genen. Diese Methode des posttranskriptionellen „gene silencing“ wurde Ende der 90er-Jahre erstmalig für den Fadenwurm *C.elegans* beschrieben [Mello et al. 1998]. Für diese Entdeckung wurden Craig Mello und Andrew Fire im Jahre 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet. Der Mechanismus der RNAi ist inzwischen teilweise aufgeklärt. Als Schlüsselenzym wurde die so genannte ‚Dicer RNase III‘ identifiziert (Abb. 2.1). Diese Nuklease spaltet cytoplasmatische, doppelsträngige RNA (dsRNA) in 21-23 nt lange dsRNA-Fragmente, welche die eigentlichen Effektoren der RNAi darstellen. Sie werden als ‚short interfering RNAs‘ (siRNA) bezeichnet. Eine anschließende Phosphorylierung der 5'-Enden der siRNA-Duplex führt zur Aufnahme dieser in den ‚RNA induced silencing complex‘ (RISC). Der RISC ist ein Protein-Nuklease Komplex, der mit Hilfe des antisense-Strangs (as) der siRNA über komplementäre Basenpaarung an die korrespondierende mRNA-Sequenz herangeführt wird. Die Spaltung der Ziel-mRNA erfolgt endonukleolytisch in der Mitte des von der siRNA überspannten Sequenzabschnitts.

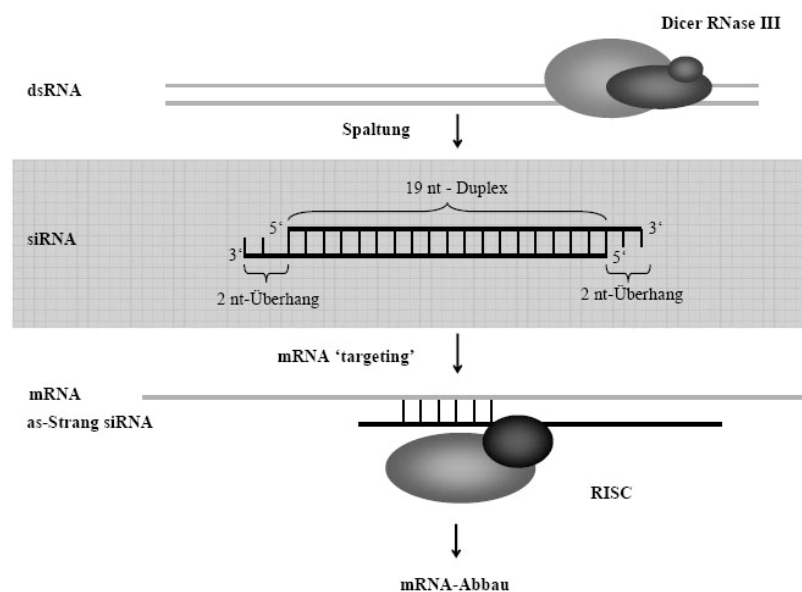


Abbildung 2.2: Modell für die RNA-Interferenz in Säugerzellen. (McManus *et al.*, 2002)

Es wurden 3 verschiedene siRNAs (Hs_IL10_6, Hs_IL10_7, Hs_IL10_8) verwendet, welche alle innerhalb des Interleukin-10 ORFs binden. Um eine Erhöhung der Effektivität des gene silencing zu erreichen wurden die siRNAs gepoolt und in einer Endkonzentration von 50 nM pro 3×10^5 Zellen eingesetzt. Zur Transfektion von PBMCs mit der RNAi wurde 10 μ l 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP) – liposomales Transfektionsreagenz [Roche] verwendet und für 30 min bei RT mit der siRNA inkubiert. Diese Zeit wird benötigt, damit sich ein Komplex zwischen der RNAi und dem Transfektionsmedium aufbauen kann, der in der Formation von Liposomen endet. Anschließend erfolgt eine endocytotische Aufnahme der Liposomen ins Innere der Zellen. Da siRNAs in der Lage sind, durch Bindung an die endosomalen Toll-Like-Rezeptoren 3, 7, 8 oder 9 eine Cytokinantwort in den zu transfizierenden Zellen hervorzurufen (Sioud 2005), wurde eine Kontroll-siRNA (Ctrl_AllStars_1) ohne Homologien zu bekannten humanen ORFs eingesetzt, um eine eventuelle IL-10 Induktion durch RNAi-Applikation zu untersuchen.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Kopplung von Peptiden

In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe hat sich gezeigt, dass immunsuppressive Peptide mit einem Molekulargewicht unter 4 kDa allein nicht in der Lage sind, immunregulatorische Effekte an Zellen des Immunsystems zu induzieren (Denner et al. 1994). Daher müssen die Peptide an größere Tragemoleküle wie z.B. BSA gekoppelt oder selbst zu Polymeren verknüpft werden. Das chemische Koppeln von Proteinen durch quervernetzende Substanzen (crosslinker) stellt eine gängige Methode zur kovalenten Verknüpfung von Proteinen oder Peptiden dar. Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Herstellung von Konjugaten basiert auf dem Einsatz eines reaktiven Carbodiimids, dem 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC). EDC reagiert dabei mit den Carboxylgruppen der Peptide und bildet ein reaktives Zwischenprodukt, welches mit primären Aminen eine Amidbindung eingehen kann. Zur Herstellung der Polymere wurde zu 2 ml PBS jeweils 4 mg Peptid und 38,4 mg EDC hinzugegeben und vermischt. Durch Zugabe von 2 mg N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS) konnte die Halbwertszeit des reaktiven Esters erhöht werden. Nach Inkubation des Reaktionsgemisches für 3h bei RT erfolgte die Dialyse gegen PBS „ohne“ bei 4°C (molecular weight cut off, MWCO:10000 Da) [Spectra/Por® Biotech] zur Entfernung der niedermolekularen Fraktionen. Abschließend wurde Proteinkonzentration der gekoppelten Peptide durch das BCA Protein Assay Kit [Pierce] bestimmt.

Für die Untersuchungen zur Immunsuppression wurden Peptide verwendet, die in ihrer Sequenz der immunsuppressiven (Isu-)Domäne von HIV-1, MuLV oder PERV-A entsprachen. Die HPLC gereinigten Peptidmonomere stammten von der Firma Genaxxon.

2.2.2.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinbestimmung nach Pierce beruht auf dem Nachweis eines Bicinchoninsäure/Cu⁺ - Farbkomplexes. Dieser Komplex entsteht durch die Reduktion von Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen durch die Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin und anschließender Inkubation mit Bicinchoninsäure (Smith et al. 1985). Das Reaktionsprodukt besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm und erlaubt dadurch eine photometrische Quantifizierung.

Zur Durchführung des assays wurde zuerst eine Gebrauchslösung aus 50 Teilen BCA Reagenz A und einem Teil BCA Reagenz B hergestellt. Von der fertigen Gebrauchslösung wurden 200 µl pro well in eine 96-well Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 10 µl der zu untersuchenden Probe vermischt. Als Vergleichsstandard diente ein „Albumin Standard“, von dem ebenfalls je 10 µl der Verdünnungen 200, 400, 600, 800, 1000 und 1200 µg/ml auf dieselbe Mikrotiterplatte gegeben wurden. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurden die Proben im ELISA Reader [Tecan] bei 560 nm mit einer Referenz von 492 nm gemessen. Die Proben wurden als Triplikate, die Standards als Duplikate untersucht.

2.2.2.3 Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der diskontinuierliche Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine Methode zur Trennung von Proteinen aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes (Schagger et al. 1987). Natrium Dodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, welches durch Anlagerung an Proteine deren Eigenladung überdecken kann, so dass Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Vor der Auftragung der zu untersuchenden Proben wurden diese mit SDS im Überschuss auf 95°C erhitzt. Durch Zugabe von reduzierenden Thiolverbindungen wie Dithiothreitol (DTT) oder β-Mercaptoethanol konnte sichergestellt werden, dass alle Disulfidbrückenbindungen in den Proteinen aufgespalten wurden. Wasserstoff- und Disulfidbrücken wurden so zerstört, die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine aufgelöst. Daher konnte gewährleistet werden, dass nur die Größe bzw. das Molekulargewicht als Trennkriterium wirksam wurden.

In dieser Arbeit wurde stets eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt. Bevor die Proben durch das engmaschige Trenngel (pH 8,8, 12% Acrylamid) liefen, erfolgte eine Fokussierung im weitporigen Sammelgel (pH 6,4, 4% Acrylamid). Durch die unterschiedlichen pH-Werte kommt es zu einer zeitweisen Ausbildung eines

Feldstärkegradienten im Sammelgel, der es den Proteinen ermöglicht, in etwa zur gleichen Zeit in das Trenngel einzutreten. Die verwendeten Gele waren 1,5 mm stark und zur Abschätzung des Molekulargewichtes wurde als Massenstandard 10 µl des PageRuler Prestained Protein Ladder [Fermentas] eingesetzt. Die Trennung erfolgte vertikal in der SDS-Gelkammer Hoefer-SE 250 bei einer Spannung von 120 V begonnen. Nach der SDS-PAGE wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen.

2.2.2.4 Silberfärbung

Die Silberfärbung zählt zu den empfindlichsten Methoden, mit denen Proteine unspezifisch angefärbt werden können. Man macht sich dabei die Affinität von Proteinen zu Silberionen und die starke autokatalytische Reduktion von Silber zu Nutze. Ag^+ -Ionen bilden nicht-stöchiometrische Komplexe mit Proteinen, indem sie mit sauren Gruppen und Sulfhydrylresten in Wechselwirkung treten. Formaldehyd, welches in der Entwicklerflüssigkeit enthalten ist, reduziert in alkalischer Lösung die an die Proteine gebundenen Ag^+ -Ionen zu Ag^0 . Die Färbung ergibt rotbraune bis schwarze spots. Mit einer Silberfärbung können noch ca. 5ng Protein pro Bande nachgewiesen werden.

Zu Beginn der Färbung wurde das SDS-Gel für mindestens 30 min im Fixierungspuffer inkubiert und anschließend für 5 min im Oxidierungspuffer geschwenkt. Danach erfolgten 7 Waschschrte mit destilliertem Wasser, wobei es wichtig ist, dass die ersten Waschschrte in sehr kurzen Zeiträumen aufeinander folgen, um den Oxidierungspuffer vollständig zu entfernen, und dass die Schritte nicht länger als 15 min dauern. Nach Zugabe des Silber-Reagenz für 20 min erfolgte ein erneuter Waschschrte mit destilliertem Wasser für 30 s. Die Detektion der Banden erfolgte durch die Zugabe der Entwicklerlösung. Nach Auftreten eines braunen Präzipitates in der Lösung sollte diese gewechselt und durch neue ersetzt werden. Nach etwa 5-10 min sollten die Banden im Gel sichtbar werden. Eine weitere Färbung kann durch das Hinzugeben der Stopplösung vermieden werden. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des GeldDoc200 [BioRad].

2.2.2.5 *Crosslinking* von Proteinen und Peptiden

Liegt zwischen 2 Proteinen eine schwache oder nur transiente Interaktion vor, kann diese durch die Verwendung eines Vernetzers (crosslinkers) stabilisiert werden. Bifunktionale Crosslinker bieten in diesem Fall mehrere Möglichkeiten, die beiden Fragmente miteinander zu verknüpfen, da sie über verschiedene Funktionalitäten an den Enden (Amine, Thiole) verfügen. Diese Funktionalitäten reagieren spezifisch mit reaktiven Gruppen in Proteinen und anzubringenden Liganden.

Bei den bifunktionalen Crosslinkern unterscheidet man zwischen homobifunktional und heterobifunktional. Homobifunktional bedeutet in diesem Fall, dass der Crosslinker zwei identische reaktive Gruppen an den Enden trägt und daher spezifisch mit zwei gleichen Funktionalitäten reagiert. Heterobifunktionale Crosslinker beinhalten dagegen zwei unterschiedliche reaktive Gruppen an den Enden und reagieren folglich spezifisch mit zwei verschiedenen Funktionalitäten. Bissulfosuccinimidylsuberat (BS^3) ist ein wasserlöslicher, nicht membrangängiger Crosslinker mit einer Länge von etwa 1,14 nm (8 Atome). Er enthält beidseitig je einen amin-reaktiven N-Hydroxysulfosuccinimidylester, der mit primären Aminen in einem Bereich von pH 7 - 9 unter Verlust von N-Hydroxysulfosuccinimid stabile Amidbindungen ausbildet. Proteine besitzen meist mehrere primäre Amine in Form von Lysinen in der Seitenkette oder am N-Terminus, die für diesen Crosslinker zugänglich sind. Durch die Na^+ -Sulfonsäuregruppen ist BS^3 sehr gut wasser- und damit auch in den gängigsten Puffern löslich.

BS^3 wurde jeweils in einer Konzentration von 20 mM eingesetzt, die Inkubation erfolgte für 1h bei RT. Durch Zugabe von 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) für 15 min bei RT wurde die crosslinking Reaktion gestoppt. Um Reste von BS^3 vollständig zu entfernen wurden die Zellen 2 Mal mit PBS „ohne“ gewaschen (2000 rpm, 5 min, RT)

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 Durchflusszytometrie

Um die Bindung von Peptiden oder Proteinen an humane PBMCs zu untersuchen, erfolgte eine Analyse der möglichen Interaktionen mittels Durchflusszytometrie (FACS). Das FACS (fluorescence activated cell sorting) ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Im Gerät befindet sich ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit, in welche die zu messende Zellsuspension eingebracht wird. Durch die höhere Geschwindigkeit der Trägerflüssigkeit vereinzeln die Zellen und werden auf diese Weise fixiert an einem Laser vorbeigeführt. Der Laser führt zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen, wie z.B. FITC, welche wiederum Licht emittieren. Die Zellen können aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften, aber auch nach morphologischen Zellparametern unterschieden werden. Die Vorwärtsstreuung (FSC= forward scatter) wird von der Größe der Zelle, die Seitwärtsstreuung (SCC = side scatter) von der Granularität der Zelle bestimmt. Die Signale werden mittels Photomultiplier verstärkt, von Detektoren gemessen und zur Auswertung auf einen Computer übertragen.

Nachdem PBMCs von gesunden Spendern isoliert und gezählt wurden, wurden jeweils 3×10^6 Zellen in 1 ml in ein Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt, für 5 min bei 500xg zentrifugiert

und in 100 µl PBS „ohne“ resuspendiert. Es wurden vier verschiedene Methoden angewandt, bei denen die Parameter Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei 4°C, Zeitdauer und Blockierung der PBMCs mit 1% Trockenmilchpulver (TMP) verändert wurden. Um die nichtgebundenen Peptide bzw. Proteinen zu entfernen, erfolgten 3 Waschschrte für jeweils 5 min bei 500xg mit 800 µl PBS „ohne“. Zur Detektion einer möglichen Bindung der Peptide an PBMCs wurde Streptavidin-FITC in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Streptavidin ist in der Lage, spezifisch an die mit Biotin gekoppelten Peptide zu binden und ermöglicht durch die Kopplung mit dem Fluorochrom FITC eine Visualisierung dieser Bindung. Die Detektion der Proteinbindung an PBMCs erfolgte mit einem monoklonalen, FITC-gelabelten- Antikörper gegen das Gluthathion-S-Transferase (GST)-Protein (1:10000), das allen untersuchten Proteinen als „tag“ angefügt wurde. Sowohl Streptavidin-FITC als auch der FITC-gelabelte Antikörper gegen GST wurden für 30 min bei 37°C inkubiert. Um nicht gebundene Streptavidin-FITC-Moleküle zu entfernen, erfolgten erneut 3 Waschschrte. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Zellen in 400 µl FACS-Puffer gelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Als Positiv- bzw. als Kalibrierungsprobe diente ein Anti-CD3-FITC-Antikörper, mit dem die PBMCs für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend wie oben beschrieben 3 mal gewaschen wurde. Danach erfolgte ebenfalls die Resuspension in FACS-Puffer. Es wurden stets 1×10^5 Zellen gemessen. Mittels der Software CellQuest Pro [BD Biosciences] wurden die Daten verarbeitet und in Microsoft Excel aufbereitet. Dabei wurden für die Dreifachansätze der Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt.

2.2.3.2 Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Als ELISA bezeichnet man ein immunologisches Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen, Viren oder auch niedermolekularen Verbindungen wie Hormonen, Toxinen oder Pestiziden. Es beruht auf der Eigenschaft von Antikörpern, spezifisch an das gesuchte Protein/Molekül zu binden. Der Nachweis dieser Interaktion erfolgt in der Regel durch einen zweiten Antikörper, an den ein Enzym (z.B. die Meerrettich-Peroxidase HRP) gekoppelt ist, welches in der Lage ist, den Umsatz eines bestimmten Substrates (z.B. Wasserstoffperoxid H_2O_2) durch einen Farbumschlag zu detektieren.

Um die IL-10, MMP-1 und TREM-1 Expression in humanen PBMCs gesunder Spender nach Inkubation mit verschiedenen Konjugaten zu untersuchen, wurden 100 µl Zellen (3×10^5 Zellen/ml) pro well in eine 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit jeweils 25 µg/ml des entsprechenden Peptides über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen für 10 min bei 2000xg wurde der Überstand abgenommen und bei -80°C zur späteren Verwendung eingefroren. Die Durchführung der 3 verwendeten ELISA-Kits erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

Interleukin-10 ELISA [BD Biosciences, San Diego, USA]

Zur Bestimmung des IL-10 Gehaltes in den Überständen wurden die wells einer Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µl *capture-antibody* in *coating buffer* üN bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde jedes well dreimal mit 300 µl Waschpuffer pro Well gewaschen und die Mikrotiterplatte auf Zellstoff ausgeschlagen, um Pufferreste zu entfernen. Nach einstündiger Inkubation mit 200 µl *assay diluent* pro Well wurden die drei Waschschrte wiederholt. Die Überstände aus der Inkubation mit PBMCs wurden aufgetaut und 100 µl pro Well aufgetragen. Als Standard wurden Verdünnungen von 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6, 7,8 und 0 pg/ml rekombinantem IL-10 pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Nach fünf Waschgängen wurde der *working detector*, der den *detection antibody* und Avidin HRP enthielt, appliziert (100 µl/Well). Es wurde 1 h bei RT inkubiert, 7 x gewaschen (Einwirkzeit jeweils 30 sek) und die Substratlösung hinzugegeben (100 µl/Well). Nach 30 min in Dunkelheit und bei RT wurden 50 µl Stopplösung in jede Vertiefung pipettiert und die Absorption am ELISA Reader Spectra Classic [Tecan] bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Referenzwert: 560 nm). Durch den Vergleich mit der Kalibriergeraden konnte der IL-10-Gehalt der Proben bestimmt werden.

MMP-1 ELISA [Raybiotech, Inc., Norcross, USA]

Mit dem MMP-1 ELISA können sowohl die Proform als auch die aktive Form von MMP-1 im Überstand detektiert werden. Da die 96-well Mikrotiterplatte bereits mit einem Antikörper gegen MMP-1 gecoated war, wurden im ersten Schritt 100 µl des Überstandes pro well aufgetragen und für 2,5 h bei 4°C inkubiert. Als Standard wurden Verdünnungen von 18000, 6000, 2000, 666,7, 222,2, 74,07, 24,69 und 0 pg/ml rekombinantem MMP-1 pipettiert. Nachdem die Mikrotiterplatte 4 Mal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen wurde und alle Pufferreste durch Aufschlagen der Platte auf Zellstoff entfernt wurden erfolgte eine einstündige Inkubation bei RT mit 100 µl des biotinylierten Detektionsantikörpers gegen MMP-1. Nach den anschließenden 4 Waschschrten erfolgte die Zugabe von 100 µl Streptavidin gekoppelt an HRP für 45 min bei RT. Durch die Bindung von Streptavidin an den biotinylierten Detektionsantikörper kann die Interaktion von Detektionsantikörper und MMP-1 nachgewiesen werden. Nach 5 weiteren Waschschrten wurden 100 µl des TMB One-Step Substrat Reagenzes in jedes well gegeben und für 30 min bei RT und Dunkelheit inkubiert. Durch die Addition von 50 µl Stopplösung wurde die Reaktion beendet. Die Auswertung des Farbumschlages erfolgte ELISA Reader Spectra Classic [Tecan] bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Referenzwert: 560 nm).

TREM-1 ELISA [R&D Systems, Minneapolis, USA]

Der TREM-1 ELISA ist in der Lage, neben der membranständigen Form auch die lösliche sTREM-1 Form zu detektieren. Da die 96-well Mikrotiterplatte bereits mit einem monoklonalen Antikörper gegen TREM-1 ge-coated war, wurden im ersten Schritt 50 µl des Überstandes pro well aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert. Als Standard wurden Verdünnungen von 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 und 0 pg/ml rekombinantem TREM-1 pipettiert. Nachdem die Mikrotiterplatte 3 Mal mit je 400 µl Waschpuffer gewaschen wurde und alle Pufferreste durch Aufschlagen der Platte auf Zellstoff entfernt wurden, erfolgte eine zweistündige Inkubation bei RT mit 200 µl eines polyklonalen, mit HRP konjugiertem Sekundärantikörper gegen MMP-1. Nach den anschließenden 5 Waschschritten erfolgte die Zugabe von 200 µl Substratlösung für 30 min bei RT und in Dunkelheit. Durch die Addition von 50 µl Stopplösung wurde die Substratumsetzung und die daraus resultierende Farbänderung beendet. Die Auswertung des Farbumschlages erfolgte ELISA Reader Spectra Classic [Tecan] bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Referenzwert: 560 nm).

2.2.3.3 Immunfluoreszenz

Mit der Immunfluoreszenz sollte untersucht werden, ob bestimmte biotinylierte Peptide, welche vom HIV-1 Transmembran-Protein abgeleitet wurden, in der Lage waren, an C8166 Zellen zu binden. Nachdem periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) von gesunden Spendern isoliert und gezählt wurden, wurden jeweils 3×10^6 Zellen in 1 ml in ein Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt, für 5 min bei 500xg zentrifugiert und in 100 µl IF-Puffer resuspendiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Peptiden (1 – 10 µg) für 30 min bei 37°C. Um die nichtgebundenen Peptide zu entfernen, erfolgten 3 Waschschrritte für jeweils 5 min bei 500xg mit 800 µl IF-Puffer. Zur Detektion einer möglichen Bindung der Peptide an PBMCs wurde Streptavidin-FITC in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Streptavidin ist in der Lage, spezifisch an die mit Biotin gekoppelten Peptide zu binden und ermöglicht durch die Kopplung mit dem Fluorochrom FITC eine Visualisierung dieser Bindung. Die Zellen wurden für 30 min mit Streptavidin-FITC bei 37°C inkubiert. Um nicht gebundene Streptavidin-FITC-Moleküle zu entfernen, erfolgten erneut 3 Waschschrritte. Nach dem letzten Waschschrtritt wurden die Zellen in 50 µl IF-Puffer resuspendiert. Zur Einbettung der Zellen wurden 20µl Zellsuspension auf einem Objektträger aufgebracht und mit 20 µl Moviol/Dapi (1:25000) [Millipore, Billerica, USA] vermischt und anschließend mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Lagerung bis zur Auswertung erfolgte in Dunkelheit für einen Zeitraum von höchstens 2-3 Wochen.

2.2.3.4 Western Blot

Proteine werden durch den Western Blot von einem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, auf der dann durch Inkubation mit Seren oder Antikörpern bestimmte Proteine aus einer Vielzahl identifiziert werden können. Das SDS-Gel sowie zwei Blotting-Filterpapiere wurden für 10 min in Transferpuffer gelegt. Die PVDF-Membran (0,2 µm) [Millipore Immobilon] wurde kurz in Methanol und danach ebenfalls für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurde der Blot-Sandwich in der Reihenfolge Anode, Blot-Papier, PVDF-Membran, SDS-Gel, Blot-Papier, Kathode in der Trans-Blot SD® Semi-Dry Transfer Cell [BioRad] aufgebaut. Diese wurde zum Übertragen der Proteine auf die Membran für 30 min auf 20 V eingestellt. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT in Blockierungspuffer geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1,5 h bei RT bzw. O/N bei 4 °C. Nach dem Waschen mit Waschpuffer (3 x 10 min) wurde für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert, nach erneutem 3 x zehninütigem Waschen erfolgte die Detektion mittels *enhanced chemoluminescence* (ECL).

Zum Nachweis von mit Antikörpern markierten Proteinen wurde das ECL Western Blotting Detection Reagents Kit von Amersham verwendet. Das im Kit enthaltene Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion) wird durch die mit den Sekundärantikörpern konjugierte *horse radish peroxidase* (HRP) und Wasserstoffperoxid oxidiert, wobei ersteres in einen angeregten Zustand versetzt wird. Die gespeicherte Energie wird in Form von Licht (Chemilumineszenz) wieder abgegeben. Die *enhanced chemiluminescence* äußert sich in verstärkter und länger anhaltender Emission von Licht, die durch Zugabe von Phenolen erreicht wird. Von den beiden in dem Kit enthaltenen Reagenzien wurde pro zu entwickelnde PVDF-Membran jeweils 1 ml miteinander vermischt. Darin wurde die Membran 1 min bei RT und Dunkelheit inkubiert und anschließend in einer Photokassette [Kodak] der CL-XPosure™ Clear Blue X-Ray Film [Pierce] aufgelegt. Dieser wurde in der Entwicklermaschine Curix 60 [Agfa] entwickelt.

2.2.4 Zellkulturtechniken

2.2.4.1 Kultivierung von C8166-Zellen

Die humane T-Zelllinie C8166 (ATCC, USA, ECACC Nummer: 88051601) enthält zwei verkürzte und ein komplettes HTLV-1 Genom. Die Deletionen der verkürzten Varianten erstrecken sich über den gag, pol, env Bereich, das komplette Genom kodiert für eine Tax-Rex mRNA mit einem verfrühten Terminationskodon, wodurch kein funktionelles Rex-Protein in der Zelllinie synthetisiert und sich keine gag oder env mRNA im Zytoplasma ansammelt. Durch die Insertion der HTLV-1 Genome wurde die Zelllinie immortalisiert. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10% FKS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 10 mM HEPES und 4 mM Glutamin. Im Abstand von 4-5 Tagen wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen inklusive Medium in ein 50 ml Falcon überführt und bei 1000xg für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden mit 10 ml PBS „ohne“ gewaschen. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung in frischem RPMI 1640 Medium und das Aussähen in der gewünschten Zellzahl. Die C8166 Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.4.2 Kultivierung von humanen PBMCs

Die frisch isolierten PBMCs wurden im Brutschrank [Sanyo Biomedical] bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Dies erfolgte in Nunclon™ delta Surface 96-Well-Platten [Nunc].

2.2.4.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der zu untersuchenden Zellsuspension mit 0,4%igen Trypanblau (Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:1 gemischt. Bei Trypanblau handelt es sich um ein negativ geladenes Chromophor, welches unspezifisch mit Proteinen interagiert. Es kann durch die defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol eindringen und dort mit intrazellulären Proteinen wechselwirken, was in einer tiefblauen Färbung der Zelle resultiert. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell, wodurch eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich ist. Die gefärbte Zellsuspension wurde auf eine Neubauerzählkammer aufgetragen und in den vier geeichten Feldern wurden die lebenden Zellen gezählt. Der Mittelwert der Zellzahlen der vier Zählkammern wird mit dem Kammerfaktor verrechnet, so dass sich die Zellkonzentration nach folgender Formel berechnen lässt:

$$Z = N \times 2 \times 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

[Z=Dichte der Zellen pro Volumen, N= Mittelwert der Zellzahlen, 2=Verdünnungsfaktor Trypanblau, 10^4 =Faktor der Neubauerzählkammer]

Die isolierten PBMCs wurden anschließend in PBMC-Nährmedium resuspendiert und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

2.2.4.4 Isolation humaner PBMCs aus Vollblut

Die Separation mononukleärer Zellen aus frischem peripheren Blut wurde mit Hilfe des Leucosep (Greiner Bio-One GmbH, Deutschland) Systems durchgeführt. Dieses System beruht auf dem Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation unter Verwendung eines Leukozytenseparationsmediums (Ficoll-Isopaque, PAA Laboratories, Pasching, Österreich). Die Lymphozyten und Monozyten sammeln sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma, Thrombozyten) und Ficoll-Isopaque an. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, die sich wegen ihrer höheren Dichte absetzen. Vor Beginn der PBMC Isolation wurden 15 ml des Separationsmediums in ein 50 ml Leucosep Röhrchen mit Filterscheibe vorgelegt und für 15 s (800xg, RT) zentrifugiert. Bis zu 30 ml mit Heparin versetztes Blut wurden vorsichtig in jeweils ein Röhrchen gegeben und für 15 min bei 800xg ohne Bremse zentrifugiert. Es ergab sich eine spezifische Schichtung der Blutbestandteile, von der die oberste Phase, das Blutplasma, abgenommen und verworfen wurde. Unter dem Plasma sammelten sich die Lymphozyten in einem Ring an, der vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues 50 ml Falcon überführt wurde. Die isolierten PBMCs wurden in 40 ml PBS „ohne“ aufgenommen und für 10 min bei 250xg zentrifugiert. Wies das daraus resultierende Zellpellet einen roten Schimmer auf, deutete dies auf eine Erythrocyten Kontamination hin. Zur Entfernung der roten Blutkörperchen wurde das Zellpellet in 10 ml 0,86%igem Ammoniumchlorid für 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen drei Mal mit PBS „ohne“ bei 250xg für 10 min gewaschen und in PBS „ohne“ resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Lebendzellzahl

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der Bindung des Isu-Peptides an humanen Immunzellen

Das Humane Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) löst in infizierten Menschen eine Immunsuppression aus, jedoch ist der Mechanismus dieser Unterdrückung des Immunsystems noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings konnte für die in der N-terminalen-Helix-Region des gp41 lokalisierte, immunsuppressive (Isu-) Domäne gezeigt werden, dass diese *in vitro* die Mitogen- und Lymphokin-abhängige Proliferation von humanen und murinen Lymphozyten (Ruegg et al. 1989, Denner et al. 1996) hemmen kann und zur Modulation der T_H1/T_H2 -Cytokinantwort im Stande ist (Denner et al. 1998). Des Weiteren konnte in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe eine Bindung des radioaktiv markierten HIV-1 Isu-Peptides an Oberflächen-Proteine von Lymphozyten detektiert werden (Denner et al. 1993, 1995), eine genauere Charakterisierung dieser Proteine war jedoch nicht möglich.

Daher wurden, um die Bindung des HIV-1 Isu-Peptides an putative Rezeptoren auf der Zelloberfläche näher zu untersuchen, periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) sowie C8166-Zellen nach Inkubation mit dem Isu-Peptid mit den Methoden der Immunfluoreszenz und der Durchflusszytometrie analysiert.

3.1.1 Immunfluoreszenzanalysen der Bindung des Isu-Peptides an C8166-Zellen

Um die mögliche Bindung des HIV-1 Isu-Peptides an einen putativen Rezeptor auf der Oberfläche der humanen T-Zelllinie C8166 näher zu untersuchen, wurden die Zellen für 1h bei 37°C mit dem biotinylierten Isu-Peptid bzw. dem randomisierten biotinylierten Isu-Peptid in 3 verschiedenen Konzentrationen (1 µg, 5 µg, 10 µg) inkubiert (siehe **2.2.3.3**). In einem zusätzlichen Ansatz wurde der Einfluss des *crosslinkings* durch Bissulfosuccinimidylsuberat (BS³) (siehe **2.2.2.5**) auf die Bindungsfähigkeit der Peptide an putative Rezeptoren näher betrachtet. Der Einsatz von *crosslinkern* kann schwache oder nur transiente Interaktionen zwischen Peptiden bzw. Proteinen stabilisieren und dadurch die Spezifität der Bindung erhöhen (Mattson et al. 1993).

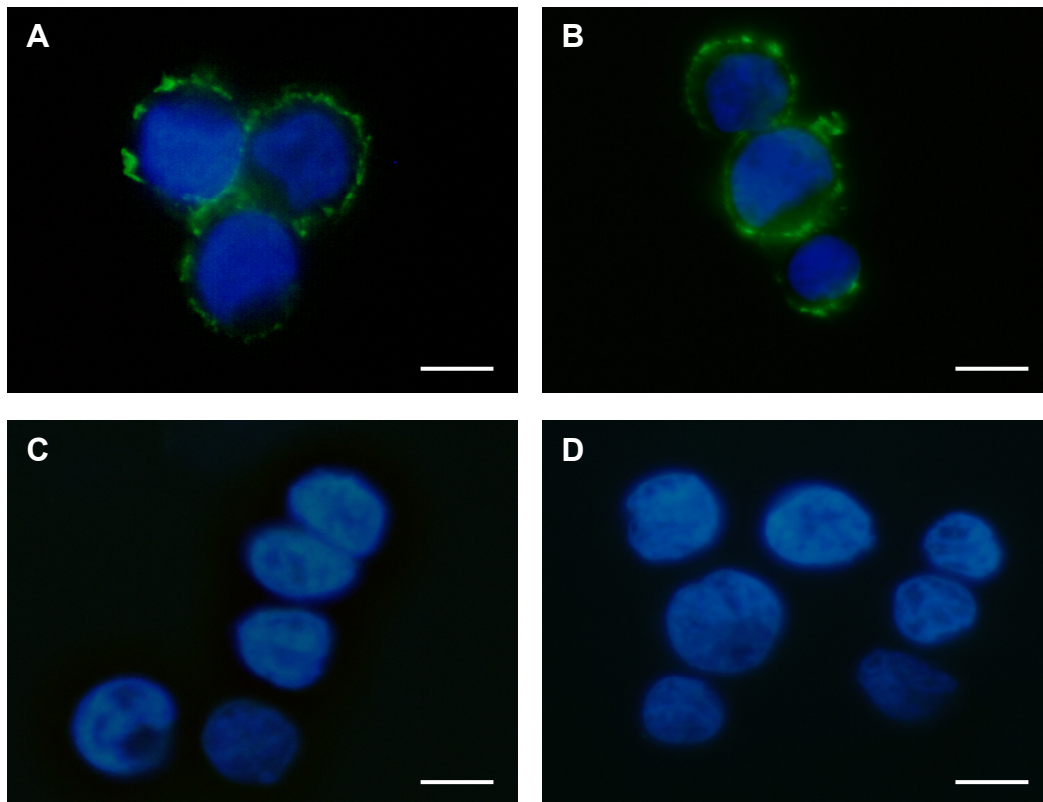


Abbildung 3.1: Bindung des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides an die Oberfläche von C8166-Zellen

C8166-Zellen wurden für 1h bei 37°C mit 10 µg des Isu-Peptid bzw. des randomisierten Isu-Peptid inkubiert. Als Negativkontrolle dienten C8166-Zellen, die ohne Peptid inkubiert wurden. Die Detektion der Peptidbindung erfolgte durch Inkubation mit Streptavidin-FITC (1:1000) für 30 min bei 37°C. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (1:25.000) sichtbar gemacht. Der Balken entspricht 5 µm.

A: Isu-Peptid; **B:** randomisiertes Isu-Peptid; **C:** Negativkontrolle (Streptavidin-FITC); **D:** Negativkontrolle (DAPI)

Es konnte kein Unterschied zwischen der Bindung des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides an C8166-Zellen detektiert werden (Abbildung 3.1). Bei beiden Peptiden konnte eine konzentrationsabhängige Bindung an der Oberfläche von C8166-Zellen detektiert werden, d.h. je mehr Peptid eingesetzt wurde, desto stärker war das FITC-Signal (Daten nicht gezeigt). Bei den beiden Negativkontrollen, bei denen die Zellen unbehandelt belassen bzw. mit Streptavidin-FITC inkubiert wurden, ist kein FITC-Signal erkennbar. Dies zeigt, dass nichtgebundene Streptavidin-FITC Moleküle durch Waschen der Zellen vollständig entfernt werden konnten. Das *crosslinking* der Peptide auf der Oberfläche der C8166-Zellen zeigte keinen Effekt (nicht dargestellt), da eine erhöhte Spezifität der Bindung des Isu-Peptides an putative Rezeptoren auf den C8166-Zellen, im Vergleich zu dem randomisierten Isu-Peptid, nicht detektiert werden konnte.

3.1.2 Quantifizierung der Bindung des Isu-Peptides an PBMCs mittels Durchflusszytometrie

Die Quantifizierung der Bindung des Isu-Peptids bzw. des randomisierten Isu-Peptides an einen putativen Rezeptor auf der Oberfläche von PBMCs wurde in einer weiteren Methode mittels Durchflusszytometrie (FACS) (siehe **2.2.3.1**) untersucht. Im Unterschied zu den bereits durchgeführten Immunfluoreszenz-Analysen mit C8166-Zellen, wurden in diesem Versuch PBMCs analysiert, da diese sich neben T-Zellen auch aus B-Zellen, natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), Monozyten und Makrophagen zusammensetzen (Bouwens et al. 2007). Des Weiteren erlaubt die Durchflusszytometrie eine quantitative Analyse der Peptidbindung an PBMCs, wodurch eventuell eine bessere Unterscheidung zwischen spezifischen Bindungen an einem putativem Rezeptor und unspezifischen Bindungen an der Zelloberfläche möglich ist. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit PBMCs von verschiedenen Spendern haben gezeigt, dass es Unterschiede gibt im Ausmaß der Interleukin-10 Sekretion nach Inkubation mit der selben Charge des Isu-Peptids. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung könnte darin liegen, dass das Isu-Peptid bei verschiedenen Spendern unterschiedlich gut an die Zelloberfläche der PBMCs bindet. Um dies genauer zu untersuchen, wurden PBMCs von drei unterschiedlichen, gesunden Spendern isoliert (siehe **2.2.4.4**) und in einem Vorversuch bei Verwendung zweier unterschiedlicher Inkubationsmethoden (Tabelle 3.1) mit jeweils 5 µg des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides inkubiert.

Tabelle 3.1: Vergleich der Inkubationsbedingungen von Methode 1 und Methode 2

Humane PBMCs gesunder Spender wurden mit jeweils 5 µg des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides nach den in der Tabelle genannten Bedingungen inkubiert. Die Absättigung mit Trockenmilchpulver (TMP) erfolgte für 30 min bei 4°C, die Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei Raumtemperatur (RT).

	Inkubationszeit [h]	Inkubations- temperatur [°C]	Absättigung mit 1% TMP	Fixierung mit 4% PFA
Methode 1	17	4	Ja	Ja
Methode 2	1	37	Nein	Nein

Neben der längeren Inkubationszeit von 17 h bei 4°C, zeichnet sich Methode 1 auch durch eine zusätzliche Absättigung der PBMCs mit 1% Trockenmilchpulver (TMP) für 30 min bei 4°C sowie eine anschließende Fixierung mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei Raumtemperatur (RT) aus. Das Absättigen mit TMP dient zur Reduzierung unspezifischer Bindungen, PFA reagiert mit primären Aminogruppen sowie einer Gruppe von Aminosäure-Seitenkettengruppen (Amiden, aromatische Ringen, Guanidin-Gruppen, Sulfhydryl-Gruppen)

(Larsson et al. 1988) und sorgt daher für eine Quervernetzung der Oberflächenproteine sowie der zellulären Proteine und damit für eine strukturelle und metabolische Präservierung der Zelle in ihrem „Ist“-Zustand. Eventuelle Veränderungen der Oberflächenstruktur der PBMCs durch anschließende Behandlungen können durch eine Fixierung daher minimiert bzw. ausgeschlossen werden.

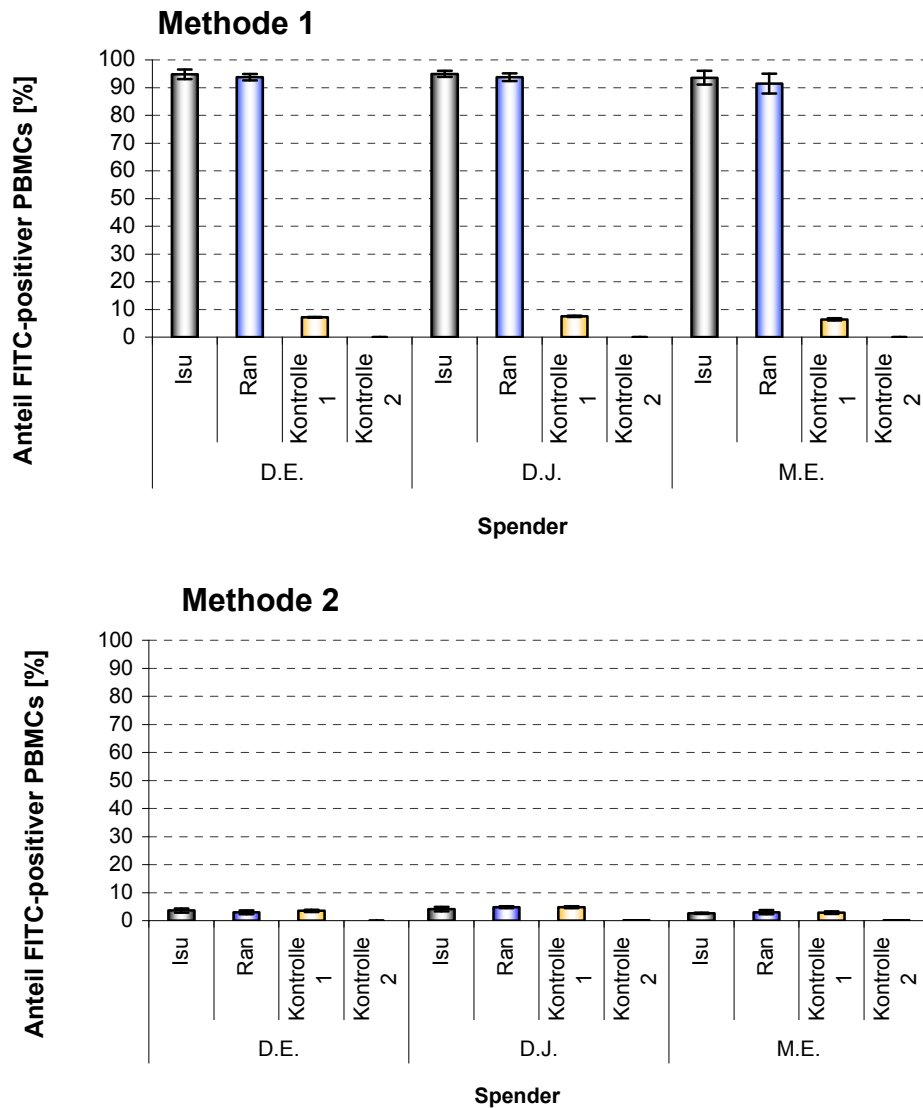


Abbildung 3.2: Vergleich der Bindung des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides an die Oberfläche von PBMCs bei Verwendung verschiedener Methoden

Humane PBMCs von 3 verschiedenen, gesunden Spendern, wurden mit dem Isu-Peptid bzw. dem randomisierten Isu-Peptid inkubiert. **Methode 1** = Inkubation der PBMCs für 17h bei 37°C mit 5 µg des Isu-Peptides (Isu) bzw. des randomisierten Isu-Peptides (Ran). Vor der Zugabe der Peptide wurden die Zellen mit 1% Trockenmilchpulver für 30 min bei 4°C abgesättigt und anschließend mit 4% Paraformaldehyd für 30 min bei RT fixiert. **Methode 2** = Inkubation der PBMCs für 1h bei 37°C mit 5 µg des Isu-Peptides (Isu) bzw. des randomisierten Isu-Peptides (Ran). Als Negativkontrolle dienten PBMCs, die nur mit Streptavidin-FITC (Kontrolle 1) inkubiert wurden bzw. unbehandelte PBMCs (Kontrolle 2). Die Detektion der Peptidbindung erfolgte mittels Streptavidin-FITC (1:1000). Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate ± SD.

Im Vergleich zu Methode 2 konnte bei Methode 1 (Abbildung.3.2) eine wesentlich höhere Bindung der Peptide an die PBMCs erzielt werden. So lag der Anteil der FITC-positiven PBMCs (Isu, Ran) bei mehr als 90 %, im Gegensatz zum FITC-background (Kontrolle 1), der zwischen 7 % - 9 % lag. Zwischen der Bindung von Isu und Ran an PBMCs war kein Unterschied zu erkennen, ebenso waren keine Unterschiede in der Peptidbindung zwischen den einzelnen Spendern erkennbar. Unbehandelte PBMCs (Kontrolle 2) wiesen kein FITC-Signal auf.

Bei Inkubation der Peptide nach Methode 2 konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Bindung des Isu-Peptids bzw. des randomisierten Isu-Peptids an PBMCs detektiert werden. Allerdings war der Anteil der PBMCs mit gebundenen Peptiden mit ungefähr 5 % ebenso hoch wie der Anteil der PBMCs, die nur mit Streptavidin-FITC inkubiert wurden (Kontrolle 1). Aufgrund dessen kann bei Methode 2 eine Aussage über die Spezifität der Peptidbindungen nur beschränkt geleistet werden. Unbehandelte PBMCs (Kontrolle 2) wiesen kein FITC-Signal auf, ebenso konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Bindung der Peptide bei der Verwendung von PBMCs von unterschiedlichen Spendern erkannt werden.

Um den Einfluss des Absättigens der PBMCs durch 1% Trockenmilchpulver (TMP) in Bezug auf die Peptidbindung genauer zu untersuchen, wurden die beiden vorher verwandten Methoden variiert (Tabelle 3.2). In Methode 3 wurden PBMCs mit 4% Paraformaldehyd für 30 min bei RT fixiert, danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Peptiden für 17h bei 4°C, eine Absättigung mit 1% TMP wie bei Methode 1 erfolgte nicht. Bei der Inkubation der Peptide nach Methode 4 erfolgte im Gegensatz zu Methode 2 eine Absättigung der PBMCs mit 1% Trockenmilchpulver (TMP) für 30 min bei 4°C

Tabelle 3.2: Vergleich der Inkubationsbedingungen von Methode 1-4

Humane PBMCs gesunder Spender wurden mit jeweils 5 µg des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides nach den in der Tabelle genannten Bedingungen inkubiert. Die Absättigung mit Trockenmilchpulver (TMP) erfolgte für 30 min bei 4°C, die Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei Raumtemperatur (RT).

	Inkubationszeit [h]	Inkubations- temperatur [°C]	Absättigung mit 1% TMP	Fixierung mit 4% PFA
Methode 1	17	4	Ja	Ja
Methode 2	1	37	Nein	Nein
Methode 3	17	4	Nein	Ja
Methode 4	1	37	Ja	Nein

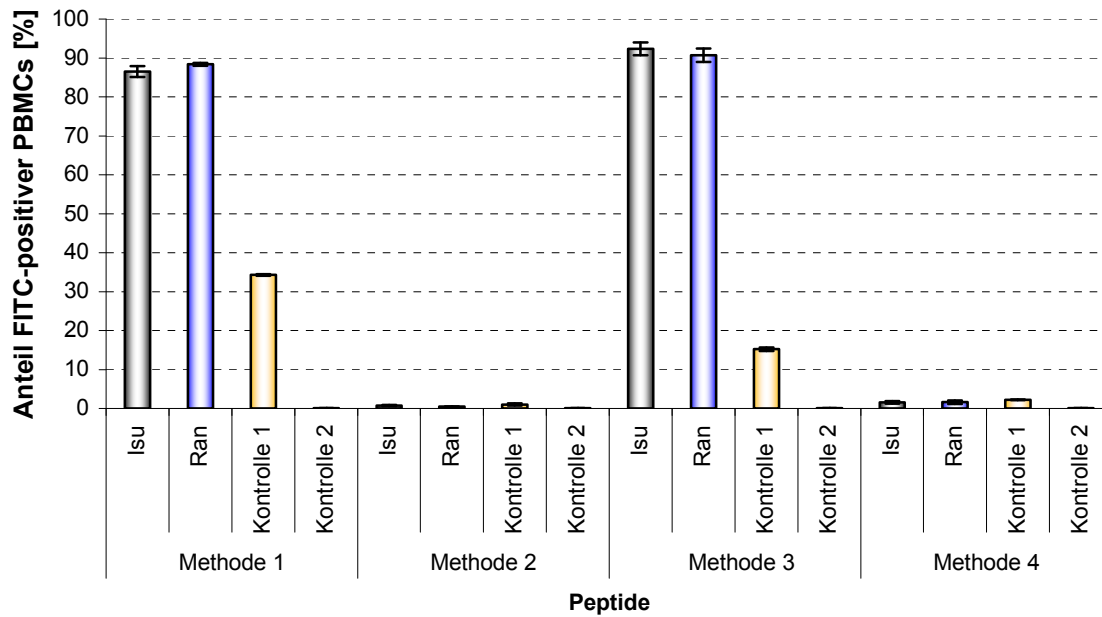


Abbildung 3.3: Quantifizierung der Bindung des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides an die Oberfläche von PBMCs mittels Durchflusszytometrie

PBMCs wurden nach 4 verschiedenen Methoden mit 5 µg des Isu-Peptides (Isu) bzw. des randomisierten Isu-Peptides (Ran) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten PBMCs, die nur mit Streptavidin-FITC (Kontrolle 1) inkubiert wurden bzw. unbehandelte PBMCs (Kontrolle 2). Die Detektion der Peptidbindung erfolgte mittels Streptavidin-FITC (1:1000). Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate ± SD.

Methode 1: Absättigung der PBMCs mit 1% Trockenmilchpulver für 30 min bei 4°C, Fixierung der PBMCs mit 4% Paraformaldehyd für 30 min bei RT, Inkubation der Peptide für 17h bei 4°C; **Methode 2:** Inkubation der Peptide für 1h bei 37°C; **Methode 3:** Fixierung der PBMCs mit 4% Paraformaldehyd für 30 min bei RT Inkubation der Peptide für 17h bei 4°C; **Methode 4:** Absättigung der PBMCs mit 1% Trockenmilchpulver für 30 min bei 4°C, Inkubation der Peptide für 1h bei 37°C.

Der Vergleich von Methode 1 mit Methode 3 (Abbildung. 3.3) zeigte, dass das zusätzliche Absättigen der PBMCs mit TMP zu einer etwas geringeren Bindung der Peptide an die Zellen führte (von über 90 % bei Methode 3 zu unter 90 % bei Methode 1). Dieser Effekt war auch beim Vergleich von Methode 2 zu Methode 4 erkennbar. Des Weiteren erhöhte sich durch die Zugabe von Trockenmilchpulver der FITC-Hintergrund (Kontrolle 1) von ungefähr 15 % bei Methode 3 auf 35 % bei Methode 1. Die bei Methode 1 und 3 verwendete Inkubationszeit der Peptide von 17h führt zu einem Anteil der FITC-positiven PBMCs von ungefähr 90 %, die Inkubation über 1h zu einem Wert von unter 5 %. Zwischen der Bindung von Isu und Ran an PBMCs konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden, unbehandelte PBMCs (Kontrolle 2) wiesen kein FITC-Signal auf.

Um den Einfluss der Inkubationszeit der Peptide auf die Peptidbindung genauer zu untersuchen, wurde eine Kinetik über einen Zeitraum von 17h durchgeführt (Abbildung. 3.4). Die Inkubation der PBMCs erfolgte nach Methode 1, d.h. PBMCs wurden über einen Zeitraum von 17h bei 37°C mit 5 µg des Isu-Peptides (Isu) bzw. des randomisierten Isu-Peptides (Ran) inkubiert. Vor der Zugabe der Peptide wurden die Zellen mit 1%

Trockenmilchpulver für 30 min bei 4°C abgesättigt und anschließend mit 4% Paraformaldehyd für 30 min bei RT fixiert.

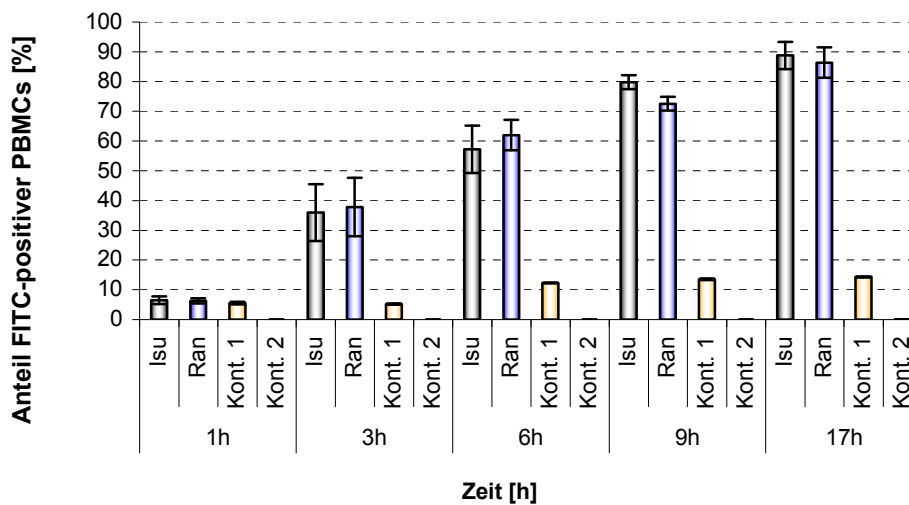


Abbildung 3.4: Kinetik der Bindung des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides an die Oberfläche von PBMCs mittels Durchflusszytometrie über einen Zeitraum von 17h

Humane PBMCs eines gesunden Spenders wurden über einen Zeitraum von 17h bei 37°C mit 5 µg des Isu-Peptides (Isu) bzw. des randomisierten Isu-Peptides (Ran) inkubiert. Vor der Zugabe der Peptide wurden die Zellen mit 1% Trockenmilchpulver für 30 min bei 4°C abgesättigt und anschließend mit 4% Paraformaldehyd für 30 min bei RT fixiert. Als Negativkontrolle dienen PBMCs, die nur mit Streptavidin-FITC (Kontrolle 1) inkubiert wurden bzw. unbehandelte PBMCs (Kontrolle 2). Die Detektion der Peptidbindung erfolgte mittels Streptavidin-FITC (1:1000). Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate ± SD.

Es zeigte sich, dass der Anteil der FITC-positiven PBMCs mit der Inkubationszeit anstieg, von einem anfänglichen Wert von ungefähr 7 % bis auf einen Prozentsatz von ungefähr 90 nach 17h. Zwischen der Bindung von Isu und Ran an PBMCs zeigte sich bis auf den 9h-Wert, bei dem der Anteil der FITC-positiven Zellen nach Inkubation mit dem Isu-Peptid mit 80 % ungefähr 8 % höher als der Ran-Wert lag, kein signifikanter Unterschied. Der FITC-background (Kontrolle 1) stieg von einem anfänglichen Wert von 6 % nach 1h bis auf einen Wert von 15 % nach 17h kontinuierlich an, unbehandelte PBMCs (Kontrolle 2) wiesen kein FITC-Signal auf.

3.1.3 Quantifizierung der Bindung des Konstruktes $\Delta E1$ NHR-4H an PBMCs mittels Durchflusszytometrie

In den vorherigen Immunfluoreszenz- und FACS-Analysen wurde die Bindung der immunsuppressiven (Isu-) Domäne des gp41 mit Hilfe eines 17 Aminosäuren umfassenden, synthetisch hergestellten, Peptids untersucht (siehe 3.1.1, 3.1.2). Um zu analysieren, ob für eine Interaktion der Isu-Domäne an einen putativen Rezeptor auf der Zelloberfläche von PBMCs eventuell eine längere Peptidsequenz vorhanden sein muss, wurde das Konstrukt

Δ E1 NHR-4K untersucht. Δ E1 NHR-4K setzt sich aus der N-terminalen-Helixregion (NHR) des gp41, welche auch die Isu-Domäne beinhaltet, zusammen, besitzt allerdings das Epitop E1 nicht mehr (Abbildung 3.5).

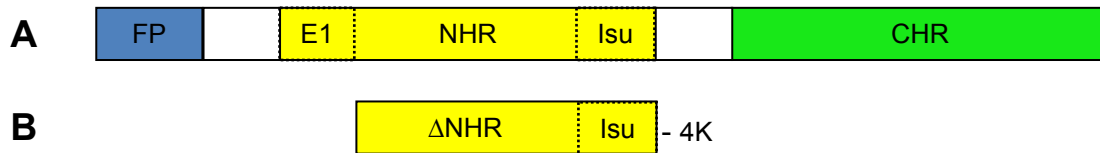


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der gp41-Ektodomäne und der daraus abgeleiteten Deletionsmutante Δ NHR-4K

A: gp41-Ektodomäne, **B:** Deletionsmutante Δ NHR-4K, FP = Fusionspeptid, E1 = Epitop E1, NHR = N-terminale Helixregion, Isu = immunsuppressive Domäne, CHR = C-terminale Helixregion.

Das Konstrukt Δ E1 NHR-4K wurde von der Arbeitsgruppe bereit gestellt, die Reinheit wurde zuvor in einem Silbergel bestätigt (nicht dargestellt). Aufgrund der Klonierung von Δ E1 NHR-4K in den Vektor pGexKG besaß das Konstrukt einen GST-tag. Daher wurden PBMCs ebenfalls mit GST inkubiert um auszuschließen, dass die Bindung von Δ E1 NHR-4K an PBMCs durch GST vermittelt wurde. GST wurde mit Hilfe des GST Spin Purification Kit aufgereinigt, die Expression erfolgte im *E.coli* Stamm BL21 (siehe 2.2.1.2). Die Überprüfung der Expression des GST erfolgte mittels eines Silbergels (Abbildung 3.6).

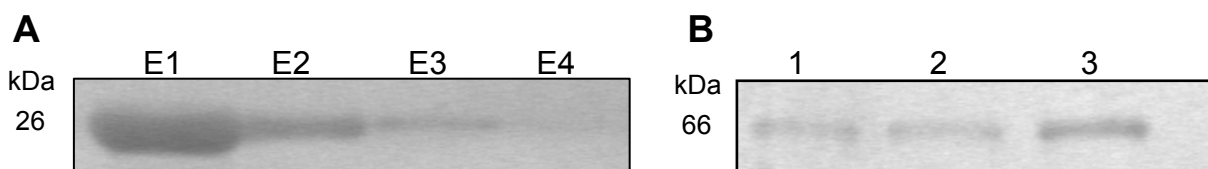


Abbildung 3.6: Silbergel zur Überprüfung der Expression von GST

A: GST-Aufreinigung, das gebundene GST wurde in 4 Elutionsschritten von der Säule gelöst: E1 = Eluat 1, E2 = Eluat 2, E3 = Eluat 3, E4 = Eluat 4. **B:** BSA-Kontrolle, 1 = 400 ng, 2 = 800 ng, 3 = 1600 ng

Die Aufreinigung von GST war erfolgreich, es konnten Banden auf der erwarteten Höhe von 26 kDa detektiert werden. Der Vergleich der Intensität der GST-Banden (A) mit den BSA-Kontrollen (B) lässt einen Rückschluss auf die Proteinkonzentration zu. Spur 3 in Abbildung 3.5 B repräsentiert eine Konzentration von 800 ng/ml, was in etwa der Konzentration von Eluat 2 in Abbildung A entspricht. Zusätzlich erfolgte eine Konzentrationsbestimmung im NanoDrop Spectrophotometer ND-1000. Dabei ergaben sich folgende Konzentrationen: E1 = 2,9 mg/ml, E2 = 1,2 mg/ml, E3 = 0,9 mg/ml, E4 = 0,05 mg/ml.

Zur Detektion der Bindung von Δ E1 NHR-4K bzw. GST an PBMCs wurden FITC-markierte Antikörper gegen GST (Anti-GST-FITC) verwendet. Die Quantifizierung der putativen Bindung an einen Rezeptor erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 3.7).

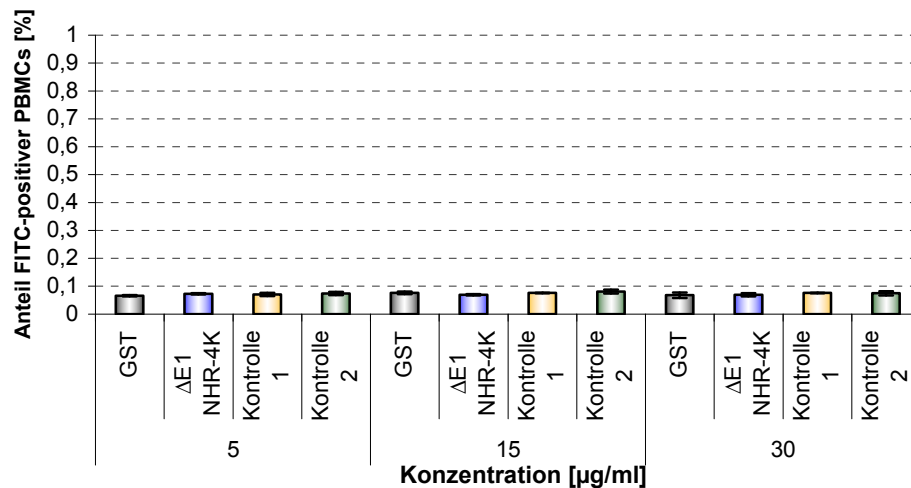


Abbildung 3.7: Quantifizierung der Bindung des Konstruktes $\Delta E1$ NHR-4K bzw. von GST an die Oberfläche von humanen PBMCs mittels Durchflusszytometrie

Humane PBMCs gesunder Spendern wurden für 1h bei 37°C mit 5, 15 und 30 µg der Proteine $\Delta E1$ NHR-4K bzw. GST inkubiert. Die Detektion der Proteinbindung erfolgte mittels eines gegen GST gerichteten, FITC-gelabelten, Antikörpers (Anti-GST-FITC; 1:10.000). Als Negativkontrolle dienten PBMCs, die nur mit Anti-GST-FITC (Kontrolle 1) inkubiert wurden bzw. unbehandelte PBMCs (Kontrolle 2). Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate \pm SD.

Weder bei $\Delta E1$ NHR-4K noch bei GST war eine Bindung an PBMCs detektierbar. Auch die Erhöhung der Proteinkonzentration von 5 µg/ml auf 15 µg/ml bzw. 30 µg/ml zeigte keinen Effekt. Der Anteil der FITC-positiven PBMCs lag unter einem Prozentwert von 0,1 und war damit genauso hoch wie die beiden Kontrollen, bei denen PBMCs nur mit Anti-GST-FITC inkubiert wurden bzw. unbehandelt gemessen wurden. Zur besseren Darstellung dieser geringen Bindung wurde die Skalierung im Vergleich zu den vorherigen FACS-Analysen, von einem Maximum von 100% auf einen maximalen Wert von 1% herabgesetzt.

3.2 Gewinnung und Charakterisierung von Peptid-Polymeren

Da die Peptid-Monomere des HIV-1 Isu-Peptids nicht hemmend auf die Proliferation immunkompetenter Zellen wirken (Denner et al. 1994), wurden diese zur Erlangung einer biologisch aktiven Konformation mittels EDC zu Peptid-Homopolymeren gekoppelt (siehe **2.2.2.1**). Die durchschnittliche Kopplungseffizienz lag bei 20 % und wurde mit Hilfe der Pierce-Proteinbestimmung ermittelt. Im Anschluss wurden die gekoppelten Homopolymere per SDS-PAGE (siehe **2.2.2.3**) und Western Blot (siehe **2.2.2.6**) untersucht.

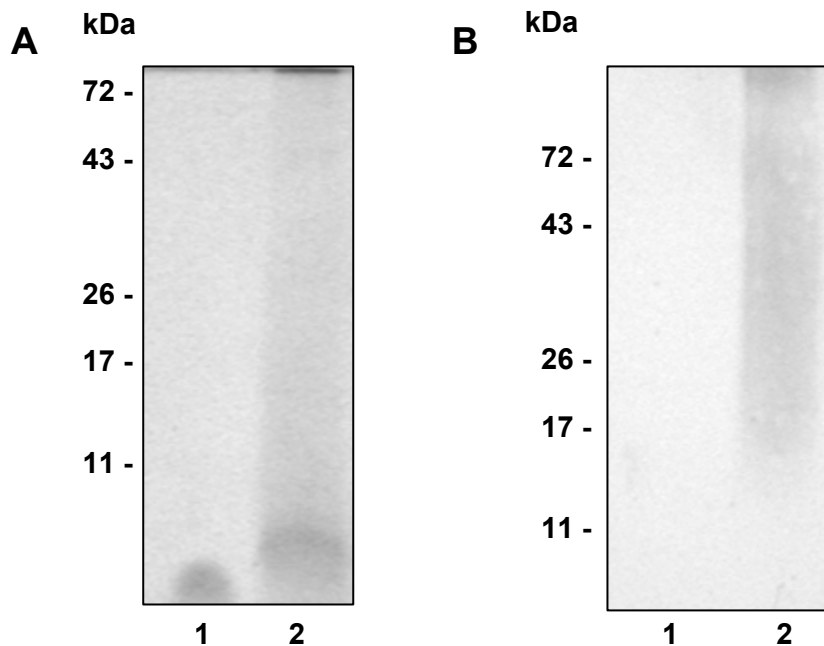


Abbildung 3.8: Exemplarische Darstellung der Peptid-Homopolymere mittels SDS-PAGE (A) und Western Blot (B)

1: HIV Isu Peptid-Monomer, 2: HIV Isu Peptid-Homopolymer, M: Marker

A: Coomassie-Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel, B: Western Blot eines HIV Isu Peptid-Homopolymer Kopplungsansatzes.

pAK: Ziege 1 (1:250), sAK: Anti-Ziege (1:3000)

Spur 1 (Abbildung 3.8 A) zeigt das HIV-Isu Peptid Monomer. Es wurde eine Bande im niedermolekularen Bereich detektiert, die der berechneten Größe von 2,3 kDa entspricht. Bei der Kopplung des HIV-Isu Peptid-Monomers zu Homopolymeren lag der Großteil der Peptide als niedermolekulare Polymere bzw. ungekoppelt vor (Abbildung 3.8 A, Spur 2). Die hochmolekularen Strukturen konnten erst im Western Blot visualisiert werden (Abbildung 3.8 B, Spur 2). Das spezifische Ziegen Serum 1 (Ziege 1) interagiert vorwiegend mit hochmolekularen Isu-Peptid Polymeren, da es gegen das HIV Isu-Peptid, gekoppelt an den Carrier KLH (Keyhole limpet haemocyanin), induziert wurde.

3.3 Einfluss der HIV Isu- und HIV Ran-Polymere auf die IL-10 Sekretion und die IL-10 Genexpression humaner PBMCs *in vitro*

Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit PBMCs von verschiedenen Spender haben die Vermutung nahe gelegt, dass es Unterschiede gibt, im Ausmaß der Interleukin-10 (IL-10) Sekretion nach Inkubation mit der selben Charge des Isu-Peptids. Um den Einfluss der Verwendung von PBMCs verschiedener Spender näher zu untersuchen, wurden PBMCs von 3 verschiedenen, gesunden Spendern isoliert (siehe **2.2.4.4**) und mit dem HIV-1 Isu-Heteropolymer K156 (siehe **2.1.4**) bzw. dem randomisierten HIV-1 Isu-Homopolymers K87 inkubiert (siehe **2.2.2.1**). Als Kontrolle dienten PBMCs, die ohne Peptide inkubiert wurden. In

einem anschließenden ELISA (siehe **2.2.3.2**) wurde die Konzentration an Interleukin-10 im Zellkulturüberstand bestimmt. Es konnte ein spenderabhängiger Effekt in der IL-10 Sekretion nach Inkubation mit dem Isu-Peptid (K156) erkannt werden (Abbildung 3.9).

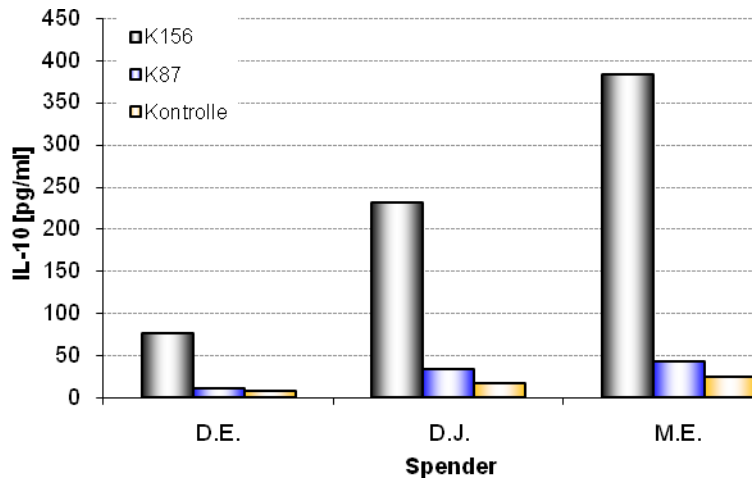


Abbildung 3.9: Analyse der IL10 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Peptid bzw. dem randomisierten HIV Isu-Peptid mittels ELISA

PBMCs von 3 verschiedenen, gesunden Spendern (D.E., D.J., M.E.) wurden für 24h mit den HIV-Isu-Homopolymer (K156) bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer (K87) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Die Konzentration an Interleukin-10 im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt.

Der IL-10 Gehalt bei Spender D.E. lag bei 75 pg/ml, der Gehalt an IL-10 bei Spender D.J. war mit 240 pg/ml mehr als drei Mal höher. Im Vergleich dazu fand sich der höchste IL-10 Gehalt mit 380 pg/ml bei Spender M.E. Unbehandelte PBMCs (Kontrolle) bzw. PBMCs, die mit dem randomisierten Isu-Peptid inkubiert wurden (K87), wiesen nur geringe Level an IL-10 auf (unter 50 pg/ml).

Um die Expression von IL-10 in PBMCs nach Inkubation mit dem Isu-Peptid bzw. dem randomisierten Isu-Peptid genauer zu untersuchen, wurden Kinetiken mit 9-12 Messpunkten über einen Zeitraum von 24h durchgeführt. Dazu wurden PBMCs von 2 verschiedenen, gesunden Spendern verwendet, bei Spender M.E. erfolgte die Blutspende zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten. In einem anschließenden ELISA (siehe **2.2.3.2**) wurde die Konzentration an Interleukin-10 im Zellkulturüberstand bestimmt (Abbildung 3.10).

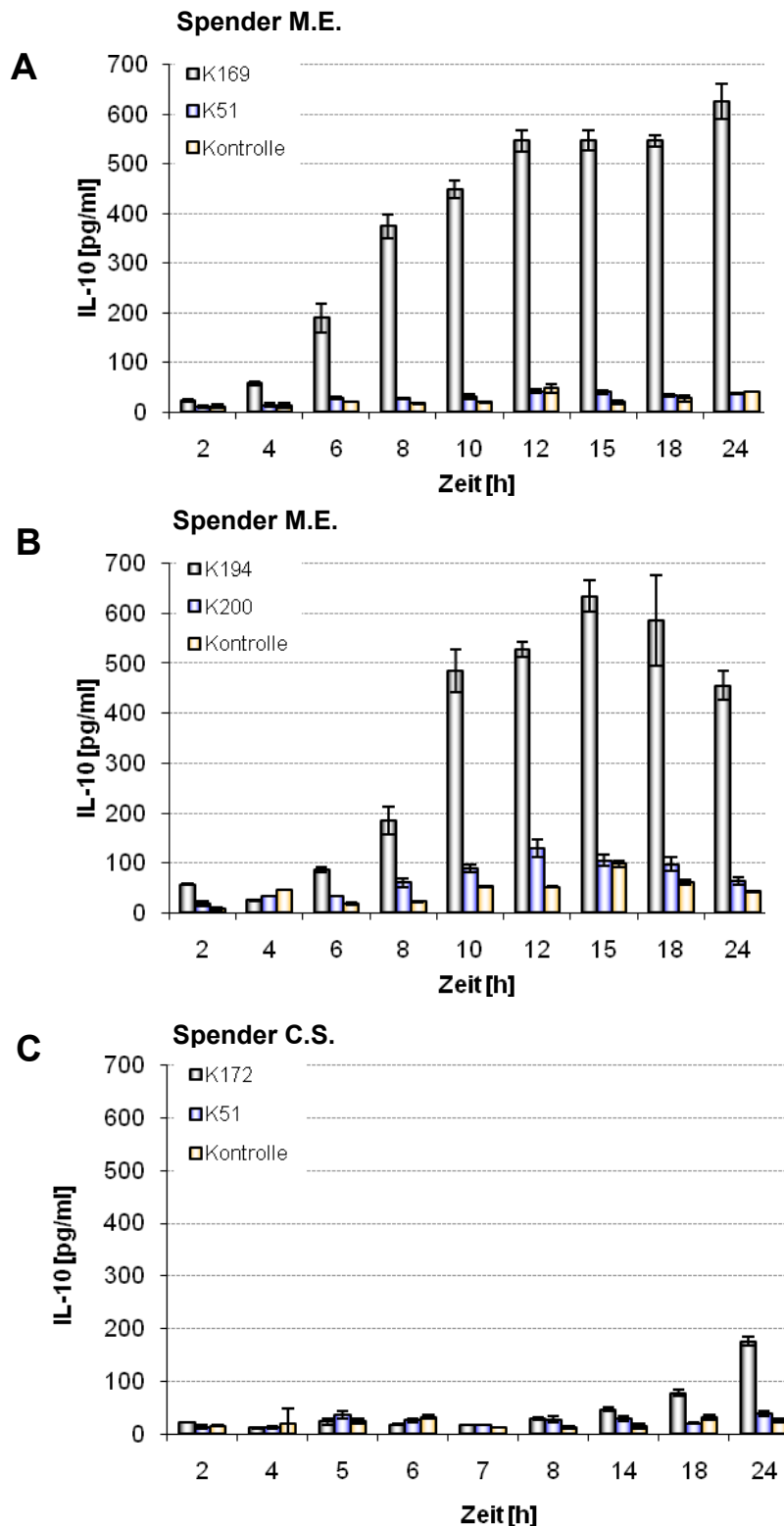


Abbildung 3.10: Analyse der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV-Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer über einen Zeitraum von 24h mittels ELISA

PBMCs von 2 verschiedenen, gesunden Spendern (M.E.: **A** und **B**; C.S.: **C**) wurden über einen Zeitraum von 24h mit den HIV-Isu-Homopolymeren (K169, K172, K194) bzw. den randomisierten HIV-Isu-Homopolymeren (K51, K200) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Die Konzentration an Interleukin-10 im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate \pm SD.

Der Schwellenwert für eine positive IL-10 Antwort wurde auf 30 pg/ml festgelegt, da dies der Mittelwert aller gemessenen Kontrollen nach Addition der Standardabweichungen war.

In Kinetik A wurden PBMCs von Spender M.E. mit dem Isu-Peptid Homopolymer (K169) bzw. dem randomisierten Isu-Peptid Homopolymer (K51) über einen Zeitraum von 24h behandelt. Nach Inkubation mit dem Isu-Peptid stieg die IL-10 Sekretion bis Stunde 12 kontinuierlich auf einen Wert von 550 pg/ml an, verblieb dann bis Stunde 18 auf diesem Niveau, nach 24h wurde der Höchstwert von 620 pg/ml erreicht. Die Inkubation der PBMCs mit dem randomisierten Isu-Peptid resultierte, wie die unbehandelten PBMCs, in einer geringen Interleukin-10 Sekretion von maximal 50 pg/ml.

Bei Inkubation der PBMCs von Spender M.E. zu einem späteren Zeitpunkt mit einem anderen Isu Peptid Homopolymer (K194) und einem anderen randomisierten Isu-Peptid Homopolymer (K200) ergab sich ein leicht verändertes IL-10 Sekretionsmuster (Abbildung 3.10 B). Die Inkubation mit dem Isu-Peptid führte zu einem Maximum des IL-10 Gehaltes von 620 pg/ml nach 15h, danach erfolgte eine kontinuierliche Abnahme bis auf einen IL-10 Wert von 460 pg/ml nach 24h. Die Inkubation mit dem randomisierten Isu-Peptid zeigte einen leichten Anstieg des IL-10 Gehaltes bis auf ein Maximum von 120 pg/ml nach 12h.

Spender C.S. wies nach Inkubation mit dem Isu-Peptid Homopolymer (K172) bzw. dem randomisierten Isu-Peptid Homopolymer (K51) die geringste IL-10 Sekretion auf. Der Höchstwert wurde nach 24h mit 180 pg/ml erreicht, der erste signifikante Anstieg konnte nach 18h mit einer IL-10 Konzentration von 90 pg/ml beobachtet werden. Unbehandelte PBMCs sowie PBMCs, die mit K51 inkubiert wurden, wiesen maximale IL-10 Sekretion von 40 pg/ml auf.

Obwohl die IL-10 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand, wie bereits gezeigt, durch Inkubation von PBMCs mit dem Isu-Peptid anstieg, konnte IL-10 auf mRNA-Ebene nicht unter den 444 im Microarray hochregulierten Genen detektiert werden. Allerdings spiegelte der Microarray das Expressionsprofil der PBMCs nach 24h wieder, daher sollten die Ergebnisse neben Messungen nach 24h durch Kinetiken ergänzt werden (Abbildung 3.11).

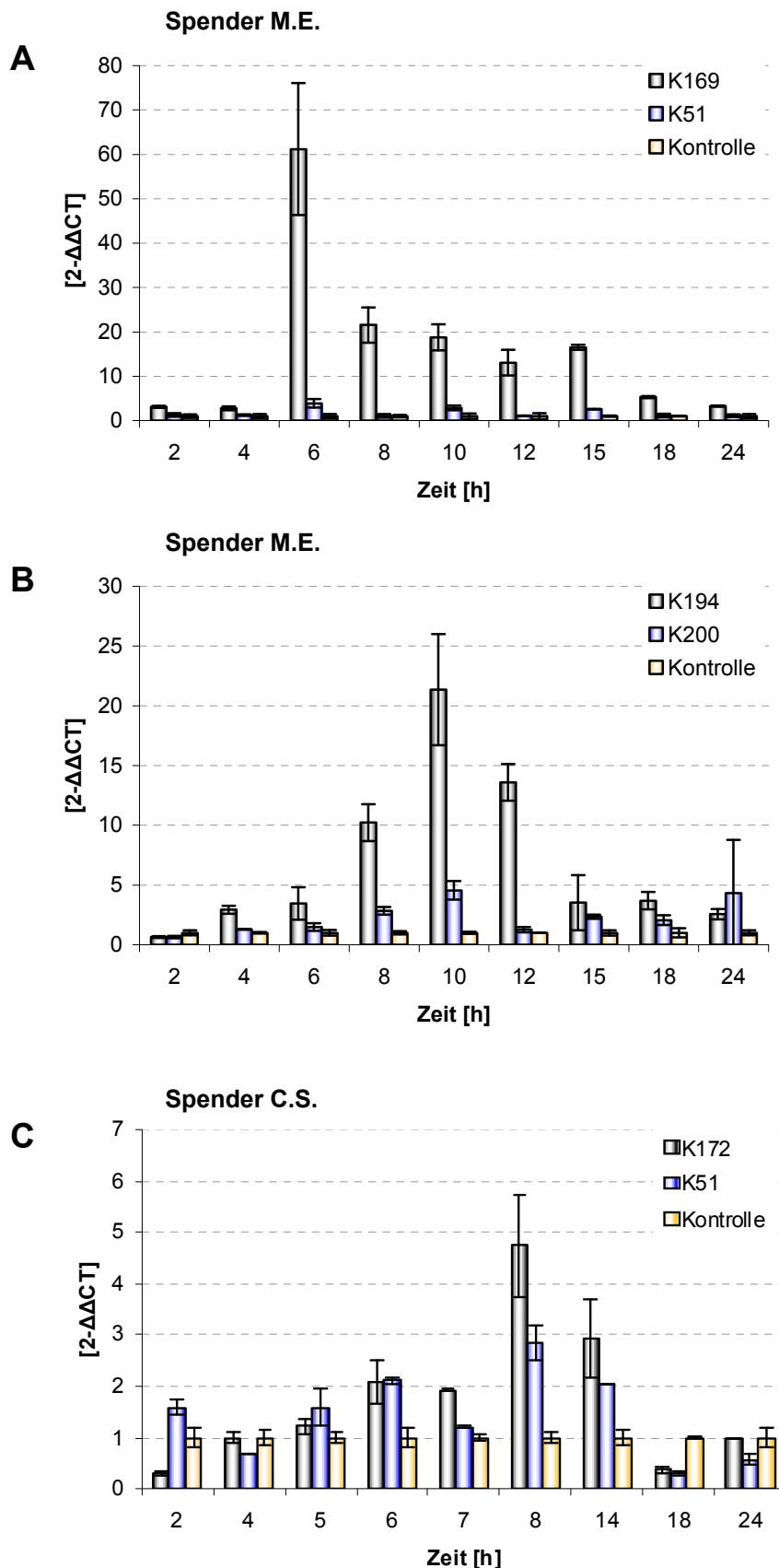


Abbildung 3.11: Kinetik der IL-10 Transkription humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV-Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer über 24h mittels real time PCR

PBMCs von 2 verschiedenen, gesunden Spendern (M.E.: **A** und **B**; C.S.: **C**) wurden über einen Zeitraum von 24h mit den HIV-Isu-Homopolymeren (K169, K172, K194) bzw. den randomisierten HIV-Isu-Homopolymeren (K51, K200) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate \pm SD.

Nach Inkubation mit dem Isu-Peptid wurde im Zeitraum bis 4h in Kinetik A nur eine geringe IL-10 Expression gemessen, die höchste Expression von IL-10 konnte nach 6h beobachtet werden (Abbildung 3.11 A). Diese war im Vergleich zu unbehandelten PBMCs um das 60-fache erhöht. In der Folge nahm die IL-10 Expression ab, bis sie nach 24 h wieder das Ausgangsniveau erreichte. Die Inkubation der PBMCs mit dem randomisierten Isu-Peptid resultierte in einer geringen Interleukin-10 Expression mit einer maximalen Hochregulation um den Faktor 4 nach 6h.

Bei Inkubation der PBMCs von Spender M.E. zu einem späteren Zeitpunkt mit einem anderen Isu Peptid (K194) sowie einem anderen randomisierten Isu-Peptid (K200) ergab sich ein leicht verändertes IL-10 Expressionsprofil (Abbildung 3.11 B). Die Inkubation mit dem Isu-Peptid führte zu einem kontinuierlichen Anstieg der IL-10 Expression, bis nach 10h eine maximale Hochregulation um das 21-fache erreicht wurde. Danach erfolgte eine kontinuierliche Abnahme bis auf einen Wert von 2,5 nach 24h. Die Inkubation mit dem randomisierten Isu-Peptid zeigte eine leichte Hochregulation der IL-10 Expression mit einer maximalen Hochregulation um das 4,5-fache nach 10h.

Spender C.S. wies nach Inkubation mit dem Isu-Peptid (K172) eine geringe Hochregulation der IL-10 Genexpression um einen maximalen Faktor von 4,6 nach 8h auf. Mit Ausnahme des 14h Wertes, bei dem noch eine Hochregulation um das 3-fache zu erkennen war, wurde bei den restlichen Zeitpunkten keine signifikant erhöhte Expression von IL-10 detektiert. Die Inkubation mit dem randomisierten Isu-Peptid führte zu einer maximalen Hochregulation um den Faktor 2,8 nach 8h.

Vergleicht man die IL-10 Genexpression nach Inkubation mit den jeweiligen Isu-Peptiden in den drei verschiedenen Kinetiken, so ist zu erkennen, dass der Höchstwert der IL-10 Expression jeweils in einem Zeitrahmen zwischen 6 und 10 Stunden erfolgte. Bei Inkubation von PBMCs mit dem randomisierten Isu-Peptid wurde keine signifikante Erhöhung der Interleukin-10 Genexpression im Vergleich zu unbehandelten PBMCs beobachtet.

3.4 Einfluss der HIV Isu- und HIV Ran-Polymere auf die Genexpression von MMP-1 und TREM-1 in humanen PBMCs

In einem von der Arbeitsgruppe durchgeführten Microarray konnte gezeigt werden, dass das HIV Isu-Peptid in der Lage ist, die Genexpression von über 400 Genen hochzuregulieren. Unter den 25 am stärksten hochregulierten Genen fanden sich TREM-1 und MMP-1. In einem von der Arbeitsgruppe durchgeführten *yeast two-hybrid* screening konnte TREM-1 als putativer Interaktionspartner der auf gp41 basierenden Konstrukte Δ NHR und Δ rgp identifiziert werden. Das Konstrukt Δ NHR umfasst nur die NHR-Region mit der Isu-Domäne,

Δ rgp enthält zusätzlich den Cys-loop so wie die CHR-Region. Bei TREM-1 handelt es sich um einen Oberflächenrezeptor, der vor allem auf Neutrophilen und Monozyten exprimiert wird (Schenk et al. 2007) und deshalb eine Rolle bei der Immunantwort spielt. MMP-1 könnte als extrazelluläres Protein eine Rolle bei der Immunpathogenese von HIV spielen, Interaktionen von MMP-1 mit dem Tat-Protein von HIV-1 konnten bereits beobachtet werden (Rumbaugh et al. 2007). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass MMP-1 am shedding von TREM-1 auf der Zelloberfläche und damit an der Herstellung des löslichen sTREM-1 beteiligt ist (Gomez-Pina et al. 2007).

In den durchgeführten real time PCR Analysen wurden jeweils zwei Primerpaare gleichzeitig verwendet. Neben den Primern für das Gen, dessen Expression untersucht werden sollte (Fam), wurden auch Primer für das *house-keeping* Gen GAPDH verwendet, wodurch die untersuchten Replikate untereinander verglichen werden konnten. Zusätzlich gibt ein gleichbleibender GAPDH-Wert einen Hinweis darauf, dass die verwendeten Konjugate keine zytotoxischen Effekte hervorrufen. Da es bei der gleichzeitigen Verwendung von 2 verschiedenen Primerpaaren zu unspezifischen Bindungen zwischen den einzelnen Primern kommen kann (Primerinterferenzen), wurde ein Vorversuch durchgeführt, bei dem die Primerpaare einmal alleine (Ansatz 1) und einmal zusammen (Ansatz 2) gemessen wurden (Abbildung 3.12). Die jeweiligen Zyklen-Zahlen, bei der der Schwellenwert (CT) überschritten wurde, wurden miteinander verglichen.

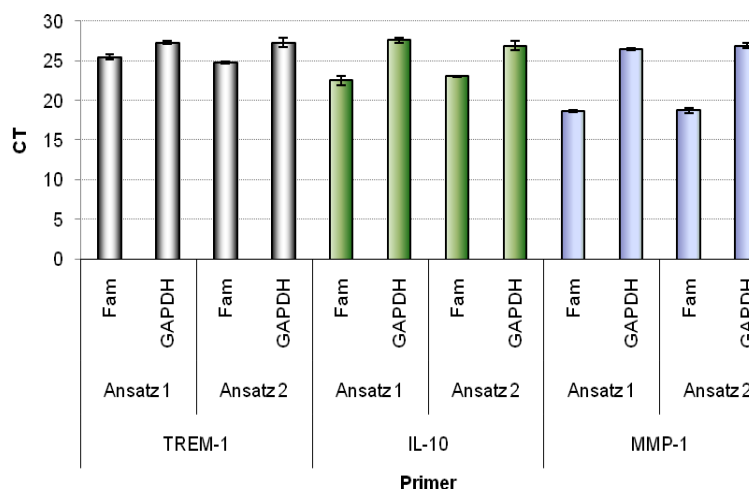


Abbildung 3.12: Untersuchung des Auftretens von Primer Interferenzen beim gleichzeitigen Verwenden von 2 Primerpaaren

Ansatz 1: Primerpaare wurden einzeln untersucht, **Ansatz 2:** gleichzeitiges Verwenden der beiden Primerpaare, CT: Schwellenwert, Fam: untersuchtes Gen

Weder bei der Verwendung der Primer für TREM-1, IL-10 noch bei der für MMP-1 und gleichzeitiger Verwendung der GAPDH-Primer wurde das Auftreten von Primerinterferenzen beobachtet. Die CT-Werte von Ansatz 1 unterschieden sich nicht signifikant von den CT-Werten des Ansatzes 2.

In einem ersten Versuch wurde die MMP-1 mRNA Expression nach 24h-stündiger Inkubation mit dem Isu-Peptid (K156) bzw. dem randomisierten Isu-Peptid (K87) bei 3 verschiedenen Spendern untersucht (Abbildung 3.13).

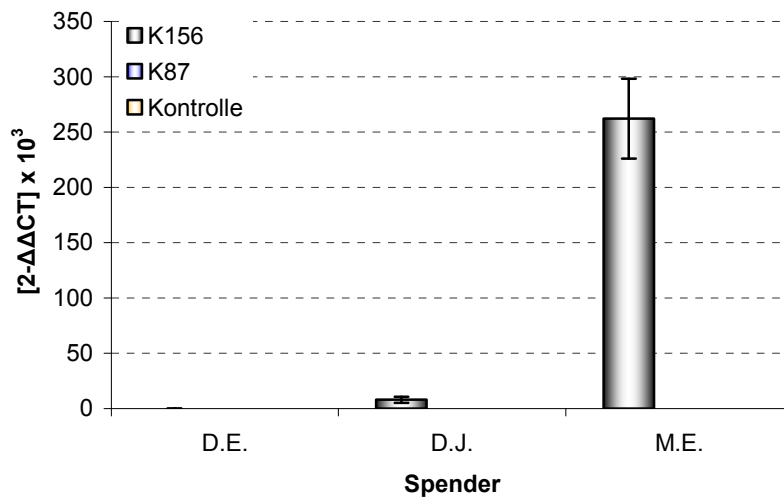


Abbildung 3.13: Quantifizierung der MMP-1 Transkription bei humanen PBMCs nach Inkubation mit dem HIV-Isu-Peptid bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Peptid mittels real time PCR

PBMCs von 3 verschiedenen, gesunden Spendern (D.E., D.J., M.E.) wurden für 24h mit den HIV-Isu-Homopolymer (K156) bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer (K87) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate \pm SD.

Die höchste Expression von MMP-1 nach Inkubation mit dem Isu-Peptid (K156) war bei Spender M.E. zu beobachten. Im Vergleich zu unbehandelten PBMCs wurde MMP-1 um den Faktor 260 000 hochreguliert. Bei Spender D.J. konnte eine Hochregulation um den Faktor 8000 nach Inkubation mit dem Isu-Peptid beobachtet werden, bei Spender D.E. wurde MMP-1 nicht signifikant höher exprimiert. Unbehandelte PBMCs bzw. PBMCs, die mit dem randomisierten Isu-Peptid (K87) inkubiert wurden, wiesen keine MMP-1 Expression nach 40 Zyklen in der real time PCR auf.

In einem weiteren Versuch wurde die Expression der TREM-1 mRNA nach 24h-stündiger Inkubation mit dem Isu-Peptid (K156) bzw. dem randomisierten Isu-Peptid (K87) bei 3 verschiedenen Spendern untersucht (Abbildung 3.14).

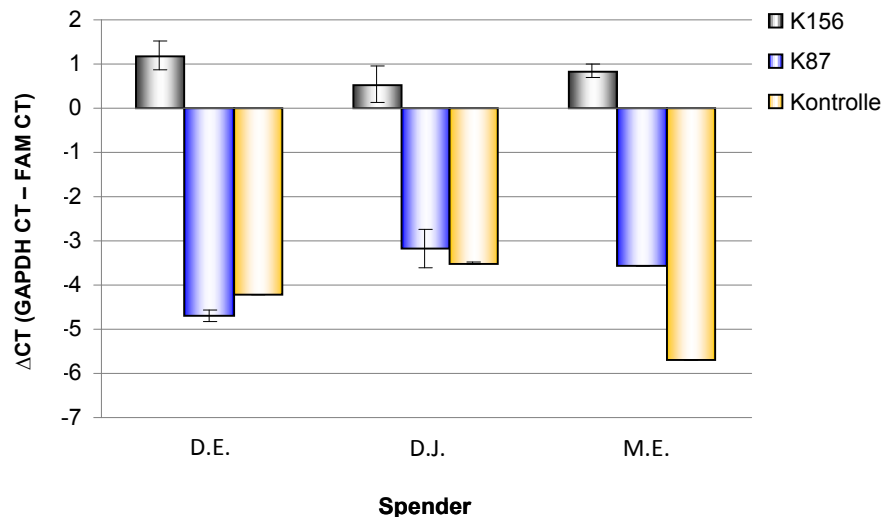


Abbildung 3.14: Quantifizierung der TREM-1 Transkription bei humanen PBMCs nach Inkubation mit dem HIV-Isu-Peptid bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Peptid mittels real time PCR

PBMCs von 3 verschiedenen, gesunden Spendern (D.E., D.J., M.E.) wurden für 24h mit den HIV-Isu-Homopolymer (K156) bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer (K87) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate \pm SD.

Es zeigte sich, dass nach Inkubation der PBMCs mit dem Isu-Peptid (K156) die Schwellenwerte (CTs) früher überschritten wurden, als bei unbehandelten (Kontrolle) bzw. mit dem randomisierten Isu-Peptid (K87) inkubierten PBMCs, wodurch positive Δ CT-Werte erreicht wurden. Der Δ CT-Wert ergibt sich aus der Subtraktion des in der Regel konstant bleibenden GAPDH-CT-Wertes und des FAM-CT-Wertes. Der größte Unterschied in den Δ CT-Werten ($\Delta\Delta$ CT) zwischen fand sich bei Spender M.E. mit einem $\Delta\Delta$ CT von 6,5., die $\Delta\Delta$ CT-Werte von Spender D.E. und Spender D.J. lagen bei 5,5 bzw. 4. Der $\Delta\Delta$ CT-Wert stellt ein Maß für den Unterschied in der Genexpression zwischen zu vergleichenden Proben dar. Somit konnte der größte Unterschied in der TREM-1 Expression beim Vergleich von unbehandelten mit Isu-inkubierten PBMCs bei Spender M.E. festgestellt werden. Die $\Delta\Delta$ CTs von unbehandelten und mit dem randomisierten Isu-Peptid inkubierten PBMCs unterschieden sich bei Spender D.E. und D.J. mit einem Wert von ungefähr 0,5 nicht signifikant, bei Spender M.E. lag der $\Delta\Delta$ CT bei einem Wert von 2.

Zur genaueren Untersuchung der MMP-1 Genexpression in PBMCs nach Inkubation mit Isu-Peptid Homopolymeren bzw. mit randomisierten Isu-Peptid Homopolymeren wurde diese über einen Zeitraum von 24h im Rahmen einer Kinetik analysiert (Abbildung 3.15).

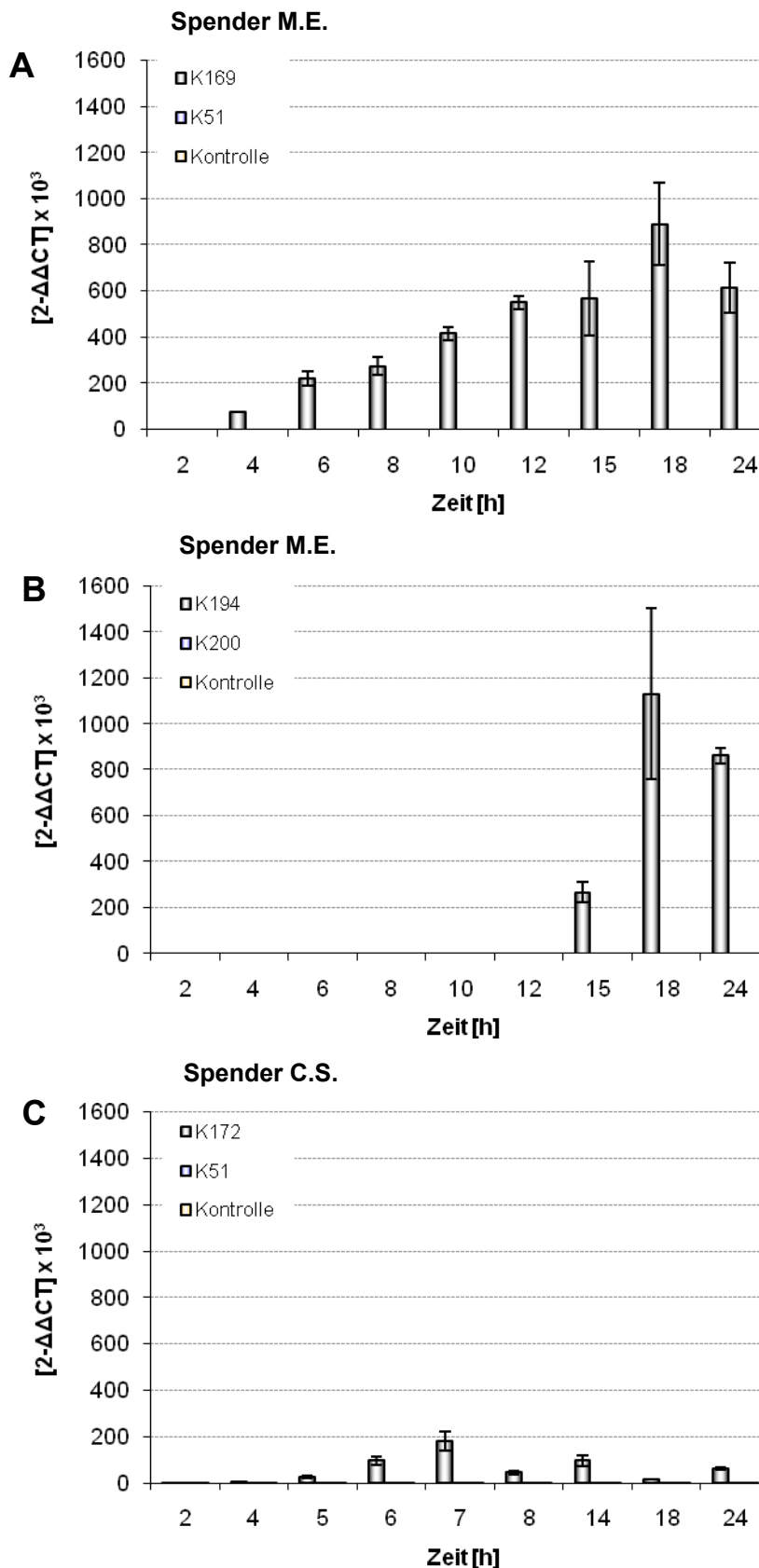


Abbildung 3.15: Kinetik der MMP-1 Transkription humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV-Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer über einen Zeitraum von 24h mittels real time PCR

PBMCs von 2 verschiedenen, gesunden Spendern (M.E.: **A** und **B**; C.S.: **C**) wurden über einen Zeitraum von 24h mit den HIV-Isu-Homopolymeren (K169, K172, K194) bzw. den randomisierten HIV-Isu-Homopolymeren (K51, K200) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate \pm SD.

Nach Inkubation mit dem Isu-Peptid erfolgte in Kinetik A ein kontinuierlicher Anstieg der MMP-1 Genexpression bis Stunde 18, bei der eine Hochregulation um das 9×10^5 -fache zu beobachten war (Abbildung 3.15 A). Nach 24h war die MMP-1 Expression noch ungefähr um das 6×10^5 -fache hochreguliert. Bei PBMCs, die mit dem randomisierten Isu-Peptid inkubiert bzw. unbehandelt belassen wurden, konnte keine MMP-1 Expression festgestellt werden.

Bei der Inkubation der PBMCs von Spender M.E. zu einem späteren Zeitpunkt mit einem anderen Isu Peptid (K194) bzw. einem anderen randomisierten Isu-Peptid (K200) ergab sich ein verändertes MMP-1 Expressionsprofil (Abbildung 3.15 B). Die erste Hochregulation der MMP-1 Genexpression erfolgte nach 15h um den Faktor $2,7 \times 10^5$, die maximale Expression war nach 18h mit einem Faktor von ungefähr $11,5 \times 10^5$ erreicht. Nach 24h war MMP-1 noch um das $8,6 \times 10^5$ -fache hochreguliert. Wie auch schon beim vorherigen Versuch konnte bei PBMCs, die mit dem randomisierten Isu-Peptid inkubiert bzw. unbehandelt belassen wurden, keine MMP-1 Expression festgestellt werden.

Spender C.S. wies nach Inkubation mit dem Isu-Peptid (K172) eine deutlich geringere Hochregulation der MMP-1 Genexpression auf. Die maximale Genexpression wurde nach 7h mit einem Wert von $1,8 \times 10^5$ gemessen, die durchschnittliche MMP-1 Genexpression war um den Faktor 1×10^5 erhöht. In unbehandelten PBMCs, bzw. bei PBMCs, die mit dem randomisierten Isu-Peptid (K51) inkubiert wurden, konnte keine MMP-1 Expression festgestellt werden.

Vergleicht man die MMP-1 Genexpression in den drei verschiedenen Kinetiken, so wird deutlich, dass in den Kinetiken A und B, im Gegensatz zu Kinetik C, eine deutliche Hochregulation der MMP-1 Expression auf mRNA-Ebene nach Inkubation mit dem Isu-Peptid detektierbar war. In keiner der drei Kinetiken konnte eine MMP-1 Expression in unbehandelten PBMCs bzw. in PBMCs, die mit dem randomisierten Isu-Peptid inkubiert wurden, beobachtet werden.

Zur genaueren Untersuchung der TREM-1 Genexpression in PBMCs nach Inkubation mit dem Isu-Peptid bzw. mit dem randomisierten Isu-Peptid wurde diese ebenfalls über einen Zeitraum von 24h analysiert (Abbildung 3.16).

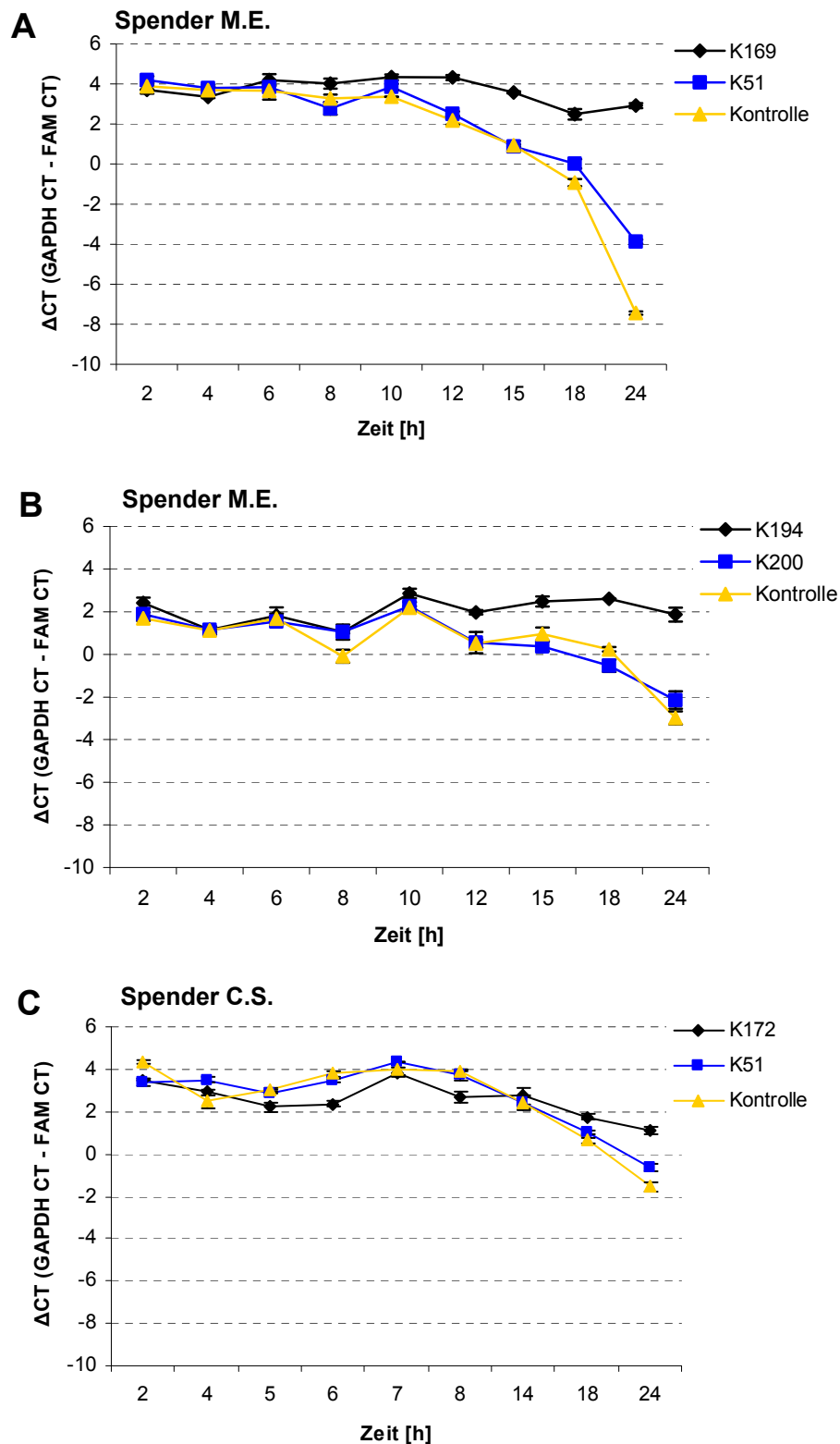


Abbildung 3.16:Kinetik der TREM-1 Transkription humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV-Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer über einen Zeitraum von 24h mittels real time PCR

PBMCs von 2 verschiedenen, gesunden Spendern (M.E.: **A** und **B**; C.S.: **C**) wurden über einen Zeitraum von 24h mit den HIV-Isu-Homopolymeren (K169, K172, K194) bzw. den randomisierten HIV-Isu-Homopolymeren (K51, K200) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate \pm SD.

Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Kinetiken, wurde die TREM-1 Kinetik nicht nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Livak und Schmittgen [Livak et al. 2001] ausgewertet. Bei der Methode von Livak und Schmittgen beziehen sich die ΔCT s von PBMCs, die mit dem Isu-Peptid bzw. dem randomisierten Isu-Peptid inkubiert wurden, jeweils auf die ΔCT s unbehandelter PBMCs, welche in der Regel über den Zeitraum von 24h relativ konstant bleiben. Da sich aber in Voruntersuchungen herausgestellt hat, dass das TREM-1 Expressionsniveau in unbehandelten PBMCs über den Zeitraum von 24h nicht konstant bleibt, wurden die ΔCT s nach Inkubation mit dem Isu-Peptid bzw. dem randomisierten Isu-Peptid einzeln dargestellt und nicht auf den ΔCT der unbehandelten PBMCs bezogen.

Es zeigte sich, dass unbehandelte bzw. mit dem randomisierten Isu-Peptid (K51) inkubierte PBMCs in Kinetik A bis 10h einen relativ konstanten ΔCT -Wert von +3,5 bis +4 aufwiesen (Abbildung 3.16 A). Im weiteren Verlauf der Kinetik nahm dieser ΔCT -Wert kontinuierlich ab, bis auf einen Endwert nach 24h von -4 nach Inkubation mit dem randomisierten Isu-Peptid bzw. von -7,5 bei unbehandelten PBMCs. Im Gegensatz dazu blieb der ΔCT -Wert nach Inkubation mit dem Isu-Peptid (K169) über den gesamten Verlauf der 24h auf einem relativ konstanten Niveau von +2,5 bis +4. Dadurch ergibt sich nach 24h ein Unterschied in den ΔCT -Werten ($\Delta\Delta CT$) von 7 im Vergleich von mit K169 inkubierten zu mit K51 behandelten PBMCs bzw. von 10 im Vergleich zur Kontrolle.

Bei Inkubation von PBMCs des Spenders M.E. zu einem späteren Zeitpunkt (Abbildung 3.16 B) mit einem anderen Isu-Peptid (K194) sowie einem anderen randomisierten Isu-Peptid (K200) zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie in Kinetik A. Über den Zeitraum von 2-10h blieb der ΔCT -Wert aller drei Ansätze (K194, K200, Kontrolle) bei einem relativ konstanten Wert. In der Folge sank der ΔCT -Wert der unbehandelte bzw. mit dem rand. Isu-Peptid (K51) inkubierten PBMCs bis auf einen Wert von -3 bzw. -2 ab, während die Inkubation der PBMCs mit dem Isu-Peptid den ΔCT -Wert auf einem konstanten Level von +2 hielt. Dadurch ergibt sich nach 24h ein $\Delta\Delta CT$ -Wert von 4 im Vergleich von mit K194 inkubierten zu mit K200 behandelten PBMCs bzw. von 5 im Vergleich zur Kontrolle.

Bei Spender C.S. war der Effekt der Inkubation von PBMCs mit dem Isu-Peptid (K172) im Vergleich zur Inkubation mit dem randomisierten Isu-Peptid (K51) bzw. unbehandelten PBMCs in Bezug auf die TREM-1 Expression weniger deutlich ausgeprägt. Über den Zeitraum von 2-7h lag der ΔCT -Wert der drei Ansätze (K172, K51, Kontrolle) bei einem relativ konstanten Wert zwischen 2 und 4. In der Folge konnte eine kontinuierliche Abnahme des ΔCT -Wertes der unbehandelten bzw. mit dem randomisierten Isu-Peptid inkubierten PBMCs bis auf einen Wert von -0,5 bzw. -1,5 beobachtet werden. Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Kinetiken blieb der ΔCT -Wert nach Inkubation mit dem Isu-Peptid nicht konstant, sondern sank bis auf einen Wert von +1 ab. Nach 24h resultiert dadurch ein $\Delta\Delta CT$ -

Wert von 1,5 im Vergleich von mit K172 inkubierten zu mit K51 behandelten PBMCs bzw. von 2,5 im Vergleich zur Kontrolle.

Beim Vergleich der TREM-1 Genexpression in den drei verschiedenen Kinetiken wird deutlich, dass die Inkubation von PBMCs mit dem Isu-Peptid in Kinetik A und B zu einer Verhinderung der Herunterregulation der TREM-1 Expression führt. In Kinetik C ist dieser Effekt nur sehr schwach erkennbar.

3.5 Einfluss der HIV-Isu- und HIV-Ran-Polymere auf die Sekretion von MMP-1 und TREM-1 durch humane PBMCs *in vitro*

Um die Ergebnisse des Microarrays sowie der real time PCR Analysen, in denen eine Veränderung der Genexpression von MMP-1 und TREM-1 nach Inkubation von PBMCs mit dem HIV Isu-Peptid detektiert wurde, zu bestätigen, wurde die Expression von MMP-1 und TREM-1 auch auf der Proteinebene untersucht. MMP-1 wird als Pro-Enzym nach der Translation sekretiert (Pardo et al. 2004) und anschließend durch extrazelluläre Proteasen bzw. andere Matrix-Metalloproteinasen (MMP-3/7/10) in die aktive Form überführt (Webster und Crowe 2006), wodurch es sich im Zellkulturüberstand ansammeln kann. Daher ist die Detektion mittels ELISA möglich. Bei TREM-1 handelt es sich zwar um ein membranständiges Protein, allerdings konnte auch eine lösliche Form, die als sTREM-1 (soluble TREM-1) bezeichnet wurde, im extrazellulären Bereich detektiert werden (Gomez-Pina et al. 2007). Die Zellkulturüberstände wurden jeweils über einen Zeitraum von 24h nach Inkubation mit dem HIV Isu-Peptid Homopolymer (K169) bzw. dem randomisierten Isu-Peptid Homopolymer (K51) auf das Vorhandensein von MMP-1 bzw. TREM-1 untersucht (siehe **2.2.3.2**).

Die Inkubation von PBMCs mit dem Isu-Peptid Homopolymer (K169) führte zu einem kontinuierlichen Anstieg der MMP-1 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand, nach 24h wurde eine Endkonzentration von ungefähr 16.000 pg/ml erreicht (Abbildung 3.17). Bei unbehandelten PBMCs bzw. bei PBMCs, die mit dem randomisierten Isu-Peptid Homopolymer (K51) inkubiert wurden, konnte kein MMP-1 im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden.

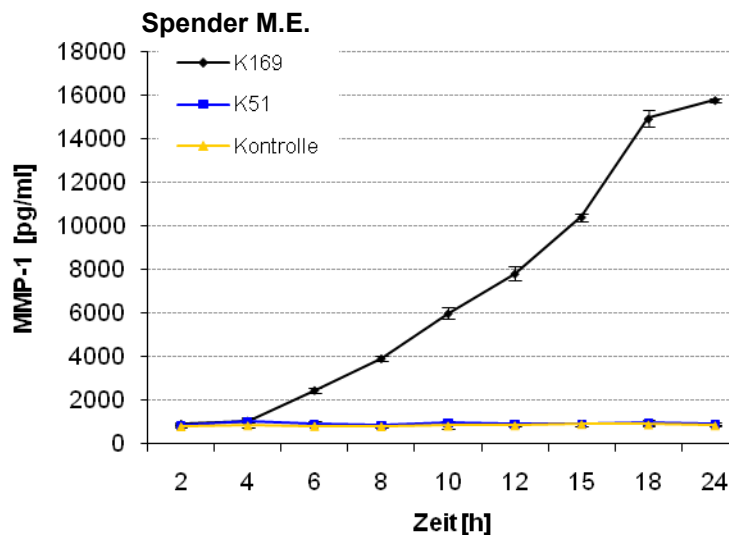


Abbildung 3.17: Kinetik der MMP-1 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV-Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer über einen Zeitraum von 24h mittels ELISA

PBMCs gesunder Spender wurden über einen Zeitraum von 24h mit den HIV-Isu-Homopolymer (K169) bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymere (K51) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate \pm SD.

Bei der Untersuchung der TREM-1 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand nach Inkubation von PBMCs mit dem HIV Isu-Peptid (K169) konnte ein geringer Anstieg der TREM-1 Konzentration detektiert werden (Abbildung 3.18). Im Zeitraum von 2-8h wurde eine Konzentration von ungefähr 50 pg/ml gemessen, danach erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg bis auf eine Konzentration von 140 pg/ml nach 24h. Damit lag die Konzentration von TREM-1 nur knapp über der Nachweisgrenze des ELISA-Kits, die mit 40-50 pg/ml angegeben wurde. Die Inkubation von PBMCs mit dem randomisierten Isu-Peptid (K51) führte erst nach 18h zu einer leichten Erhöhung der Proteinkonzentration, nach 24h wurde ein Maximum von 80 pg/ml erreicht. Bei den unbehandelten PBMCs konnte kein lösliches TREM-1 im Überstand nachgewiesen werden.

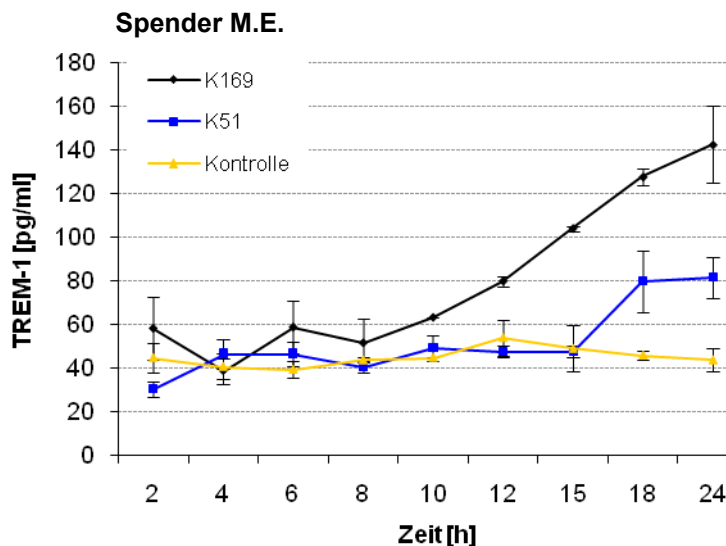


Abbildung 3.18: Kinetik der TREM-1 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV-Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer über einen Zeitraum von 24h mittels ELISA

PBMCs gesunder Spender wurden über einen Zeitraum von 24h mit den HIV-Isu-Homopolymer (K169) bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer (K51) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate \pm SD.

Sowohl im MMP-1 ELISA als auch im TREM-1 ELISA konnte eine Erhöhung der MMP-1 bzw. der TREM-1 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit dem HIV Isu-Peptid detektiert werden. Bei unbehandelten PBMCs bzw. bei PBMCs, die mit dem randomisierten Isu-Peptid inkubiert wurden, wurde kein signifikanter Anstieg der MMP-1 bzw. der TREM-1 Konzentration beobachtet.

3.6 Einfluss des IL-10 *gene silencing* auf die Expression von MMP-1 und TREM-1

Pardo et al. beschrieben im Jahr 2004, dass die Expression von MMP-1 unter anderem durch Zytokine wie EGF, FGF, IL-4, IL-6 aber auch IL-10 induziert werden kann (Pardo et al. 2004). Da durch die Inkubation von PBMCs mit dem HIV Isu-Peptid die Expression von IL-10 so wie auch von MMP-1 hochreguliert wurde, soll durch das *gene silencing* von IL-10 der Einfluss auf die MMP-1 Expression näher untersucht werden. Zusätzlich soll untersucht werden, ob das *silencing* von IL-10 auch einen Einfluss auf die TREM-1 Genexpression hat. Bevor PBMCs von Spender M.E. mit dem Isu-Peptid (K194) inkubiert wurden, wurden die Zellen mit 50 nM eines gegen IL-10 gerichteten siRNA pools (HS_IL10_6, HS_IL10_7, HS_IL10_8) bzw. einer siRNA ohne Homologien zu humanen ORFs (Ctrl_AllStars_1) mit dem liposomalen Transfektionsmedium DOTAP transfiziert (siehe 2.2.1.5). Die Überprüfung des IL-10 *gene silencing* erfolgt mittels Überprüfung des IL-10 Gehaltes der Zellkulturüberstände durch ELISA (Abbildung 3.19).

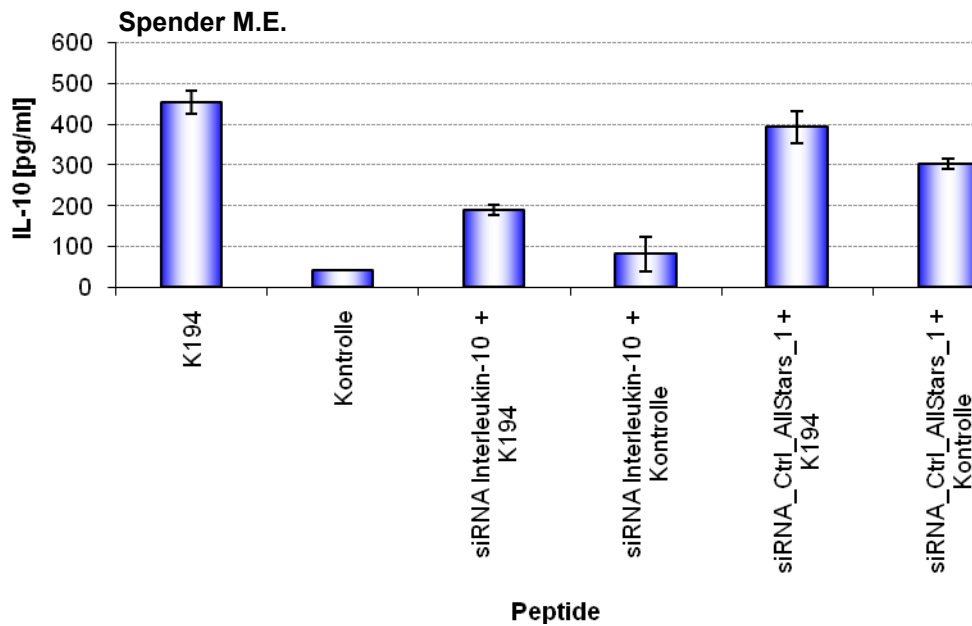


Abbildung 3.19: Einfluss der RNA-Interferenz auf die Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV-Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer mittels ELISA

PBMCs eines gesunden Spenders (M.E.) wurden für 24h mit dem HIV-Isu-Homopolymer (K194) bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer (K200) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Vor der Zugabe der Konjugate wurden die PBMCs mit 50 nM eines gegen IL-10 gerichteten siRNA-pools (HS_IL10_6, HS_IL10_7, HS_IL10_8) bzw. einer siRNA ohne Homologien zu humanen ORFs (Ctrl_AllStars_1) transfiziert. Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate \pm SD.

PBMCs, die nur mit dem Isu-Peptid inkubiert wurden, zeigten eine IL-10 Konzentration von ungefähr 450 pg/ml nach 24h, im Vergleich dazu betrug die IL-10 Konzentration un behandelter PBMCs (Kontrolle) 50 pg/ml. Durch die Transfektion von PBMCs mit gegen IL-10 gerichteter siRNA (siRNA Interleukin-10) konnte nach Inkubation mit dem Isu-Peptid eine Reduzierung der IL-10 Konzentration im Überstand auf einen Wert von 200 pg/ml im Vergleich zu nicht transfizierten PBMCs beobachtet werden. Unbehandelte PBMCs, die mit der siRNA gegen IL-10 transfiziert wurden, wiesen eine Interleukin-10 Konzentration von ungefähr 90 pg/ml auf. Die Transfektion von PBMCs mit einer Kontroll siRNA, die keine Homologien zu bekannten humanen ORFs aufwies (siRNA_Ctrl_AllStars_1) führte bei anschließender Inkubation mit dem Isu-Peptid zu einer IL-10 Konzentration von 400 pg/ml. Wurden unbehandelte PBMCs mit der Kontroll siRNA transfiziert, konnte ein IL-10 Gehalt von 300 pg/ml detektiert werden.

Bei der Untersuchung der MMP-1 Genexpression nach Inkubation von PBMCs mit dem Isu-Peptid (K194) zeigte sich eine Hochregulation der MMP-1 Expression um den Faktor $8,8 \times 10^5$ (Abbildung 3.20). Durch den Einsatz von IL-10 spezifischer siRNA konnte die MMP-1 Expression nach Inkubation mit dem Isu-Peptid auf einen nicht mehr detektierbaren Wert reduziert werden (siRNA Interleukin-10 + K194). Bei Transfektion der PBMCs mit der Kontroll-siRNA (siRNA_Ctrl_AllStars_1) und anschließender Inkubation mit dem Isu-Peptid

wurde eine Hochregulation der MMP-1 Expression um das 3×10^5 -fache detektiert. PBMCs, die nicht mit Peptiden inkubiert wurden, wiesen, unabhängig von der Tatsache ob sie mit siRNA transfiziert wurden, keine detektierbare MMP-1 Expression auf.

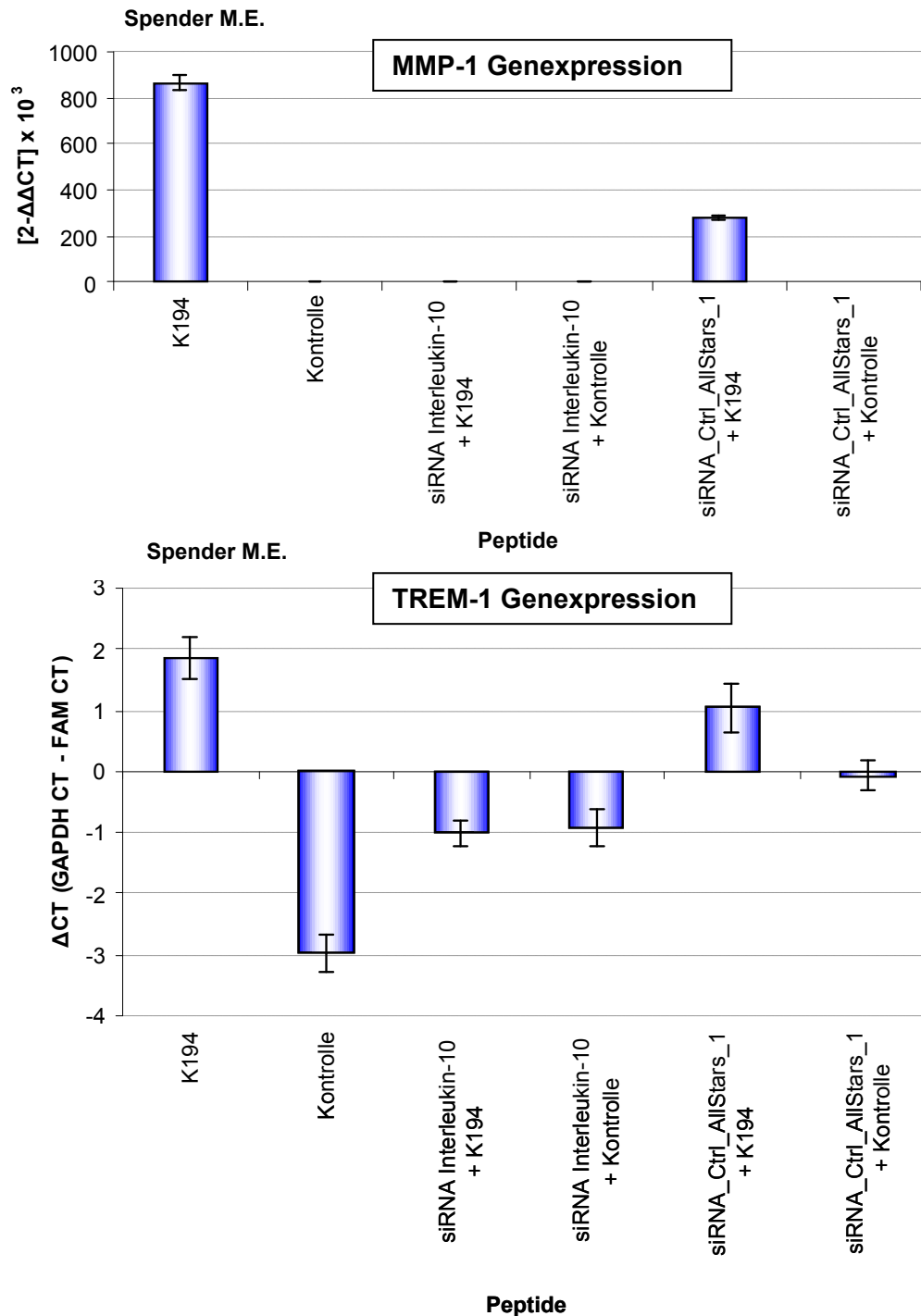


Abbildung 3.20: Einfluss der RNA-Interferenz auf die MMP-1 und TREM-1 Transkription humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV-Isu-Homopolymer bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer mittels real time PCR
PBMCs eines gesunden Spenders (M.E.) wurden 24h mit dem HIV-Isu-Homopolymer (K194) bzw. dem randomisierten HIV-Isu-Homopolymer (K200) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Vor der Zugabe der Konjugate wurden die PBMCs mit 50 nM eines gegen IL-10 gerichteten siRNA-pools (HS_IL10_6, HS_IL10_7, HS_IL10_8) bzw. einer siRNA ohne Homologien zu humanen ORFs (Ctrl_AllStars_1) transfiziert. Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate \pm SD.

Um zu untersuchen, ob MMP-1 eventuell umgekehrt in der Lage ist, die IL-10 Sekretion nach Inkubation von PBMCs mit dem HIV Isu-Peptid-Homopolymer zu beeinflussen, wurde die Funktion von MMP-1 durch Zugabe des Matrix-Metalloprotease Inhibitors GM6001 gehemmt. Dies resultierte in keiner Änderung der IL-10 Sekretion verglichen zu PBMCs, die nur mit dem Isu-Peptid Homopolymer inkubiert wurden (nicht dargestellt).

Bei der Untersuchung der Genexpression von TREM-1 (Abbildung 3.20) zeigte sich, dass nach Inkubation der PBMCs mit dem Isu-Peptid (K194) der Schwellenwert (CT) früher überschritten wurden, als bei unbehandelten PBMCs (Kontrolle), wodurch ein positiver Δ CT-Werte von +2 erreicht wurde. Der Δ CT-Wert ergibt sich aus der Subtraktion des in der Regel konstant bleibenden GAPDH-CT-Wertes und des FAM-CT-Wertes. Verglich man den Unterschied in den Δ CT-Werten ($\Delta\Delta$ CT) zwischen mit K194 inkubierten und unbehandelten PBMCs, ergab sich ein $\Delta\Delta$ CT von 5. Der $\Delta\Delta$ CT-Wert stellt ein Maß für den Unterschied in der Genexpression zwischen zu vergleichenden Proben dar, je größer der $\Delta\Delta$ CT-Wert ist, desto höher ist der Unterschied in der Genexpression. Durch den Einsatz der IL-10 spezifischen siRNA konnte der $\Delta\Delta$ CT von PBMCs, die mit dem Isu-Peptid inkubiert bzw. unbehandelt belassen wurden, auf einen Wert von 2 reduziert werden. Bei Transfektion der PBMCs mit der Kontroll-siRNA und anschließender Inkubation mit dem Isu-Peptid wurde ein $\Delta\Delta$ CT-Wert von 4 detektiert, bei der Transfektion unbehandelter PBMCs lag der $\Delta\Delta$ CT bei einem Wert von 3.

Durch den Einsatz der gegen IL-10 gerichteten siRNA konnte die IL-10 Sekretion von PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Peptid deutlich reduziert werden, allerdings hat sich auch gezeigt, dass die Kontroll siRNA Ctrl_AllStars_1 die Sekretion von IL-10 in PBMCs induziert. In Bezug auf die Genexpression konnte durch das IL-10 *gene silencing* sowohl die MMP-1 Expression als auch die TREM-1 Expression nach Inkubation mit dem Isu-Peptid signifikant reduziert werden.

4. Diskussion

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) induziert im infizierten Wirt eine Immunsuppression. Die Beteiligung der konservierten, immunsuppressiven (Isu-) Domäne des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1 an der Immunpathogenese dieser retroviralen Infektion wird schon länger diskutiert (Ruegg et al. 1989, Denner 1987, 1998, 2000). Da aber der Mechanismus der Auslösung dieser Immunschwäche noch weitgehend unbekannt ist, sollte im Rahmen dieser Diplomarbeit die Wirkung der Isu-Domäne genauer charakterisiert werden. Dazu wurde zum Einen analysiert, ob ein synthetisch hergestelltes, der Isu-Domäne entsprechendes Peptid (Isu-Peptid), in der Lage war, spezifisch an putativen Rezeptoren auf der Oberfläche von PBMCs bzw. C8166-Zellen zu binden und dadurch die immunsuppressive Wirkung zu vermitteln. Zum Anderen wurde untersucht, in wie weit zu Homopolymeren gekoppelte Isu-Peptide zur Modulation des Genexpressionsprofils humaner PBMCs und einer daraus resultierenden, eventuellen Beeinflussung der Immunpathogenese im Stande waren.

4.1 Analyse der Bindung des Isu-Peptides an humanen Immunzellen

Die Bindung des Isu-Peptides an einen putativen Rezeptor auf der Zelloberfläche wurde anhand von Immunfluoreszenz-Analysen untersucht. Da HIV-1 neben Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) hauptsächlich CD4-positive T-Zellen infiziert (Fauci et al. 1996), wurde die humane T-Zelllinie C8166 als Modellsystem gewählt. Dolei et al. (1998) konnten für diese Zelllinie eine Suszeptibilität gegenüber HIV-1 demonstrieren.

In den Immunfluoreszenz-Analysen konnte kein Unterschied zwischen der Bindung des biotinylierten Isu-Peptides bzw. des randomisierten biotinylierten Isu-Peptides an C8166-Zellen bei einer eingesetzten Peptidkonzentration von 10 µg beobachtet werden, beide Peptide waren in der Lage auf der Zelloberfläche zu binden (Abbildung 3.1). Eine Verringerung der Peptidkonzentration (5 µg, 1 µg) führte zu einer Abnahme der Signalstärke, die unspezifische Bindung des randomisierten Isu-Peptides konnte jedoch nicht reduziert werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die Bindung des randomisierten Isu-Peptides an die Zelloberfläche der C8166-Zellen nicht durch die Verwendung der relativ hohen Peptidkonzentration von 10 µg zu Stande kam.

In einem weiteren Ansatz wurde der Einfluss des *crosslinkings* des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides mit den Proteinen der Zelloberfläche von C8166-Zellen durch

Bissulfosuccinimidylsuberat (BS³) untersucht. Mattson et al. (1993) konnten zeigen, dass der Einsatz von *crosslinkern* schwache oder nur transiente Interaktion zwischen Peptiden bzw. Proteinen stabilisieren und dadurch die Bindungsaffinität erhöhen kann. Das *crosslinking* der Peptide wurde nach der Methode von de Santis et al. (unveröffentlicht) durchgeführt, die durch das Vernetzen von rekombinatem gp41 (rpg41) auf der Zelloberfläche eine Interaktion mit dem humanen Leukozyten Antigen-C (HLA-C) nachweisen konnten. Unter den gewählten Bedingungen (siehe **2.2.2.5**) konnte durch das *crosslinking* der untersuchten Peptide keine Erhöhung der Spezifität des Isu-Peptides in Bezug auf die Bindung an die Oberfläche von C8166-Zellen beobachtet werden.

Diese, sowie die zuvor beschriebenen Beobachtungen, legen den Schluss nahe, dass eine Unterscheidung zwischen einer spezifischen und einer unspezifischen Bindung des Isu-Peptides an die Zelloberfläche nicht möglich ist, da bei Verwendung des randomisierten Isu-Peptides ebenfalls eine Bindung an C8166-Zellen detektierbar war. In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte zwar eine Bindung des radioaktiv markierten HIV-1 Isu-Peptides an Oberflächen-Proteine von Lymphozyten beschrieben werden (Denner et al. 1993, 1995), allerdings wurde bei diesen Versuchen keine randomisierte Version des Isu-Peptides als Negativkontrolle verwendet. Bei der Durchführung neuer Bindungsstudien mit einem radioaktiv-markiertem Isu-Peptid und zusätzlicher Verwendung eines radioaktiv markierten, randomisierten Isu-Peptides könnte festgestellt werden, ob das randomisierte Isu-Peptid ebenfalls zu einer Interaktion mit Oberflächen-Proteinen auf Lymphozyten im Stande ist. Dieser Versuch würde des Weiteren Aufschlüsse darüber geben, in wie weit das randomisierte Isu-Peptid in der Lage ist, unspezifisch an den untersuchten Zellen zu binden: Läge keine Interaktion mit Oberflächenproteinen vor, so könnte die im Rahmen dieser Arbeit detektierte Bindung des randomisierten Isu-Peptides, und möglicherweise auch die des Isu-Peptides, durch eine Bindung an die Lipidmembran der Zellen erklärt werden. Des Weiteren muss angemerkt werden, dass sich die gemachten Beobachtungen in Bezug auf die Bindung der Peptide an die Oberfläche von C8166-Zellen nur auf die gewählten Inkubationsbedingungen (siehe **2.2.3.3**) beziehen können. So wurden die Peptide jeweils für eine Stunde mit den PBMCs inkubiert, eventuell könnte eine kürzere Inkubationszeit zu einer Reduzierung der unspezifischen Bindungen durch das randomisierte Isu-Peptid führen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Verwendung eines anderen *crosslinkers* zu einer Erhöhung der spezifischen Bindung des Isu-Peptides führen könnte. Bei BS³ handelt es sich um einen homobifunktionalen *crosslinker*, der zwei identische reaktive Gruppen an den Enden trägt und daher spezifisch mit zwei gleichen Funktionalitäten reagiert. Eventuell könnte durch die Verwendung eines heterobifunktionalen *crosslinkers*, der zwei unterschiedliche reaktive Gruppen an den Enden besitzt und folglich spezifisch mit zwei verschiedenen Funktionalitäten reagiert, eine Stabilisierung der spezifischen Bindung des

Isu-Peptides erreicht werden. So konnten Madison et al. (1984) zeigen, dass die Verwendung des heterobifunktionalen crosslinkers N-Succinimidyl-m-maleimido-benzoat (MBS) zu einer höheren Effizienz der Vernetzung zwischen dem untersuchten Protein CCK-33 und dessen Rezeptor auf der Zellmembran führte.

Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine spezifische Bindung des immunsuppressiven Peptides aufgrund einer fehlenden Konformation nicht möglich war. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe **1.3.1**), ist das immunsuppressive Peptid biologisch nur aktiv, wenn es an ein Trägermolekül gekoppelt wird (Denner et al. 1994). Eventuell überführt die Kopplung das Peptid in eine biologisch wirksame Konformation, die für die Interaktion mit dem putativen Rezeptor auf C8166-Zellen benötigt wird.

In einer zweiten Bindungsanalyse wurde die Bindung des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides an periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Bei diesen Untersuchungen konnte, wie bereits bei den Immunfluoreszenz-Analysen beobachtet, kein Unterschied in der Bindung des Isu-Peptides bzw. des randomisierten Isu-Peptides auf der Oberfläche von PBMCs detektiert werden. Es hat sich gezeigt, dass die zusätzliche Absättigung der Zellen mit 1% Trockenmilchpulver und die daraus resultierende Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen auf der Zelloberfläche sowie die Fixierung mit 4% Paraformaldehyd, die in einer Quervernetzung der Oberflächenproteine resultiert, keinen Effekt auf eine eventuell erhöhte Spezifität der Bindung des Isu-Peptides hatte. Des Weiteren konnte auch durch die Verwendung von PBMCs, die wie bereits erwähnt (siehe **3.1.2**), im Gegensatz zur T-Zelllinie C8166 eine diverse Zellpopulation darstellen, keine erhöhte Bindung des Isu-Peptides im Vergleich zum randomisierten Isu-Peptid festgestellt werden. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass die fehlende Spezifität in der Bindung des Isu-Peptides eventuell nur auf die T-Zelllinie C8166 beschränkt war. Die Durchführung einer Kinetik über 17h hat gezeigt, dass die Bindung der Peptide an der Oberfläche von PBMCs von der Inkubationsdauer anhängig ist, d.h. je länger inkubiert wurde, um so höher war der Anteil der FITC-positiven Zellen. Zum Zeitpunkt 9 h konnte eine erkennbar höhere Bindung des Isu-Peptides im Vergleich zum randomisierten Isu-Peptid detektiert werden. Es konnte allerdings nicht geklärt werden, ob diese um 8% höhere Anzahl FITC-positiver PBMCs nach Inkubation mit dem Isu-Peptid spezifisch für die Inkubationszeit von 9h ist, oder ob es sich um einen unspezifischen Effekt handelt, der im Rahmen der Messungenauigkeit liegt. Auch die Verwendung von verschiedenen Peptidkonzentrationen könnte eventuell einen Unterschied in der Bindungsaffinität zwischen dem Isu-Peptid und dem randomisierten Isu-Peptid hervorrufen. Wie auch schon bei der Diskussion der Immunfluoreszenz-Analysen erwähnt, kann keine Aussage getroffen werden, ob das randomisierte Isu-Peptid, wie bereits für das Isu-Peptid beschrieben (Denner et al. 1993, 1995), ebenfalls an einen Oberflächenrezeptor bindet oder

ob eine Interaktion mit der Lipidmembran vorliegt. Zur Klärung dieser Frage könnten Untersuchungen mit einem radioaktiv-markierten, randomisierten Isu-Peptid, durchgeführt werden.

Um zu analysieren, ob für die Bindung der Isu-Domäne an einen putativen Rezeptor auf der Zelloberfläche von PBMCs eventuell eine längere Peptidsequenz vorhanden sein muss, wurde das rekombinante Protein $\Delta E1$ NHR-4K (siehe 3.1.3) auf seine Bindungsaffinität untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass bei Verwendung des Konstruktes $\Delta E1$ NHR-4K, unabhängig von der verwendeten Konzentration, nur eine Bindung in einem Bereich unterhalb von 0,1 % detektiert werden konnte. Da das Konstrukt einen für die Aufreinigung und Detektion notwendigen GST-tag besaß, wurde auch die Bindungsaffinität von GST an sich untersucht. Diese lag, genau wie die von unbehandelten bzw. nur mit einem FITC-gekoppelten Anti-GST Antikörper behandelten PBMCs, ebenfalls unter 0,1 %. Daher konnte unter den gewählten Bedingungen keine Bindung des rekombinanten Proteins $\Delta E1$ NHR-4K an PBMCs beobachtet werden. Eine Erklärung könnte in der Konformation des Fusionsproteins liegen, da die $\Delta E1$ NHR-4K-Sequenz möglicherweise innerhalb des GST-Proteins versteckt liegt und dadurch keine Bindung an einen putativen Rezeptor erlaubt. Eventuell könnte auch die Verwendung eines *crosslinkers* wie BS³ bzw. MBS einen positiven Effekt auf das Bindungsverhalten von $\Delta E1$ NHR-4K haben. Zusätzlich wäre die Untersuchung eines Konstruktes, das neben der NHR-Region, in der sich die Isu-Domäne befindet, auch die CHR-Domäne beinhaltet, interessant, da sich so eventuell eine andere Konformation und eine daraus resultierende, höhere Bindung ergeben könnte.

4.2 Gewinnung und Charakterisierung von Peptid-Polymeren

Um den Einfluss des HIV Isu-Peptides auf die Zytokinsekretion sowie die Genexpression humaner PBMCs zu untersuchen, wurden Peptid-Monomere zu Peptid-Polymeren gekoppelt. Frühere Untersuchungen der Isu-Domäne haben gezeigt, dass synthetisch hergestellte Isu-Peptide nur dann die T-Zellproliferation hemmen, wenn eine Kopplung der Peptide an ein Trägermolekül wie BSA erfolgt (Denner et al. 1994). Da es bei dieser Methode aber Probleme mit der Reproduzierbarkeit gab und um eventuell auftretende Einflüsse des Trägermoleküls zu reduzieren, wurde dazu übergegangen, die Isu-Peptide untereinander mittels EDC zu Polymeren zu koppeln (Behrendt 2005) (siehe 2.2.2.1). Diese Methode muss allerdings ebenfalls kritisch betrachtet werden, da die Konformation der polymerisierten Peptide einen großen Einfluss auf die biologische Aktivität hat. In diesem Zusammenhang verglichen Monell et al. (1994) Defensine, bei denen es sich um positiv

geladene, antimikrobielle Oligopeptide handelt, mit dem HIV Isu-Peptid. Laut Monell beruht die Wirksamkeit der Defensine auf gefalteten Loopstrukturen, die durch amphiphatische Domänen mit der Proteinkinase C (PKC) in der Zellmembran interagieren können. Durch intramolekulare Kopplungen zwischen freien Carboxyl- und Aminogruppen könnten sich auch bei den Isu-Peptiden Defensin-ähnliche Loopstrukturen ausbilden, die eine Voraussetzung für die immunsuppressive Wirkung sein könnten. Das Vorkommen dieser Schleifen- bzw. Loopstrukturen steigt mit zunehmendem Vernetzungsgrad, weshalb hochmolekulare Strukturen wohl eher biologisch aktiv sind als niedermolekulare und deshalb wohl auch durch einen Antikörper, der gegen das mit KLH komplexierte Isu-Peptid gerichtet war, im Western Blot detektiert werden konnten (siehe Abbildung 3.8 B, Spur 2). Die Isu- und Ran-Peptidmonomere besitzen jeweils neun freie Amino- und drei freie Carboxylgruppen, die an der Polymerisierung beteiligt sein können (Behrendt 2005). Dadurch können sich eine Vielzahl von sowohl intra- als auch intermolekularen Kopplungen ergeben, was zur Folge hat, dass die Polymere keinen bestimmten Vernetzungsgrad aufweisen.

Alternativ könnten die Untersuchungen auch mit bakteriell exprimiertem gp41 durchgeführt werden. So konnte gezeigt werden, dass das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1 in der Lage ist, die IL-10 Sekretion in PBMCs hochzuregulieren (Koutsonikolis et al. 1997). Dies korreliert mit der Beobachtung, dass in HIV-1 infizierten Patienten ebenfalls eine erhöhte Transkription und Sekretion des Zytokins IL-10 zu beobachten ist (Denis et al. 1994, Masood et al. 1994). Allerdings besteht bei bakteriell exprimiertem gp41 immer die Gefahr der Kontamination mit LPS, wodurch ebenfalls die IL-10 Sekretion induziert werden kann. Dies kann durch die Verwendung von synthetisch hergestellten Peptid-Polymeren vermieden werden.

Da auch durch das HIV Isu-Peptid eine Erhöhung der IL-10 Sekretion in PBMCs beobachtet werden konnte (Denner 1998), wurde die Induktion der IL-10 Sekretion neben der Überprüfung im Western Blot als Marker für die Funktionalität der Peptidpolymere verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten HIV Isu-Peptid Polymere wiesen in Vortests sowohl ein Signal im Western Blot als auch eine Induktion der IL-10 Sekretion von mindestens 300 pg/ml auf, die verwendeten randomisierten HIV Isu-Peptid Homopolymere lagen in den Vortests im Bezug auf die IL-10 Sekretion in einem Bereich zwischen 0 pg/ml und 80 pg/ml.

4.3 Einfluss der HIV Isu- und HIV Ran-Polymere auf die IL-10 Sekretion und die IL-10 Genexpression humaner PBMCs *in vitro*

Das humane Immundefizienz Virus (HIV) ist in der Lage, CD4-positive Zellen des Immunsystems, wie T-Zellen, Blut-Monozyten, dendritische Zellen (DC) und Gewebs-Makrophagen zu infizieren, allerdings ist die Zahl der infizierten Zellen im Organismus extrem klein (Harper et al. 1986, Embretson et al. 1993). Daher kann die Modulation der Immunantwort durch HIV nicht nur durch den Verlust der CD4-positiven Zellen erklärt werden, da die immunsuppressiven Effekte bereits vor der Abnahme der CD4-Zellpopulation auftreten. So gelten die Wirtsantwort in Folge einer HIV-Infektion, sowie die indirekten, durch die HIV-Replikation verursachten Effekte, als entscheidende Faktoren für die Fähigkeit des Virus, das Immunsystem zu unterdrücken (Jiaxiang et al. 2005). In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise, dass eine Beeinträchtigung der Zytokinregulation im Zusammenhang mit einer HIV Infektion zur Immunpathogenese beiträgt (Kedzierska et al. 2003). So konnte gezeigt werden, dass das Zytokin IL-10 in HIV-infizierten Individuen zu einer reduzierten Produktion von TH1-Zytokinen wie IL-2 und IL-12, einer verminderten Antigen-Präsentation sowie zu einer Inhibierung der zellulären Immunantwort führt (Clerici et al. 1993,1994, Taoufik et al. 1997, Schols et al. 1996, Fidler et al. 1999, Landay et al. 1996). PBMCs, die aus HIV-infizierten Spendern isoliert wurden, zeigten im Vergleich zu PBMCs aus gesunden Spendern, eine erhöhte Transkription und Sekretion von IL-10 (Clerici et al. 1994, Denis et al. 1994, Masood et al. 1994). Dieser Anstieg in der IL-10 Expression konnte auch beobachtet werden, wenn PBMCs mit dem rekombinanten transmembranen Hüllprotein von HIV-1 (Speth et al. 2000, Koutsonikolis et al. 1997, Barcova et al. 1998, Takeshita et al. 1995) bzw. dem HIV-1 Isu-Peptid (Denner et al. 1998) inkubiert wurden. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten, dass es Unterschiede gibt im Ausmaß der IL-10 Sekretion nach Inkubation von PBMCs verschiedener Spender mit der gleichen Charge des Isu-Peptid Homopolymers.

Diese Befunde konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Abbildung 3.9). Möglicherweise ist die Interleukin-10 Sekretion in gewisser Weise vom Immunstatus des jeweiligen Spenders abhängig. Obwohl nur PBMCs von gesunden Spendern isoliert wurden, besteht die Möglichkeit, dass ein zum Zeitpunkt der Blutabnahme vorhandener Infekt, der sich im Spender noch nicht durch das Auftreten von Symptomen manifestiert hat, zu einer Aktivierung des Immunsystems und einer daraus resultierenden, veränderten IL-10 Antwort führt. Zum Anderen könnte ein Infekt auch zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung der heterogenen PBMC-Zellpopulation (siehe 3.1.2) führen. Da CD14⁺ Makrophagen bzw. Monozyten die Hauptquelle für die IL-10 Sekretion darstellen (Hagiwara et al. 1996), kann

ein veränderter Anteil der Makrophage/Monozyten in einer unterschiedlichen IL-10 Sekretion resultieren.

Da die Freisetzung von IL-10 als Marker für die Funktionalität neusynthetisierter Homopolymere dient, kann die zuvor beschriebene Spenderabhängigkeit der IL-10 Sekretion zu falsch negativen Ergebnissen führen, da ein eigentlich funktionelles Homopolymer bei Inkubation mit PBMCs eines Spenders mit geringen IL-10 Antworten, keine ausreichend hohe IL-10 Expression induzieren kann. Um eine notwendige Standardisierung der Spendersituation zu erreichen, müsste zum Einen die Zusammensetzung der PBMC-Zellpopulation mittels FACS-Analyse untersucht werden. Eine verminderte Makrophagen/Monozyten-Population könnte dabei einen Hinweis auf eine reduzierte IL-10 Sekretion liefern. Ein Blutsenkungstest, der erste Anzeichen für eine Infektion liefern kann, könnte ebenfalls vor der Blutentnahme durchgeführt werden. Alternativ könnte der Einfluss der Homopolymere auf die IL-10 Expression humaner PBMCs mit einer monozytären Zelllinie wie z.B. MONO-MAC-1 (Steube et al. 1997) oder MV4-11 (Lange et al. 1987) untersucht werden, wodurch spenderspezifische Schwankungen auszuschließen wären.

Um die durch das Isu-Peptid Homopolymer verursachte IL-10 Sekretion humaner PBMCs genauer zu untersuchen, wurden drei Kinetiken über einen Zeitraum von 24h durchgeführt.

Die bereits zuvor beschriebene, spenderabhängige IL-10 Sekretion kann auch in diesem Versuch beobachtet werden. Die Unterschiede im IL-10 Sekretionsprofil bei Verwendung von PBMCs eines Spenders könnten in einem, wie bereits zuvor diskutiert, unterschiedlichen Immunstatus begründet werden. Zusätzlich wurden bei den beiden Kinetiken unterschiedliche Isu-Peptid Homopolymere verwendet, was ebenfalls einen Effekt auf den Verlauf der IL-10 Sekretion haben könnte. Wie bereits in Kapitel 4.2 beschrieben, können verschiedene Vernetzungsgrade in der Kopplung der Isu-Peptid Homopolymere zu geringfügig unterschiedlichen Konformationen führen. In diesem Zusammenhang konnten Jiaxiang et al. zeigen, dass unterschiedliche HIV-1-Stämme (HIV-1₂₁₃, HIV-1_{BaL}, HIV-1_C, HIV-1_{AC-1}) zu unterschiedlichen IL-10 Sekretionen in PBMCs führten (Jiaxiang et al. 2005).

Durch Stimulation von Monozyten mit LPS konnten de Waal Malefyt et al. zeigen, dass die höchste IL-10 Konzentration, im Vergleich zu anderen Zytokinen wie IL-6, IL-8, oder TNF- α , bei denen eine maximale Konzentration schon nach 4-8h erreicht wird, verzögert auftritt und ein maximaler Wert erst nach 24-48h detektiert werden kann (de Waal Malefyt et al. 1991). Diese Beobachtungen trafen, mit Ausnahme der Kinetik B, bei der die maximale Konzentration schon nach 18h auftrat, auch für die hier durchgeführten Kinetiken zu. Der Grund für das zeitlich vorgezogene IL-10 Sekretionsmaximum bei Kinetik B könnte ein spenderabhängiger Effekt sein bzw. auch durch die Verwendung eines anderen Isu-Peptid Homopolymers verursacht worden sein. Außerdem wurden die im ELISA getesteten Kulturüberstände über mehrere Tage bei -80°C eingefroren, daher besteht die Möglichkeit,

dass diese Lagerung bzw. das anschließende Auftauen die zu testenden Proteine teilweise degradiert hat, wodurch ebenfalls Messschwankungen auftreten können. In allen drei Kinetiken war bei den unbehandelten PBMCs eine geringe, basale IL-10 Sekretion zu beobachten (Abbildung 3.10). Dies korreliert mit dem in 1.4.2 beschriebenen Modell der IL-10 Genexpression nach Powell et al. (2000), wonach IL-10 in nicht-stimulierten Zellen zwar konstitutiv exprimiert wird, die mRNA aber durch intrinsische, destabilisierende Signale, auf einem niedrigen Niveau gehalten wird. Diese geringe, in vielen Zelltypen vorkommende IL-10 Expression sorgt für eine allgemeine Einschränkung autoinflammatorischer Prozesse im Körper. Erfolgt eine Stimulation der IL-10 Genexpression, kommt es einerseits zu einer erhöhten IL-10 Transkription und andererseits zu posttranskriptionellen Modifikationen, die eine Stabilisierung der IL-10 mRNA bewirken, wodurch eine effektive Hochregulation der IL-10 Expression möglich wird.

Der Mechanismus der Auslösung der IL-10 Produktion durch HIV-1, als auch durch gp41 bzw. durch das davon abgeleitete Isu-Peptid, ist noch nicht aufgeklärt. Jiayang et al. (2005) konnten allerdings zeigen, dass die IL-10 Produktion in CD14⁺-Monozyten unabhängig vom CD4-Rezeptor auf der Zelloberfläche induziert werden kann. Dabei zeigte sich, dass durch UV-inaktivierte HI-Viren (HIV-1₂₁₃, HIV-1_{BaL}) bzw. lösliches HIV-1 gp160 in der Lage war, in CD14⁺-Monozyten eine IL-10 Sekretion zu induzieren. Bei gleichzeitiger Blockierung des CD4-Rezeptors durch einen monoklonalen anti-CD4-Antikörper konnte im Vergleich zu Ansätzen, in denen der CD4-Rezeptor nicht blockiert wurde, keine Verminderung der IL-10 Sekretion detektiert werden. Außerdem wird deutlich, dass inaktivierte HIV-1 Partikel neben der Fähigkeit, die Proliferation von immunkompetenten Zellen *in vitro* zu inhibieren (Pahwa et al. 1985) auch in der Lage sind, die IL-10 Antwort zu modulieren. Da die Modulation der IL-10 Sekretion auch durch gp160 beobachtet wurde, untermauert dies die Vermutung, dass das transmembrane Hüllprotein eine Rolle bei der Zytokinmodulation und damit bei der Immunpathogenese während der HIV-1 Infektion spielt.

Obwohl die IL-10 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand, wie bereits beschrieben, durch Inkubation von PBMCs mit dem Isu-Peptid ansteigt, konnte IL-10 auf mRNA-Ebene nicht unter den 444 im Microarray hochregulierten Genen detektiert werden. Da der Microarray allerdings das Genexpressionsprofil der PBMCs nach 24h widerspiegelt, wurden die Ergebnisse durch Kinetiken über 24h mit anschließender real time PCR Analyse näher betrachtet.

In allen drei Kinetiken ist ein „peak“ der Interleukin-10 Genexpression in einem Zeitraum zwischen 6 und 10 h feststellbar (Abbildung 3.11). Dabei fällt auf, dass dieser Höchstwert der IL-10 Hochregulation in Kinetik A um das 60-fache erhöht ist, wobei der Höchstwert in Kinetik B um das 21-fache erhöht ist, obwohl beide Kinetiken im IL-10 ELISA einen ähnlichen Verlauf mit einem maximalen IL-10 Gehalt von 620 pg/ml gezeigt haben. Eine mögliche

Erklärung dieser Diskrepanz bestünde darin, dass in Kinetik B ebenfalls ein „peak“ mit Werten vergleichbar zu Kinetik A existiert, dieser aber aufgrund der Messabstände von jeweils 2h nicht detektiert werden konnte. Auch das IL-10 Sekretionsprofil in den beiden ELISAs (siehe Abbildung 3.10 A, B) würde diese Vermutung unterstützen. In Kinetik A ist die größte Steigerung der IL-10 Konzentration von Stunde 6 auf Stunde 8 mit einer Zunahme von ungefähr 100 % beobachtbar. In Kinetik B ist eine solche, sogar noch größere Zunahme der Konzentration um 150 %, von Stunde 8 auf Stunde 10 detektierbar, was einen Hinweis auf einen nicht detektierten „peak“ nach 7 bzw. 9h Stunden liefern könnte.

Untersuchungen von Koutsonikolis et al. zeigten, dass ein maximale Konzentration von IL-10 mRNA nach Stimulation von PBMCs durch das rekombinante gp41 (rgp41) nach 4 h nachgewiesen werden konnte (Koutsonikolis et al. 1997). Unter der Annahme, dass auch der Zeitpunkt des IL-10 mRNA „peaks“ bedingt spenderabhängig ist, korrelieren die Daten von Koutsonikolis mit denen in dieser Kinetik gezeigten Ergebnissen. Die in Kinetik C gezeigte, maximale IL-10 Konzentration von 180 pg/ml bei Spender C.S. äußert sich auch auf mRNA Ebene durch die geringe, maximale Hochregulation der IL-10 Expression um das 5-fache.

Betrachtet man die IL-10 Expression zum Zeitpunkt 24h wird deutlich, warum IL-10 im von der Arbeitsgruppe durchgeführten Microarray nicht als hochreguliertes Gen identifiziert werden konnte, da die IL-10 Genexpression zu diesem Zeitpunkt schon wieder auf ein, mit dem Anfangswert nach 2h vergleichbares, basales Niveau zurückreguliert wurde.

4.4 Einfluss der HIV Isu- und HIV Ran-Polymere auf die Genexpression von MMP-1 und TREM-1 in humanen PBMCs

In vielen von der Arbeitsgruppe durchgeführten Zytokinarrays (siehe **1.4.2**) sowie in zuvor beschriebenen Versuchen (siehe **4.3**) konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von PBMCs mit dem HIV Isu-Peptid in einer Modulation der Zytokinantwort resultiert. Um zu untersuchen, welchen Einfluss das Isu-Peptid auf die Genexpression in PBMCs hat, wurde ein Microarray durchgeführt, der die Expression von 29098 humanen Genen analysierte. Insgesamt konnte die Hochregulation von über 400 Genen detektiert werden (Denner et al. unveröffentlicht). Unter den 25 am stärksten hochregulierten Genen fanden sich der *triggering receptor expressed on myeloid cells 1* (TREM-1) und die Matrix Metalloproteinase 1 (MMP-1).

Da TREM-1 in einem *yeast two-hybrid* screening der Arbeitsgruppe als ein möglicher Interaktionspartner der auf gp41 basierenden Konstrukte Δ NHR und Δ rgp identifiziert wurde, erfolgte eine genauere Analyse der TREM-1 Genexpression nach Inkubation mit dem HIV Isu-Peptid Homopolymer durch real time PCR Analysen. Bei TREM-1 handelt es sich um

einen Oberflächenrezeptor, der vor allem auf Neutrophilen und Monozyten exprimiert wird (Schenk et al. 2007) und deshalb eine Rolle bei der Immunantwort spielt. Es wird postuliert, dass TREM-1 als Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität fungiert (Bleharski et al. 2003).

So ist TREM-1 nach Stimulation zum Einen in der Lage, die Sekretion von proinflammatorischen Chemo- und Zytokinen auszulösen (Bouchon et al. 2000), was zu einer Stimulierung der erworbenen Immunantwort führt, zum Anderen wurde das synergistische Zusammenspiel mit Toll-like Rezeptoren (TLRs) bzw. Nod-like Rezeptoren und die daraus resultierende Aktivierung der angeborenen Immunantwort beschrieben (Netea et al. 2007). Daher kann TREM-1 allgemein als Verstärker der inflammatorischen Immunantwort betrachtet werden (Tessarz et al. 2008). Im Speziellen führt die TREM-1 Aktivierung zu einer erhöhten Sekretion der Zytokine IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α (Tessarz et al. 2008) sowie zu einer Verminderung des anti-inflammatorisch wirksamen IL-10 (Bleharski et al. 2003). Die Expression von TREM-1 auf der Zelloberfläche von Makrophagen und Neutrophilen kann durch Lipopolysaccharid (LPS) (Bouchon et al. 2000, Bleharski et al. 2003), Prostaglandin E2 (PGE2) (Murakami et al. 2007) und durch kristallines Mononatrium-Urat (Murakami et al. 2007) erhöht werden. Auf transkriptioneller Ebene wird TREM-1 durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und PU.1 reguliert (Tessarz et al. 2008). Ein Ligand für TREM-1 konnte bisher nicht eindeutig beschrieben werden, allerdings postulieren Colonna et al. dass TREM-1 lösliche Proteine bzw. Oberflächenproteine erkennt, die aufgrund einer Inflammation und/oder Gewebeschädigung hochreguliert wurden (Colonna et al. 2003). In diesem Zusammenhang konnte die Bindung von TREM-1 an die Oberfläche von ruhenden Thrombozyten in Anwesenheit von LPS detektiert werden (Haselmayer et al. 2007), eine genaue Charakterisierung des TREM-1 Interaktionspartners war allerdings nicht möglich. Auch eine Interaktion mit Pathogenen konnte für TREM-1 beschrieben werden. So führte die Exposition von Neutrophilen mit dem Marburg- und dem Ebola-Virus zu einer Aktivierung der TREM-1 spezifischen Signalkaskade. Zusätzlich konnte die durch die beiden Viren induzierte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, die auch bei einer TREM-1 Aktivierung beobachtet wird, durch Blockierung von TREM-1 inhibiert werden (Mohamadzadeh et al. 2006). Interessanterweise teilt das Hüllprotein des Ebola Virus, welches sich aus den durch eine Disulfidbrücke verbundenen Untereinheiten GP1 und GP2 zusammensetzt, gemeinsame Eigenschaften mit den Oberflächenproteinen von HIV (Malashkevich et al. 1999). So ist GP1 genau wie gp120 für die Bindung an die Zielzelle verantwortlich, wobei GP2, ähnlich wie gp41, die Membranfusion vermittelt. Außerdem findet sich in GP2 eine

Region, die Homologien zur konservierten, immunsuppressiven Domäne der Retroviren aufweist (Volchkov et al. 1992).

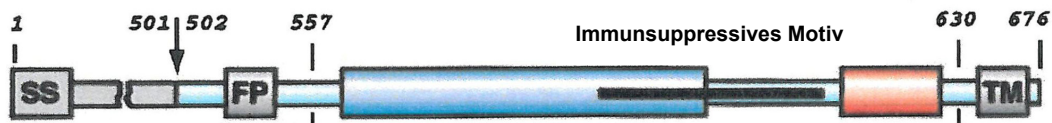


Abbildung 4.1: Vorläuferpeptid von GP1 und GP2 des Ebola-Virus (Malashkevich et al. 1999).

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

MMP-1 zählt mit 23 weiteren Enzymen zur Familie der Matrix Metalloproteasen, die für die Degradation von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) und der Basalmembran verantwortlich sind (McCawley et al. 2001, Pardo und Selman, 2005, Balbin et al. 2001). Neben Fibroblasten, Monocyten, Makrophagen, sind auch Endothel- und Epithelzellen *in vitro* zur Sekretion von MMP-1 im Stande (Woessner und Nagase, 2000). MMP-1 kann als multifunktionelles Protein angesehen werden, da es neben dem Abbau von Bestandteilen der ECM wie Kollagen, Aggrecan oder Versikan auch zur Spaltung von Nicht-Matrix-Substraten im Stande ist (McCawley et al. 2001). So ist MMP-1 zur Degradation des pro-inflammatorisch wirksamen Zytokins IL-1 β (Ito et al. 1996) sowie der pro-inflammatorischen Chemokine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein), MCP-2 und MCP-4 (McQuibban et al. 2002) in der Lage, was eine Rolle bei der Eingrenzung der durch den Abbau der ECM entstehenden, entzündlichen Reaktionen spielen könnte. Auf transkriptioneller Ebene ist MMP-1 durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren, wie z.B. den epidermale Wachstumsfaktor (EGF), die Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGF) -1/-2/-7 und 9 oder den Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) sowie durch eine Vielzahl von Zytokinen wie IL-4, -5, -6, -8 sowie IL-10 induzierbar (Pardo und Selman, 2005). Aufgrund der starken degradativen Wirkung von MMP-1 ist eine stringente Kontrolle der Expression notwendig. Zum Einen gibt es keine konstitutive Expression sowie keine Lagerung von translatierten MMP-1 Molekülen, was dazu führt, dass in ruhendem, normalen Gewebe, kein MMP-1 detektiert werden kann (Pardo und Selman, 2005). Eine erhöhte MMP-1 Sekretion kann nur durch eine erhöhte Aktivierung der Genexpression erreicht werden (Elkington et al. 2005). Zum Anderen wird MMP-1 als Pro-Enzym synthetisiert, das erst durch extrazelluläre Spaltung von Proteasen bzw. anderen Metalloproteinasen, wie z.B. MMP-3/ -7/ -10, aktiviert werden (Webster et al. 2006). Zusätzlich wird MMP-1 nach der Sekretion in der Nähe der Zelle kompartimentiert (Dumin et al. 2001, Brew et al. 2000), wodurch nur lokale Degradationsvorgänge stattfinden können. Eine weitere extrazelluläre Regulation von MMP-

1 findet durch die Aktivität der TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteases) statt, die in einer nicht-kovalenten Art und Weise an das katalytische Zentrum von MMP-1 binden und diese dadurch inhibieren. Im Zusammenhang mit HIV konnte gezeigt werden, dass eine Infektion von MDMs (monocyte derived macrophages) mit zellfreiem, viralem Inokulum zu einer erhöhten MMP-1 Expression führt (Ghorpade et al. 2001). Zusätzlich konnten Webster und Crowe zeigen, dass eine MDM Infektion mit HIV_{BAL} ebenfalls zu einem erhöhten MMP-1 Level führt (Webster und Crowe, 2006).

Um die im Microarray detektierte Hochregulation von MMP-1 und TREM-1 genauer zu untersuchen, wurde die Expression der jeweiligen Gene auf mRNA Ebene mittels real time PCR untersucht.

Dabei zeigt sich, dass es spenderabhängige Unterschiede in der MMP-1 Genexpression nach Inkubation mit dem HIV Isu-Peptid gibt. Die sehr hohen Werte der MMP-1 Expression, mit einer maximalen Hochregulation um das 260.000-fache, hängen mit der Tatsache zusammen, dass in unbehandelten PBMCs keine MMP-1 Expression festgestellt werden konnte. Bei der Auswertung der Daten wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Livak und Schmittgen [Livak et al. 2001] verwendet, bei der die Hochregulation eines Gens auf den CT-Wert unbehandelter Kontrollansätze bezogen wird. Der CT-Wert beschreibt denjenigen PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt (siehe 2.2.1.1). Daher wurden die CT-Werte für die unbehandelten PBMCs mit dem letzten Zyklus der real time PCR gleichgesetzt, wodurch sich ein CT-Wert von 40 ergab. Der für die Berechnung der Expressionsunterschiede entscheidende $\Delta\Delta CT$ -Wert, der sich aus der Subtraktion des ΔCT -Wertes des untersuchten Gens sowie des ΔCT -Wertes der unbehandelten PBMCs ergab, wurde dadurch künstlich erhöht. Durch die anschließende Exponentierung des $\Delta\Delta CT$ -Wertes ergaben sich die sehr hohen Genexpressionswerte. Da eine MMP-1 Expression in unbehandelten PBMCs aber in keiner der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche detektierbar war und die eben beschriebene Methode auf alle Untersuchungen der MMP-1 Genexpression angewandt wurde, sind die erzielten Werte durchaus repräsentativ und untereinander vergleichbar. Auch in den mit dem randomisierten Isu-Peptid Homopolymer inkubierten PBMCs konnte keine MMP-1 Expression detektiert werden, was einen Hinweis darauf liefert, dass eine Erhöhung der MMP-1 Genexpression nicht unspezifisch ausgelöst werden kann. Die nicht detektierbare MMP-1 Expression in unbehandelten PBMCs bzw. mit dem randomisierten Isu-Peptid inkubierten PBMCs steht im Einklang mit dem von Pardo und Selman (2005) gemachten Postulat, dass MMP-1 in ruhendem bzw. nicht aktiviertem Gewebe nicht detektiert werden kann. Interessanterweise korreliert die MMP-1 Genexpression bei verschiedenen Spendern mit der in Abbildung 3.9

beschriebenen IL-10 Sekretion. Dies lässt den Schluss zu, das IL-10, wie auch schon von Pardo und Selman (2005) beschrieben, in der Lage ist, die MMP-1 Genexpression zu induzieren. Dabei scheint die Konzentration von IL-10 eine entscheidende Rolle zu spielen, da eine Konzentration von 75 pg/ml, wie bei Spender D.E. beobachtet, nicht ausreichend zu sein scheint, um eine signifikante MMP-1 Expression zu induzieren. Zusätzlich konnte in diesem Versuch, bei ausreichendem IL-10 Gehalt nach Inkubation mit dem Isu-Peptid Homopolymer, die im Microarray beobachtete Hochregulation von MMP-1, bestätigt werden. Auch bei der Untersuchung der TREM-1 Genexpression nach Inkubation mit dem HIV Isu-Peptid spenderabhängige Effekte beobachtet werden. Die Auswertung dieser Ergebnisse erfolgte nicht nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ - Methode von Livak und Schmittgen [Livak et al. 2001]. Wie bereits erwähnt wird in dieser Methode die Hochregulation des untersuchten Gens auf die Expression in einer unbehandelten Kontrolle bezogen. In der Regel bleiben die ΔCT -Werte des untersuchten Gens in der unbehandelten Kontrolle auf einem konstanten Niveau, im Rahmen dieser Diplomarbeit hat sich allerdings gezeigt, dass die TREM-1 Expression in unbehandelten PBMCs mit fortschreitender Zeit immer geringer wird (siehe Abbildung 3.16), was im späteren Verlauf dieser Arbeit noch diskutiert werden soll. Aufgrund dieses Sachverhaltes werden für die TREM-1 Expression die ΔCT -Rohwerte, die sich aus der Subtraktion des GAPDH-CT-Wertes und des FAM-CT-Wertes ergeben, dargestellt, wodurch immer noch eine Normalisierung der TREM-1 Expression im Verhältnis zur GAPDH-Expression erfolgt. Aufgrund des in der Regel konstant bleibenden GAPDH-Wertes, ergeben sich Unterschiede im ΔCT -Wert hauptsächlich durch Änderungen des FAM-Wertes. Den größten Unterschied in den ΔCT -Werten, auch als $\Delta\Delta CT$ -Wert bezeichnet, im Vergleich der TREM-1 Genexpression nach Inkubation mit dem Isu-Peptid bezogen auf unbehandelte PBMCs, fand sich bei Spender M.E. mit einem $\Delta\Delta CT$ -Wert von 6,5. Bei Spender D.J. lag der $\Delta\Delta CT$ bei 4, Spender D.E. wies einen $\Delta\Delta CT$ -Wert von 5,5 auf. Nach Inkubation von PBMCs mit dem randomisierten Isu-Peptid im Vergleich zu unbehandelten PBMCs waren keine signifikanten Unterschiede in den $\Delta\Delta CT$ -Werten erkennbar, was für eine spezifische Modulation der TREM-1 Expression durch das Isu-Peptid Homopolymer spricht. Eine wie zuvor bei der Untersuchung der MMP-1 Genexpression beschriebenen Korrelation zwischen dem IL-10 Gehalt und der TREM-1 Genexpression konnte in diesem Versuch nicht detektiert werden. Auf einen möglichen Mechanismus der Isu-Peptid abhängigen Modulation der TREM-1 Expression wird später eingegangen.

Auch die MMP-1 Genexpression wurde in den drei zuvor bereits beschriebenen Kinetiken genauer untersucht. Dabei zeigt sich auch hier die Korrelation zwischen IL-10 Konzentration im Zellkulturüberstand und der Induktion der MMP-1 Genexpression. In den Kinetiken A und

B, die sich wie bereits beschrieben durch einen maximalen IL-10 Gehalt von 620 pg/ml auszeichnen, konnte eine deutliche Hochregulation der MMP-1 Genexpression nach 18h um einen Faktor zwischen 9×10^5 und 11×10^5 beobachtet werden (Abbildung 3.15). Der mit 180 pg/ml relativ geringe IL-10 resultierte in einer maximalen Hochregulation der MMP-1 Expression um den Faktor 2×10^5 . Allerdings fällt es auf, dass die MMP-1 Hochregulation in Kinetik B erst nach 15h beginnt, und nicht schon nach 4h, wie in Kinetik A. Eine mögliche Erklärung könnte in der Tatsache liegen, dass die IL-10 Konzentration in Kinetik A nach 8h bereits einen Wert von 400 pg/ml aufweist, wobei diese in Kinetik B zum gleichen Zeitpunkt nur 200 pg/ml beträgt. Dies könnte in einer Verzögerung der MMP-1 Genexpression resultieren. Des Weiteren wurden die in Kinetik B verwendeten PBMCs zu einem anderen Zeitpunkt als die PBMCs in Kinetik A isoliert, was in einen veränderten Immunstatus des Spenders M.E. resultieren könnte. Da MMP-1, wie bereits beschrieben, durch eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren reguliert werden kann, besteht die Möglichkeit, dass einige von diesen, für die Regulation essentielle Faktoren, aufgrund des veränderten Immunstatus zu den frühen Zeitpunkten nicht vorhanden waren, was letztendlich in einer verzögerten Aktivierung der MMP-1 Genexpression resultieren könnte. Zusätzlich wurden unterschiedliche Isu-Peptid Homopolymere verwendet.

Neben der MMP-1 Genexpression wurde auch die TREM-1 Expression im Rahmen der oben bereits beschriebenen Kinetiken genauer analysiert. Die Daten deuten darauf hin, dass es in diesen Kinetiken, im Gegensatz zur vorherigen TREM-1 real time PCR Analyse, einen Zusammenhang zwischen dem IL-10 Gehalt und der TREM-1 Genexpression gibt. So führt die Inkubation von PBMCs mit dem HIV Isu-Peptid Homopolymer in Kinetik A und B neben der Erhöhung der IL-10 Konzentration im Zellkulturüberstand, auch zu einer Aufrechterhaltung der TREM-1 Genexpression auf einem konstanten Niveau (siehe Abbildung 3.16 A, B). Diese Stabilisierung der TREM-1 Expression ist in Kinetik C, in der eine deutlich geringere IL-10 Konzentration vorliegt, nur noch sehr eingeschränkt detektierbar (siehe Abbildung 3.16 C). Allen drei Kinetiken ist die Eigenschaft gemeinsam, dass die TREM-1 Expression in unbehandelten bzw. mit dem randomisierten Isu-Peptid behandelten PBMCs, ab Stunde 10 kontinuierlich abnimmt. Eine Erklärungsmöglichkeit für diese Beobachtung könnte darin bestehen, dass ein für die Aktivierung der NF- κ B- und PU.1-abhängigen Genexpression (Tessarz et al. 2008) wichtiges Protein, wie z.B. ein Wachstumsfaktor oder ein Zytokin, im artifiziellen Zellkulturmedium nicht mehr vorhanden ist was folglich in der Reduzierung der TREM-1 Genexpression resultiert. Für die durch das Isu-Peptid Homopolymer verhinderte Herunterregulation der TREM-1 Genexpression könnte es mehrere Erklärungsversuche geben. Zum Einen bestünde die Möglichkeit, dass die TREM-1 Expression durch eine direkte Bindung des Isu-Peptid Homopolymers an TREM-1 auf der Zelloberfläche auf einem konstanten Niveau stabilisiert werden. Diese Hypothese wird durch

yeast two-hybrid Untersuchungen der Arbeitsgruppe unterstützt, in denen TREM-1 als putativer Interaktionspartner der Konstrukte Δ NHR und Δ rgp, die beide die Isu-Domäne enthalten, identifiziert werden konnte. Allerdings müsste diese Stabilisierung der TREM-1 Genexpression auch bei Kinetik C zu beobachten sein, was nicht der Fall ist. Des Weiteren würde eine Bindung des Isu-Peptids an TREM-1 sehr wahrscheinlich zu einer Aktivierung der TREM-1 Signalkaskade führen, was sich in einer Erniedrigung der IL-10 Sekretion äußern würde (Bleharski et al. 2003). Auch dies konnte in den durchgeführten Kinetiken, nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 3.10 A, B). Zum Anderen könnte die Aufrechterhaltung der TREM-1 Genexpression indirekt durch die Wirkung von IL-10 induziert werden. Wie bereits beschrieben, besteht die Möglichkeit, dass die TREM-1 Expression aufgrund des Fehlens eines essentiellen Faktors im Zellkulturmedium, herunterreguliert wird. Wäre nun IL-10 in der Lage, PBMCs zur Produktion dieses fehlenden Faktors zu stimulieren, würde dies zu einer kontinuierlichen TREM-1 Expression führen. *In vivo* würde dieser stimulierende Effekt von IL-10 auf die TREM-1 Genexpression wohl nicht von großer Bedeutung sein, da dort die essentiellen Faktoren, die für die TREM-1 Expression nötig sind, bereits vorhanden sind. Ausgeschlossen werden kann die Möglichkeit, dass IL-10 die TREM-1 Expression direkt beeinflusst, da gezeigt werden konnte, dass IL-10 einen antagonistischen Effekt auf TREM-1 besitzt. Dies wurde durch FACS-Analysen belegt, in denen die durch LPS induzierte, verstärkte Expression von TREM-1 auf der Zelloberfläche, durch IL-10 verhindert werden konnte (Bleharski et al. 2003).

Die im Microarray beobachtete Veränderung der TREM-1 Genexpression konnte durch die real time Analysen bestätigt werden. Allerdings haben die Untersuchungen gezeigt, dass das veränderte Expressionsprofil nicht durch eine durch das Isu-Peptid Homopolymer induzierte Hochregulation, sondern durch die Verhinderung der Herunterregulation der TREM-1 mRNA im Vergleich zu unbehandelten PBMCs entstanden ist.

4.5 Einfluss der HIV Isu- und HIV Ran-Polymere auf die Sekretion von MMP-1 und TREM-1 durch humane PBMCs *in vitro*

Zur Überprüfung der durch den Microarray sowie die real time PCR gewonnen Ergebnisse, in denen eine Veränderung der Genexpression von MMP-1 und TREM-1 detektiert werden konnte, wurde die Expression von MMP-1 und TREM-1 auch auf Proteinebene untersucht. Sowohl der MMP-1 als auch der TREM-1 ELISA beziehen sich auf die Kinetik A, mit deren Zellkulturüberständen bereits der IL-10 Gehalt gemessen (siehe Abbildung 3.10 A) bzw. mit deren RNA die MMP-1 und TREM-1 Genexpression untersucht wurde.

Dabei zeigt sich, dass die im Microarray detektierte Hochregulation von MMP-1 neben der real time PCR Analyse auch auf Proteinebene durch einen ELISA bestätigt werden konnte. Des Weiteren liefert der MMP-1 ELISA einen weiteren Indiz für die durch IL-10 stimulierte Expression von MMP-1, da der Verlauf der MMP-1 Expression auf Proteinebene fast identisch zu der Sekretion von IL-10 verläuft, allerdings um 2h zeitversetzt (siehe Abbildung 3.17). Dies deutet darauf hin, dass IL-10 eine Rolle bei der Induktion der MMP-1 Expression spielen könnte. Zusätzlich bestätigt der MMP-1 ELISA die Beobachtung, dass in unbehandelten bzw. mit dem randomisierten Isu-Peptid Homopolymer behandelten PBMCs, keine MMP-1 Expression nachweisbar war.

Bei TREM-1 handelt es sich zwar um ein membranständiges Protein, allerdings konnte auch eine lösliche Form im extrazellulären Bereich detektiert werden, die folglich als sTREM-1 (soluble TREM-1) bezeichnet wurde. Diese lösliche Form konnte im durchgeführten TREM-1 ELISA nach Inkubation der PBMCs mit dem Isu-Peptid Homopolymer in einer geringen Konzentration von 140 pg/ml nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.18). In unbehandelten PBMCs konnte kein sTREM-1 nachgewiesen werden, die Inkubation mit dem randomisierten Isu-Peptid resultierte ebenfalls in einer nicht signifikanten Erhöhung der sTREM-1 Konzentration. Über die Entstehung von sTREM-1 gibt es zwei verschiedene Hypothesen. Die eine Hypothese postuliert, dass das lösliche TREM-1 eine splice-Variante von TREM-1 darstellt (Gingras et al. 2002). So konnte eine alternative mRNA splice-Form mit einer 193 bp großen Deletion detektiert werden. Die zweite Hypothese basiert auf der Annahme, dass das lösliche sTREM-1 durch *shedding* von TREM-1 auf der Zelloberfläche entsteht. Gomez-Pina et al. (2007) bestätigten diese Annahme durch die Beobachtung, dass die Inhibition von Matrixmetalloproteinasen, die zum *shedding* von TREM-1 in der Lage sind, zu einer Stabilisierung von TREM-1 auf der Zelloberfläche sowie zu einer Reduktion von sTREM-1 im extrazellulären Bereich führte. Zusätzlich konnte in einer Microarray Analyse von Dower et al. (2008) gezeigt werden, dass die Aktivierung von TREM-1 durch Rezeptor-*crosslinking* bei gleichzeitiger Co-Stimulation mit LPS zu einer Hochregulation von MMP-1 und -10 führte. Mit Hilfe dieser Hypothese könnte die im TREM-1 ELISA detektierte, leicht erhöhte sTREM-1 Konzentration nach Inkubation mit dem Isu-Peptid Homopolymer erklärt werden: TREM-1 wird kontinuierlich auf der Oberfläche exprimiert, durch die Hochregulation von MMP-1 kommt es zum *shedding* des TREM-1 von der Zelloberfläche und zu einer daraus resultierenden Erhöhung der sTREM-1 Konzentration im Zellkulturüberstand.

4.6 Einfluss des IL-10 *gene silencing* auf die Expression von MMP-1 und TREM-1

Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnte bereits gezeigt werden (siehe 4.4), dass IL-10 eine mögliche Rolle bei der Regulation der Genexpression von MMP-1 und TREM-1 spielt. Um diese Vermutung genauer zu untersuchen, sollte die Sekretion von IL-10 durch PBMCs nach Inkubation mit dem HIV Isu-Peptid Homopolymer durch die Methode der RNA-Interferenz reduziert werden (siehe 2.2.1.6) und anschließend die MMP-1 bzw. TREM-1 Genexpression analysiert werden. Dabei hat sich gezeigt, dass durch den Einsatz von gegen IL-10 gerichteter siRNA die Sekretion von IL-10 nach Inkubation durch das Isu-Peptid Homopolymer um mehr als 60 % reduziert werden kann (Abbildung 4.19). Allerdings wurde auch deutlich, dass eine Kontroll-siRNA, die keine Homologien zu humanen *open reading frames* besitzt (siRNA_Ctrl_AllStars_1), nach der Transfektion unbehandelter PBMCs ebenfalls eine IL-10 Antwort hervorrufen konnte, die nur 30% niedriger war als die durch Inkubation von PBMCs mit dem Isu-Peptid Homopolymer verursachte IL-10 Antwort. In diesem Zusammenhang konnte Cekaite et al. (2007) in einem Microarray zeigen, dass die Transfektion von PBMCs mit siRNA zu einer Modulation der Genexpression von ungefähr 400 Genen führte, wobei die meisten hochregulierten Gene für Proteine der Immunantwort, wie z.B. Zytokine, Chemokine oder Chemokin-Rezeptoren kodierten. Es wird postuliert, dass die Vermittlung dieser Modulation der Immunantwort über die endosomalen Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) 3, 7, 8 und 9 erfolgt, mit denen die siRNA nach der Komplexierung mit dem Transfektionsmedium und der daraus folgenden, endozytotischen Aufnahme in Kontakt kommen (Sioud 2005). Diese Hypothese wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass eine direkte Applikation der siRNA ins Zytoplasma, z.B. durch Elektroporation, zu keiner Veränderung der Zytokinantwort führt (Sioud 2005). Die Stimulation der TLRs 3, 7, 8 und 9 führt zu einer Aktivierung des NF κ B-abhängigen Signalweges, der auch eine Rolle bei der Induktion der IL-10 Genexpression spielt (Asadullah et al. 2003).

Bei der Analyse der MMP-1 Genexpression zeigt sich, dass das IL-10 *gene silencing* bei gleichzeitiger Inkubation der PBMCs mit dem HIV Isu-Peptid Homopolymer zu einer nicht mehr detektierbaren MMP-1 Expression führt (Abbildung 3.20 A). Die alleinige Inkubation von PBMCs mit dem Isu-Peptid Homopolymer, sowie die zusätzliche Transfektion mit der Kontroll-siRNA führen erwartungsgemäß zu einer Hochregulation der MMP-1 Genexpression. Diese Beobachtungen korrelieren mit denen im ELISA gemessenen IL-10 Proteinkonzentrationen. Erstaunlicherweise kann bei der durch die alleinige Verwendung der Kontroll-siRNA hervorgerufenen Erhöhung der IL-10 Konzentration, keine Hochregulation der MMP-1 Expression detektiert werden. Folgendes Modell könnte die beobachteten Ergebnisse erklären: IL-10 scheint ein essentieller Faktor für die Hochregulation der MMP-1

Genexpression zu sein, bei nicht Vorhandensein bzw. einer deutlichen Reduktion der IL-10 Konzentration kann eine MMP-1 Expression nicht mehr detektiert werden. Wie bereits beschrieben, wird die MMP-1 Genexpression aber auch von einer Vielzahl anderer Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie z.B. IL-6 und IL-8, reguliert (siehe 4.4). Der in dieser Arbeitsgruppe durchgeführte Zytokinarray (siehe 1.4.2), in dem 93 Zytokine untersucht wurden, hat gezeigt, dass die Inkubation von PBMCs mit dem HIV Isu-Peptid zu einer Hochregulation von etwa 15 Zytokinen führt, unter anderem auch für die, neben IL-10, bei der MMP-1 Genexpression wichtigen IL-6 und IL-8. Da die Induktion der IL-10 Sekretion durch die Kontroll-siRNA über die TLRs 3, 7, 8 und 9 erfolgt, ist es wahrscheinlich, dass bei diesem Signalweg weitere, für die MMP-1 Genexpression wichtige Wachstumsfaktoren bzw. Zytokine, nicht exprimiert werden. Daher besteht die Möglichkeit, dass das Vorhandensein von IL-10 eine essentielle Rolle bei der Hochregulation der MMP-1 Genexpression spielt, da ohne IL-10 keine MMP-1 Expression detektiert werden kann. Allerdings kann das alleinige Vorhandensein von IL-10 bei gleichzeitigem Fehlen anderer, zur Regulation wichtiger Faktoren, nicht zur Modulation der MMP-1 Genexpression beitragen.

Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob IL-10 als alleiniger Marker, neben der Untersuchung im Western Blot, für die Bestimmung der Funktionalität der HIV Isu-Peptid Polymere geeignet ist oder ob die Expression von MMP-1 eventuell als zusätzliches Kriterium herangezogen werden sollte, da diese auf mehreren, durch das HIV Isu-Peptid hervorgerufenen Effekten beruht (IL-10, IL-6, IL-8).

Der zuvor vermutete Zusammenhang zwischen dem IL-10 Gehalt und der TREM-1 Genexpression konnte durch das IL-10 *gene silencing* bestätigt werden. Es ist dabei zu beobachten, dass die $\Delta\Delta\text{CTs}$, die ein Maß für den Unterschied in der Genexpression zwischen zu vergleichenden Proben darstellen, bezogen auf unbehandelte PBMCs, direkt mit dem IL-10 Gehalt korrelieren (siehe Abbildung 3.20 B), unabhängig davon, ob die Erhöhung der IL-10 Konzentration durch Inkubation mit dem Isu-Peptid Homopolymer oder durch den Effekt der Kontroll-siRNA entstanden waren.

5. Zusammenfassung

Infektionen mit HIV und anderen Retroviren sind durch eine starke Unterdrückung des Immunsystems charakterisiert. Der Mechanismus der Auslösung dieser Immunsuppression ist noch weitgehend unbekannt. Es gibt erste Hinweise darauf, dass das transmembrane Hüllprotein gp41 nicht nur bei der Infektion, sondern auch bei der Pathogenese eine wichtige Rolle spielt. Da bisher noch ungeklärt ist, wie gp41 die Immunantwort moduliert, sollte im ersten Teil dieser Diplomarbeit untersucht werden, ob gp41 bzw. ein von der immunsuppressiven Domäne des gp41 abgeleitetes Isu-Peptid, spezifisch an einem putativen Rezeptor auf der Oberfläche von Immunzellen bindet. Dabei konnte mittels Immunfluoreszenz-Analyse und Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass rekombinantes gp41 sowie das Isu-Peptid an die humane T-Zelllinie C8166 sowie an PBMCs bindet, allerdings konnte diese Bindung auch für das randomisierte Isu-Peptid, das sich aus den gleichen Aminosäuren wie das Isu-Peptid zusammensetzt, aber keine Homologien in der Sequenzabfolge aufweist, detektiert werden. Daher ist die Frage der Bindung der Isu-Domäne an einen putativen Rezeptor weiter offen.

Auf der Basis der Daten von Zytokinarrays wurde der Einfluss des Isu-Peptids auf die Expression verschiedener Zytokine untersucht und Kinetiken erstellt. Die Inkubation von PBMCs mit dem Isu-Peptid führte zu einer erhöhten Sekretion von IL-10 mit einem „peak“ der Expression zwischen 6 und 8 Stunden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Sekretion von IL-10 in einer spenderabhängigen Art und Weise verläuft.

Die im Microarray detektierte Hochregulation der MMP-1 Expression konnte sowohl durch real time PCR Analysen als auch auf Proteinebene mittels ELISA bestätigt werden. Die Veränderung der TREM-1 Expression wurde ebenfalls durch die real time PCR sowie durch ELISA bestätigt, allerdings hat sich gezeigt, dass das veränderte TREM-1 Expressionsprofil nicht durch eine durch das Isu-Peptid induzierte Hochregulation, sondern durch Verhinderung der Herunterregulation von TREM-1 im Vergleich zu unbehandelten PBMCs entstanden ist. Durch Unterdrückung der IL-10 Translation mittels RNA-Interferenz konnte außerdem gezeigt werden, dass IL-10 für die Veränderung der Expression von MMP-1 und TREM-1 notwendig ist

Durch den Nachweis, dass das Isu-Peptid von HIV-1 *in vitro* sowohl die Zytokinsekretion als auch die Genexpression humaner Immunzellen modulieren kann, konnte ein Beitrag zum Verständnis der Immunpathogenese während der HIV-Infektion erbracht werden.

6. Literaturverzeichnis

6.1 Paper

Allan JS, Coligan JE, Lee TH, Barin F, Kanki PJ, M'Boup S, McLane MF, Groopman JE, Essex M., Immunogenic nature of a Pol gene product of HTLV-III/LAV. Blood. 1987 Jan;69(1):331-3.

Anand AR, Ganju RK., HIV-1 gp120-mediated apoptosis of T cells is regulated by the membrane tyrosine phosphatase CD45. J Biol Chem. 2006 May 5;281(18):12289-99. Epub 2006 Mar 7.

Andrews JM, Gardner MB., Lower motor neuron degeneration associated with type C RNA virus infection in mice: neuropathological features. J Neuropathol Exp Neurol. 1974 Apr;33(2):285-307

Arthos J, Deen KC, Chaikin MA, Fornwald JA, Sathe G, Sattentau QJ, Clapham PR, Weiss RA, McDougal JS, Pietropaolo C, et al., Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. Cell. 1989 May 5;57(3):469-81.

Asadullah K, Sterry W, Volk HD., Interleukin-10 therapy--review of a new approach. Pharmacol Rev. 2003 Jun;55(2):241-69.

Balbín M, Fueyo A, Knäuper V, López JM, Alvarez J, Sánchez LM, Quesada V, Bordallo J, Murphy G, López-Otín C., Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. J Biol Chem. 2001 Mar 30;276(13):10253-62. Epub 2000 Dec 11.

Baltimore D., Viral RNA-dependent DNA polymerase. 1970. Biotechnology. 1992;24:3-5.

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.

Barcova M, Kacani L, Speth C, Dierich MP., gp41 envelope protein of human immunodeficiency virus induces interleukin (IL)-10 in monocytes, but not in B, T, or NK cells, leading to reduced IL-2 and interferon-gamma production. J Infect Dis. 1998 Apr;177(4):905-13.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983 May 20;220(4599):868-71.

Behrendt R, Immunsuppressive Eigenschaften transmembraner Hüllproteine von Retroviren, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald (2005 Juli)

Benit L, Dessen P, Heidmann T., Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. J Virol. 2001 Dec;75(23):11709-19.

Benson RE, Sanfridson A, Ottinger JS, Doyle C, Cullen BR., Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. J Exp Med. 1993 Jun 1;177(6):1561-6.

- Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, Sieling PA, Stenger S, Colonna M, Modlin RL., A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response.
J Immunol. 2003 Apr 1;170(7):3812-8.
- Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL., An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor.
J Virol. 2000 Apr;74(7):3321-9.
- Boller K, Schönfeld K, Lischer S, Fischer N, Hoffmann A, Kurth R, Tönjes RR., Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles.
J Gen Virol. 2008 Feb;89(Pt 2):567-72.
- 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.
- Bouchon A, Dietrich J, Colonna M., Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes.
J Immunol. 2000 May 15;164(10):4991-5.
- Bouwens M, Afman LA, Müller M., Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increases in fatty acid beta-oxidation: functional role of peroxisome proliferator activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells.
Am J Clin Nutr. 2007 Nov;86(5):1515-23.
- Brandt SM, Mariani R, Holland AU, Hope TJ, Landau NR., Association of chemokine-mediated block to HIV entry with coreceptor internalization.
J Biol Chem. 2002 May 10;277(19):17291-9. Epub 2002 Jan 8.
- Brasseur R, De Loof H, Ruyschaert JM, Rosseneu M., Conformational analysis of lipid-associating proteins in a lipid environment.
Biochim Biophys Acta. 1988 Aug 4;943(1):95-102.
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H., Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.
Biochim Biophys Acta. 2000 Mar 7;1477(1-2):267-83.
- C**anfield PJ, Sabine JM, Love DN. Virus particles associated with leukaemia in a koala.
Aust Vet J. 1988 Oct;65(10):327-8.
- Cekaite L, Furset G, Hovig E, Sioud M., Gene expression analysis in blood cells in response to unmodified and 2'-modified siRNAs reveals TLR-dependent and independent effects.
J Mol Biol. 2007 Jan 5;365(1):90-108. Epub 2006 Sep 16.
- Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS., Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.
Cell. 1997 Apr 18;89(2):263-73.
- Chen YH, Dierich MP., A common epitope on gp41, IFN-alpha and IFN-beta induces protective activity.
Immunol Today. 1998 Dec;19(12):586-7
- Chen YH, Wu W, Yang J, Sui SF, Sun J, Dierich MP., 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 Aug 3;69(2):253-7.
- Chen SS, Lee SF, Wang CT., Cellular membrane-binding ability of the C-terminal cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane protein gp41.
J Virol. 2001 Oct;75(20):9925-38.

Cianciolo GJ, Copeland TD, Oroszlan S, Snyderman R., Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science*. 1985 Oct 25;230(4724):453-5.

Clerici M, Shearer GM., A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today*. 1993 Mar;14(3):107-11.

Clerici M, Shearer GM., Cellular immunity and a type 1 cytokine profile in protection against HIV infection and progression to AIDS. *Res Immunol*. 1994 Oct-Dec;145(8-9):635-41; discussion 641-3.

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.

Coffin JM., Retrovirus restriction revealed. *Nature*. 1996 Aug 29;382(6594):762-3.

Cohen SS, Li C, Ding L, Cao Y, Pardee AB, Shevach EM, Cohen DI., Pronounced acute immunosuppression in vivo mediated by HIV Tat challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10842-7.

Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D., HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 1998 Jan 22;391(6665):397-401.

Colonna M, Facchetti F., TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J Infect Dis*. 2003 Jun 15;187 Suppl 2:S397-401.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S., Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*. 1993 Jan 15;150(2):353-60.

Delves PJ, Roitt IM., The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Jul 13;343(2):108-17.

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.

Denner J, Wunderlich V, Bierwolf D, 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): K19-K26

Denner J, Wunderlich V, Sydow G, 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): 177-186

Denner J, Wunderlich V, Bierwolf D., Suppression of human lymphocyte mitogen response by proteins of the type-D retrovirus PMFV. *Int J Cancer*. 1986 Feb 15;37(2):311-6.

Denner J, Immunosuppression by oncogenic retroviridae. In: Zschiesche, W. (ed.), *Modulation of the immune responsiveness by infectious agents*, Fischer Verlag 1987, Jena: 140-201

Denner J, Vogel T, Norley S, Ennen J, Kurth R, The immunosuppressive (ISU-) peptide of HIV-1: Binding to lymphocyte surface proteins, *J Cancer Research and Clinical Oncology* 1993, 119(Suppl 1): 28

- Denner J, Norley S, Kurth R., The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients.
AIDS. 1994 Aug;8(8):1063-72.
- Denner J, Vogel T, Norley S, Hoffmann A, Kurth R, The immunosuppressive (ISU-) peptide of HIV-1: Binding proteins of lymphocytes detected by different methods. J Cancer Research and Clinical Oncology 1995, 121: 34
- Denner J, Persin C, Vogel T, Haustein D, Norley S, Kurth R., The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation.
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1996 Aug 15;12(5):442-50.
- Denner J., Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation.
Ann N Y Acad Sci. 1998 Dec 30;862:75-86.
- Denner J., How does HIV induce AIDS? The virus protein hypothesis.
J Hum Virol. 2000 Mar-Apr;3(2):81-2.
- Denner J., AIDS und die Vorstadien. Ein Leitfaden für Praxis und Klinik. Editorial: AIDS-Pathogenese noch immer unklar, S.1-3
Herausgegeben von J.L'ager-Stehr und E.B.Helm 2002, Springer-Verlag
- Doolittle WF, Sapienza C., Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution.
Nature. 1980 Apr 17;284(5757):601-3.
- D'Souza MP, Cairns JS, Plaeger SF., Current evidence and future directions for targeting HIV entry: therapeutic and prophylactic strategies.
JAMA. 2000 Jul 12;284(2):215-22.
- De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE., Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.
J Exp Med. 1991 Nov 1;174(5):1209-20.
- De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE., Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression.
J Exp Med. 1991 Oct 1;174(4):915-24.
- Dolei A, Biolchini A, Serra C, Curreli S, Gomes E, Dianzani F., Increased replication of T-cell-tropic HIV strains and CXCR4-chemokine receptor-4 induction in T cells treated with macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta and RANTES beta-chemokines.
AIDS. 1998 Jan 22;12(2):183-90.
- Dower K, Ellis DK, Saraf K, Jelinsky SA, Lin LL., Innate immune responses to TREM-1 activation: overlap, divergence, and positive and negative cross-talk with bacterial lipopolysaccharide.
J Immunol. 2008 Mar 1;180(5):3520-34.
- Dukers DF, Meij P, Vervoort MB, Vos W, Scheper RJ, Meijer CJ, Bloemena E, Middeldorp JM., Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1.
J Immunol. 2000 Jul 15;165(2):663-70.
- Dumin JA, Dickeson SK, Stricker TP, Bhattacharyya-Pakrasi M, Roby JD, Santoro SA, Parks WC., Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen.
J Biol Chem. 2001 Aug 3;276(31):29368-74. Epub 2001 May 18.
- Elkington PT, O'Kane CM, Friedland JS., The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease.
Clin Exp Immunol. 2005 Oct;142(1):12-20.

- Evans DT, Desrosiers RC., Immune evasion strategies of the primate lentiviruses. *Immunol Rev.* 2001 Oct;183:141-58.
- Fauci AS, Desrosiers RC, Pathogenesis of HIV and SIV, p. 587-636. In *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Fan T, Day NK, Luangwedchakarn V, Chang Y, Ikehara S, Lerner DL, Haraguchi S., The phosphorylation of phospholipase C-gamma1, Raf-1, MEK, and ERK1/2 induced by a conserved retroviral peptide. *Peptides.* 2005 Nov;26(11):2165-74. Epub 2005 Jun 22.
- Fauci AS., Immunopathogenesis of HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1993 Jun;6(6):655-62.
- Fauci AS., Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature.* 1996 Dec 12;384(6609):529-34.
- Faxvaag A, Espevik T, Dalen A., 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 Dec;102(3):487-95.
- Fidler SJ, Rees AD., Antigen presenting cell function in HIV-1 infected patients. *Immunol Lett.* 1999 Mar;66(1-3):129-34.
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas, S. A., Driver S. E., Mello C. C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 1998 391: 806–811
- Gallo RC, Sliski A, Wong-Staal F., Origin of human T-cell leukaemia-lymphoma virus. *Lancet.* 1983 Oct 22;2(8356):962-3
- Gallo RC, Burny A, Zagury D., Targeting Tat and IFN(alpha) as a therapeutic AIDS vaccine. *DNA Cell Biol.* 2002 Sep;21(9):611-8.
- Geissler E, Theile M., Virus-induced gene mutations of eukaryotic cells. *Hum Genet.* 1983;63(1):1-12.
- Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA., Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology.* 1987 Jan;156(1):171-6.
- Ghorpade A, Persidskaia R, Suryadevara R, Che M, Liu XJ, Persidsky Y, Gendelman HE., Mononuclear phagocyte differentiation, activation, and viral infection regulate matrix metalloproteinase expression: implications for human immunodeficiency virus type 1-associated dementia. *J Virol.* 2001 Jul;75(14):6572-83.
- Gingras D, Bousquet-Gagnon N, Langlois S, Lachambre MP, Annabi B, Béliveau R., Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett.* 2001 Oct 26;507(2):231-6.
- Gómez-Piña V, Soares-Schanoski A, Rodríguez-Rojas A, Del Fresno C, García F, Vallejo-Cremades MT, Fernández-Ruiz I, Arnalich F, Fuentes-Prior P, López-Collazo E.. Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol.* 2007 Sep 15;179(6):4065-73.
- 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.

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.

Gupta S, Boppana R, Mishra GC, Saha B, Mitra D., HIV-1 Tat suppresses gp120-specific T cell response in IL-10-dependent manner.
J Immunol. 2008 Jan 1;180(1):79-88.

Hagiwara E, Adams EM, Plotz PH, Klinman DM., Abnormal numbers of cytokine producing cells in patients with polymyositis and dermatomyositis.
Clin Exp Rheumatol. 1996 Sep-Oct;14(5):485-91.

Hanger JJ, Bromham LD, McKee JJ, O'Brien TM, Robinson WF., The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to Gibbon ape leukemia virus.
J Virol. 2000 May;74(9):4264-72.

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.

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.

Haraguchi, S., R.A. Good, and N.K. Day, Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns.
Immunol Today, 1995. 16(12): p. 595-603.

Harper ME, Kaplan MH, Marselle LM, Pahwa SG, Chayt KJ, Sarngadharan MG, Wong-Staal F, Gallo RC., Concomitant infection with HTLV-I and HTLV-III in a patient with T8 lymphoproliferative disease.
N Engl J Med. 1986 Oct 23;315(17):1073-8.

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.

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.

Haselmayer P, Grosse-Hovest L, von Landenberg P, Schild H, Radsak MP., TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation.
Blood. 2007 Aug 1;110(3):1029-35. Epub 2007 Apr 23.

Henderson LA, Qureshi MN., A peptide inhibitor of human immunodeficiency virus infection binds to novel human cell surface polypeptides.
J Biol Chem. 1993 Jul 15;268(20):15291-7.

Herniou E, Martin J, Miller K, Cook J, Wilkinson M, Tristem M., Retroviral diversity and distribution in vertebrates.
J Virol. 1998 Jul;72(7):5955-66.

Hoover EA, Mullins JL., Feline leukemia virus infection and diseases.
J Am Vet Med Assoc. 1991 Nov 15;199(10):1287-97

Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR., Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1.
Science. 1991 Jul 5;253(5015):71-4.

Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y., Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases.
J Biol Chem. 1996 Jun 21;271(25):14657-60.

Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE., Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression.
Nature. 1988 Jan 21;331(6153):280-3.

Jiaxiang Ji, Gautam K. Sahu, Vivian L. Braciale and Miles W. Cloyd, HIV-1 induces IL-10 production in human monocytes via a CD4-independent pathway,
International Immunology 2005 17(6):729-736

Jones KA, Peterlin BM., Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter.
Annu Rev Biochem. 1994;63:717-43.

Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC., A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia.
Science. 1982 Nov 5;218(4572):571-3.

Kanki P.J, Hopper J.R., Essex M., The origins of HIV-1 and HTLV-4/HIV-2
Ann N Y Acad Sci. 1987; 11:370-5.

Kaplan AH, Manchester M, Swanstrom R., The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency.
J Virol. 1994 Oct;68(10):6782-6.

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

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.

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.

Landay AL, Clerici M, Hashemi F, Kessler H, Berzofsky JA, Shearer GM., In vitro restoration of T cell immune function in human immunodeficiency virus-positive persons: effects of interleukin (IL)-12 and anti-IL-10.
J Infect Dis. 1996 May;173(5):1085-91.

Lange B, Valtieri M, Santoli D, Caracciolo D, Mavilio F, Gemperlein I, Griffin C, Emanuel B, Finan J, Nowell P, et al., Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines.
Blood. 1987 Jul;70(1):192-9.

Lee SF, Wang CT, Liang JY, Hong SL, Huang CC, Chen SS., Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41.
J Biol Chem. 2000 May 26;275(21):15809-19.

Livak, KJ, Schmittgen, TD: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, Methods 2001, **25**: 402-408

Lund FE, Garvy BA, Randall TD, Harris DP., Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease.
Curr Dir Autoimmun. 2005;8:25-54.

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.

Malashkevich VN, Schneider BJ, McNally ML, Milhollen MA, Pang JX, Kim PS., Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-A resolution.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 16;96(6):2662-7.

Mallet F, Prudhomme S., Retroviral inheritance in man
J Soc Biol. 2004;198(4):399-412.

Mangeny M, Heidmann T., Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 8;95(25):14920-5.

Mangeny M, de Parseval N, Thomas G, Heidmann T., The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties.
J Gen Virol. 2001 Oct;82(Pt 10):2515-8.

Mangeny M, Renard M, Schlecht-Louf G, Bouallaga I, Heidmann O, Letzelter C, Richaud A, Ducos B, Heidmann T., Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Dec 18;104(51):20534-9. Epub 2007 Dec 12.

Masood R, Lunardi-Iskandar Y, Moudgil T, Zhang Y, Law RE, Huang CL, Puri RK, Levine AM, Gill PS., IL-10 inhibits HIV-1 replication and is induced by tat.
Biochem Biophys Res Commun. 1994 Jul 15;202(1):374-83.

Mathes L, Olsen R, Hebebrand L, Hoover E, Schaller J, Adams P, Nichols W, Immunosuppressive properties of a virion polypeptide, a 15,000-dalton protein, from feline leukemia virus. Cancer Res 1979, 39(3): 950-955

Mattson G, Conklin E, Desai S, Nielander G, Savage MD, Morgensen S., A practical approach to crosslinking.
Mol Biol Rep. 1993 Apr;17(3):167-83.

McCawley LJ, Matrisian LM., Tumor progression: defining the soil round the tumor seed.
Curr Biol. 2001 Jan 9;11(1):R25-7.

McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM., Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo.
Blood. 2002 Aug 15;100(4):1160-7.

Medstrand P, Landry JR, Mager DL., Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans.
J Biol Chem. 2001 Jan 19;276(3):1896-903. Epub 2000 Oct 27.

Mitani M, Cianciolo GJ, Snyderman R, Yasuda M, Good RA, Day NK., Suppressive effect on polyclonal B-cell activation of a synthetic peptide homologous to a transmembrane component of oncogenic retroviruses.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jan;84(1):237-40.

Mohamadzadeh M, Coberley SS, Olinger GG, Kalina WV, Ruthel G, Fuller CL, Swenson DL, Pratt WD, Kuhns DB, Schmaljohn AL., Activation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 on human neutrophils by marburg and ebola viruses.
J Virol. 2006 Jul;80(14):7235-44.

Monell CR, Strand M., Structural and functional similarities between synthetic HIV gp41 peptides and defensins.

Clin Immunol Immunopathol. 1994 Jun;71(3):315-24.

Montagnier L., AIDS priority.

Nature. 1984 Aug 9-15;310(5977):446.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-73.

Murakami Y, Kohsaka H, Kitasato H, Akahoshi T., Lipopolysaccharide-induced up-regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on macrophages is regulated by endogenous prostaglandin E2.

J Immunol. 2007 Jan 15;178(2):1144-50.

Netea MG, Azam T, Ferwerda G, Girardin SE, Kim SH, Dinarello CA., Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR (NLR) pattern recognition receptors.

J Leukoc Biol. 2006 Dec;80(6):1454-61. Epub 2006 Aug 29.

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.

Olsen R, Hoover E, Schaller J, Mathes L, Wolff L, Abrogation of resistance to feline oncornavirus disease by immunization with killed feline leukemia virus. Cancer Res 1977 37(7 Pt 1): 2082-2085

Olshevsky U, Helseth E, Furman C, Li J, Haseltine W, Sodroski J., Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding.

J Virol. 1990 Dec;64(12):5701-7.

Orgel LE, Crick FH., Selfish DNA: the ultimate parasite.

Nature. 1980 Apr 17;284(5757):604-7.

Pahwa S, Pahwa R, Saxinger C, Gallo RC, Good RA., 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 Dec;82(23):8198-202.

Pardo A, Selman M., MMP-1: the elder of the family.

Int J Biochem Cell Biol. 2005 Feb;37(2):283-8.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC., Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Dec;77(12):7415-9

Ponferrada VG, Mauck BS, Wooley DP., The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus.

Arch Virol. 2003 Apr;148(4):659-75.

Powell MJ, Thompson SA, Tone Y, Waldmann H, Tone M., Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region.

J Immunol. 2000 Jul 1;165(1):292-6.

Rasola A, Gramaglia D, Boccaccio C, Comoglio PM., Apoptosis enhancement by the HIV-1 Nef protein.

J Immunol. 2001 Jan 1;166(1):81-8.

Riemann M, Endres R, Liptay S, Pfeffer K, Schmid RM., The IkappaB protein Bcl-3 negatively regulates transcription of the IL-10 gene in macrophages.
J Immunol. 2005 Sep 15;175(6):3560-8.

Robey FA, Kelson-Harris T, Roller PP, Robert-Guroff M., A helical epitope in the C4 domain of HIV glycoprotein 120.
J Biol Chem. 1995 Oct 13;270(41):23918-21.

Robinson L., Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)--an update.
N Z Nurs Forum. 1985 Aug-Sep;13(2):7-14.

Rosen CA, Sodroski JG, Haseltine WA., The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat.
Cell. 1985 Jul;41(3):813-23.

Rote NS, Chakrabarti S, Stetzer BP., The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development.
Placenta. 2004 Sep-Oct;25(8-9):673-83.

Rous P., Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate.
JAMA 1911; 56:198

Ruegg CL, Monell CR, Strand M., Identification, using synthetic peptides, of the minimum amino acid sequence from the retroviral transmembrane protein p15E required for inhibition of lymphoproliferation and its similarity to gp21 of human T-lymphotropic virus types I and II.
J Virol. 1989 Aug;63(8):3250-6.

Ruegg CL, Strand M., 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 Dec;10(6):621-6.

Ruegg CL, Strand M., 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 Oct 1;137(1):1-13.

Sackett K, Shai Y., How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain.
J Mol Biol. 2003 Oct 10;333(1):47-58.

Schagger H, von Jagow G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.
Anal Biochem. 1987 Nov 1;166(2):368-79.

Schenk M, Bouchon A, Seibold F, Mueller C., TREM-1--expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases.
J Clin Invest. 2007 Oct;117(10):3097-106.

Schols D, De Clercq E., Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production.
J Virol. 1996 Aug;70(8):4953-60.

Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM., Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein.
Nat Med. 1996 Mar;2(3):338-42.

- Shnaper S, Sackett K, Gallo SA, Blumenthal R, Shai Y., The C- and the N-terminal regions of glycoprotein 41 ectodomain fuse membranes enriched and not enriched with cholesterol, respectively.
J Biol Chem. 2004 Apr 30;279(18):18526-34. Epub 2004 Feb 23.
- Sioud M, Induction of Inflammatory Cytokines and Interferon Responses by Double-stranded and Single-stranded siRNAs is Sequence-dependent and Requires Endosomal Localization, Journal of Molecular Biology 2005 348, 1079-1090
- Sourvinos G, Tsatsanis C, Spandidos DA., Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis. Folia Biol (Praha). 2000;46(6):226-32.
- Speth C, Joebstl B, Barcova M, Dierich MP., HIV-1 envelope protein gp41 modulates expression of interleukin-10 and chemokine receptors on monocytes, astrocytes and neurones. AIDS. 2000 Apr 14;14(6):629-36.
- Stein BS, Engleman EG.. Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. J Biol Chem. 1990 Feb 15;265(5):2640-9.
- Steube KG, Teepe D, Meyer C, Zaborski M, Drexler HG., A model system in haematology and immunology: the human monocytic cell line MONO-MAC-1. Leuk Res. 1997 Apr;21(4):327-35.
- T**acke S, Kurth R, Denner J, Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? Virolog 2000, 268(1): 87-93
- 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.
- Taoufik Y, Lantz O, Wallon C, Charles A, Dussaix E, Delfraissy JF., Human immunodeficiency virus gp120 inhibits interleukin-12 secretion by human monocytes: an indirect interleukin-10-mediated effect. Blood. 1997 Apr 15;89(8):2842-8.
- V**alentin A, Matsuda S, Asjo B., Characterization of the in vitro maturation of monocytes and the susceptibility to HIV infection. AIDS Res Hum Retroviruses. 1990 Aug;6(8):977-8.
- Van Regenmortel MH., From absolute to exquisite specificity. Reflections on the fuzzy nature of species, specificity and antigenic sites. J Immunol Methods. 1998 Jul 1;216(1-2):37-48
- Virelizier JL., Mechanisms of immunodepression induced by viruses: possible role of infected macrophages. Biomedicine. 1975 Jul;22(4):255-61.
- Volchkov VE, Blinov VM, Netesov SV.. The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive-like domain similar to oncogenic retroviruses. FEBS Lett. 1992 Jul 6;305(3):181-4.
- Von Schwedler U, Kornbluth RS, Trono D., The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jul 19;91(15):6992-6.
- W**ebster NL, Crowe SM., Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases. J Leukoc Biol. 2006 Nov;80(5):1052-66. Epub 2006 Sep 7.

Weislow OS, Fisher OU, Jr., Twardzik DR, Hellman A, Fowler AK, Depression of mitogen-induced lymphocyte blastogenesis by baboon endogenous retrovirus-associated components. *Proc Soc Exp Biol Med* 1981 166: 522-7

Weissman I., Approaches to an understanding of pathogenetic mechanisms in AIDS. *Rev Infect Dis.* 1988 Mar-Apr;10(2):385-98.

Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC., Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature.* 1997 May 22;387(6631):426-30.

Wilk T, Pfeiffer T, Bosch V., Retained in vitro infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product. *Virology.* 1992 Jul;189(1):167-77.

Wild C, Greenwell T, Shugars D, Rimsky-Clarke L, Matthews T., The inhibitory activity of an HIV type 1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1995 Mar;11(3):323-5.

Woessner F, Nagase H, *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*, Oxford University Press 2000, pp. 223.

Xu XN, Screaton GR, Gotch FM, Dong T, Tan R, Almond N, Walker B, Stebbings R, Kent K, Nagata S, Stott JE, McMichael AJ., Evasion of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses by nef-dependent induction of Fas ligand (CD95L) expression on simian immunodeficiency virus-infected cells. *J Exp Med.* 1997 Jul 7;186(1):7-16.

Yoon K, Jeong JG, Kim S., Stable expression of human immunodeficiency virus type 1 Nef confers resistance against Fas-mediated apoptosis. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001 Jan 20;17(2):99-104.

6.2 Lehrbücher

Modrow S, Falke D, Truyen, U, *Molekulare Virologie*, 2. Auflage 2003, Spektrum Akademischer Verlag, ISBN 382741086X

Janeway C A, Travers P, Walport M, *Immunologie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag 2002, ISBN 3827410797

Flint S J, Enquist, L W, Racaniello V R, Skalka A M, *Principles of Virology*, 2. edition 2004, ASM Press, ISBN 1555812597

Madigan M T, Martinko J M, Parker J, *Brock Biology of Microorganisms*, 10. edition 2003, Pearson Education, ISBN 0130491470

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Kurth und bei Herrn Dr. Joachim Denner für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Diplomarbeit sowie für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe P13 bedanken. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Denner für die exzellente Betreuung, die ständige Ansprechbarkeit und die Diskussionsbereitschaft danken.

Prof. Dr. Andreas Peschel danke ich für Bereitschaft, als Gutachter dieser Diplomarbeit zu fungieren.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Magdalena Eschricht für die vielen Ratschläge, die hervorragende Betreuung, das Korrekturlesen meiner Arbeit sowie für die anregenden Gespräche bedanken.

Rayk Behrendt danke ich für die Einarbeitung in die Real Time PCR und die Durchflusszytometrie, die Unterstützung bei den FACS-Messungen und die Beantwortung zahlreicher Fragen.

Für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe P13 des Robert Koch-Instituts danken. Dabei geht besonderer Dank an Martina Lau, Christa-Maria Schmidt, Kerstin Petsch, Debora Mihica und Levent Akyüz.

Meinen Eltern und meiner Freundin Nicole danke ich für die Aufmunterungen, das Vertrauen und die ständige Unterstützung in jeglicher Hinsicht.