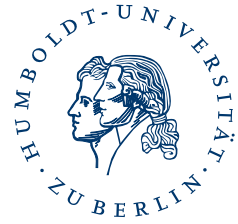


HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT I
INSTITUT FÜR BIOLOGIE

Diplomarbeit
ZUM ERWERB DES AKADEMISCHEN GRADES
DIPLOM-BIOLOGIN

**Einfluss des immunsuppressiven Peptids von HIV-1
auf die Genexpression in humanen Immunzellen**

vorgelegt von
Hyunmi Ryu

angefertigt in der Arbeitsgruppe
Retrovirus-induzierte Immunsuppression
am Robert Koch-Institut

Berlin, im Mai 2009

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT I
INSTITUT FÜR BIOLOGIE

Diplomarbeit
ZUM ERWERB DES AKADEMISCHEN GRADES
DIPLOM-BIOLOGIN

**Einfluss des immunsuppressiven Peptids von HIV-1
auf die Genexpression in humanen Immunzellen**

vorgelegt von
Hyunmi Ryu

angefertigt in der Arbeitsgruppe
Retrovirus-induzierte Immunsuppression
am Robert Koch-Institut

Berlin, im Mai 2009

Erster Gutachter: Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk
Humboldt Universität zu Berlin

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dr. Reinhard Kurth
Robert Koch-Institut, Berlin

Für meine geliebten Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Retroviren	2
1.1.1	Einteilung der Retroviren	2
1.1.2	Morphologie der Retroviren	3
1.1.3	Genomstruktur der Retroviren.....	4
1.1.4	Replikations- und Infektionszyklus der Retroviren.....	5
1.1.5	Virusproteine des HIV-1.....	8
1.1.5.1	Gruppenspezifische Antigene (Gag-Proteine)	8
1.1.5.2	Virale Enzyme (<i>pol</i> -Genprodukte).....	8
1.1.5.3	Virale Hüllproteine (<i>env</i> -Genprodukte)	9
1.2	Retrovirale Immunsuppression	12
1.2.1	Immunsuppressive Domäne der Retroviren	12
1.2.2	Modulation der Zytokinproduktion durch das HIV-1 TM-Protein und ISU-Peptid	15
1.2.3	Modulation der Genexpression durch das HIV-1 ISU-Peptid.....	15
1.3	Transforming growth factor-β1	18
1.4	Zielsetzung	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Antikörper.....	21
2.1.2	Puffer und Chemikalien.....	21
2.1.3	Geräte.....	23
2.1.4	Kommerzielle Kits.....	24
2.1.5	Peptide	24
2.1.6	Primer und Sonden	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1.1	Herstellung von RNase-freiem Wasser	26
2.2.1.2	Isolierung von RNA aus PBMCs mittels RNeasy-Kit	26
2.2.1.3	Isolierung von Nukleinsäuren aus humanen PBMCs mittels TRI-Reagent und RNeasy-Kit.....	27
2.2.1.4	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren.....	28
2.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.1.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
2.2.1.7	Quantitative real time PCR	30
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	34
2.2.2.1	Kopplung von Peptiden zu Polymeren.....	34
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	35
2.2.2.3	Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.2.3	Immunologische Methoden	36
2.2.3.1	IL-10 Capture ELISA (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>).....	36
2.2.3.2	Immunfluoreszenz	37
2.2.3.3	Western Blot Analyse.....	38
2.2.4	Zellbiologische Methoden	39
2.2.4.1	Isolierung humaner PBMCs aus Vollblut und Buffy Coats.....	39

2.2.4.2	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	40
2.2.4.3	Zellkulturversuche mit humanen PBMCs.....	41
2.2.4.4	Kultivierung von Mv1Lu	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Etablierung einer One-Step real time RT-PCR zur Quantifizierung der Expression verschiedener zellulärer Gene.....	43
3.1.1	Optimierung der PCR-Konditionen mittels Gradienten-PCR	43
3.1.2	Etablierung einer Duplex real time RT-PCR.....	44
3.1.3	Effizienzbestimmung der real time RT-PCR.....	45
3.2	Charakterisierung der Peptid-Homopolymere	46
3.3	Einfluss der HIV-ISU- und HIV-RAN-Homopolymere auf die IL-10 Produktion humaner PBMCs <i>in vitro</i>.....	48
3.4	Einfluss von HIV-ISU- und HIV-RAN-Homopolymeren auf die Expressionen verschiedener zellulärer Gene in humanen PBMCs <i>in vitro</i>	53
3.4.1	Einfluss auf die Expression von TREM-2, CXCL-9 und FCN1 in humanen PBMCs <i>in vitro</i>	53
3.4.2	Einfluss auf die Expression von IL-6, TREM-1 und MMP-1 in humanen PBMCs <i>in vitro</i>	57
3.5	Untersuchung der Genexpressionen in den mit HIV-1 infizierten humanen PBMCs <i>in vitro</i>.....	62
3.5.1	Quantifizierung der HIV-1 Provirusintegration in humanen PBMCs mittels real time PCR Analyse	63
3.5.2	Genexpressionsmuster von IL-10, IL-6, CXCL-9, FCN1, TREM-1/-2 und MMP-1 in den mit HIV-1 infizierten humanen PBMCs	66
3.6	Analyse der Bindung von HIV ISU-Peptid und TGF-β1 an Nerzlungenepithelzellen	74
4	Diskussion	75
4.1	Charakterisierung der ISU- und RAN-Homopolymere	75
4.2	Einfluss der HIV-ISU- und HIV-RAN-Homopolymere auf die Genexpression humaner PBMCs <i>in vitro</i>	79
4.2.1	IL-10 Produktion humaner PBMCs nach Behandlung mit HIV-1 ISU-Homopolymeren	79
4.2.2	Expression verschiedener zellulärer Gene in humanen PBMCs nach Behandlung mit HIV-1 ISU-Homopolymeren	81
4.2.2.1	IL-6.....	82
4.2.2.2	CXCL-9.....	83
4.2.2.3	FCN1	84
4.2.2.4	TREM-1/-2	85
4.2.2.5	MMP-1	87
4.3	Expression von IL-10, IL-6, CXCL-9, FCN1, TREM-1/-2 und MMP-1 bei HIV1 infizierten humanen PBMCs <i>in vitro</i>.....	88
4.3.1	Analyse der IL-10 Expression bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs	89
4.3.2	Analyse der IL-6 Expression bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs	90
4.3.3	Analyse der CXCL-9 Expression bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs	90
4.3.4	Analyse der FCN1 Expression bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs	91

4.3.5	Analyse der TREM-1/-2 Expression bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs	91
4.3.6	Analyse der MMP-1 Expression bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs.....	92
4.4	Einfluss der HIV-1 Proviruslast in humanen PBMCs auf die Genexpression .	92
4.5	Das ISU-Peptid von HIV-1 und TGF-β1	93
5	Zusammenfassung.....	94
6	Literaturverzeichnis.....	95
	Danksagung.....	111
	Eigenständigkeitserklärung.....	112

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Retroviruspartikels am Beispiel des HIV-1	3
Abbildung 1.2: Darstellung des RNA-Genoms der infektiösen Retroviren	4
Abbildung 1.3: Darstellung des integrierten Provirus-DNA am Beispiel des HIV-1	5
Abbildung 1.4: Replikationszyklus von HIV-1.....	6
Abbildung 1.5: Schematische primäre Struktur des TM-Proteins gp41 von HIV-1	11
Abbildung 1.6: Modell der HIV-Hüllprotein-vermittelten Fusionsreaktion während der Infektion	12
Abbildung 1.7: Sequenzvergleich der Immunsuppressiven (ISU-) Domänen von unterschiedlichen Retroviren	13
Abbildung 1.8: Sequenzhomologien zwischen den retroviralen ISU-Domänen und unterschiedlichen Interferonen	14
Abbildung 1.9: Darstellung der 25 am stärksten herunterregulierten Gene nach Inkubation von PBMCs mit dem HIV-1 ISU-Peptid.....	17
Abbildung 1.10: Aminosäuresequenzen für eine konservierte Region von retroviralen TM-Proteinen und von humanen TGF- β 1-, TGF- β 2- und TGF- β 3- Peptiden	18
Abbildung 3.1: Gradienten-PCR Analyse zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur	44
Abbildung 3.2: Untersuchungen zum Auftreten von Primerinterferenzen bei der Duplex real time RT-PCR	45
Abbildung 3.3: Standardkurve zur Ermittlung der TREM-2/GAPDH Primereffizienz für One-Step Duplex real time RT-PCR	46
Abbildung 3.4: Exemplarische Darstellung der Peptid-Homopolymere mittels SDS-PAGE und Western Blot..	47
Abbildung 3.5: Analyse der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach einer 24-stündigen Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren mittels ELISA	48
Abbildung 3.6: Analyse der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels ELISA	50
Abbildung 3.7: Kinetik der IL-10 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels real time RT-PCR	52
Abbildung 3.8: Kinetik der TREM-2 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels real time RT-PCR.....	54
Abbildung 3.9: Kinetik der CXCL-9 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels real time RT-PCR.....	55
Abbildung 3.10: Kinetik der FCN1 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 9 h mittels real time RT-PCR.....	56
Abbildung 3.11: Kinetik der IL-6 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels real time RT-PCR	58
Abbildung 3.12: Kinetik der TREM-1 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels real time RT-PCR.....	60
Abbildung 3.13: Kinetik der MMP-1 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels real time RT-PCR.....	61
Abbildung 3.14: PCR Analyse zum Nachweis der Provirusintegration von HIV-1 _{Ba-L} in das das Genom humaner PBMCs	63
Abbildung 3.15: Sensitivität und Effizienz der real time PCR zum Nachweis der HIV-1 Provirusintegration	64
Abbildung 3.16: Quantifizierung der Provirusintegration im Genom humaner PBMCs mittels real time PCR...	65

Abbildung 3.17: Analyse der IL-10 Expression bei HIV-1 infizierter PBMCs mittels real time RT-PCR.....	67
Abbildung 3.18: Analyse der IL-6 Expression bei HIV-1 infizierten PBMCs mittels real time RT-PCR.....	69
Abbildung 3.19: Analyse der CXCL-9 Expression bei HIV-1 infizierten PBMCs mittels real time RT-PCR.....	70
Abbildung 3.20: Analyse der FCN1 Expression bei HIV-1 infizierten PBMCs mittels real time RT-PCR.....	70
Abbildung 3.21: Analyse der TREM-1 Expression bei HIV-1 infizierten PBMCs mittels real time RT-PCR.....	72
Abbildung 3.22: Analyse der TREM-2 Expression bei HIV-1 infizierten PBMCs mittels real time RT-PCR.....	73
Abbildung 4.1: HIV-1 ISU- bzw. RAN-Aminosäuresequenz.....	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Sequenz und Herkunft der verwendeten Peptid-Polymere..... 24
Tabelle 2.2: Zusammensetzung der SDS-Gele..... 36
Tabelle 3.1: kinetische HIV-1 Infektionsversuche humaner PBMCs 62

Abkürzungsverzeichnis

ad	addieren auf ein Gesamtvolumen von
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
BS ³	Bissulfosuccinimidylsuberat
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCR	Chemokinrezeptoren für CC-Chemokine (Chemokingruppe mit zwei aufeinanderfolgenden Cysteinen)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CXCR	Chemokinrezeptoren für CXC-Chemokine (Chemokingruppe bei der zwei aufeinanderfolgende Cysteine durch eine Aminosäure getrennt sind)
d	<i>day</i>
ddH ₂ O	<i>double distilled water</i>
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid hydrochlorid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCN1	<i>collagen/fibrinogen domain-containing protein 1</i>
fwd	forward
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenfalls
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
h	Stunde(n)
hs	<i>homo sapiens</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HERV-K	Humanes endogenes Retrovirus K
HEX	Hexachlorofluorescein
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISU	immunsuppressiv
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	<i>long terminal repeats</i>
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization –Time-Of-Flight-Mass–Spectrometry</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MMP-1	Matrix Metalloprotease 1
MuLV	Murines Leukämievirus
Mv1Lu	Nerzlungenepithel-Zelllinie
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
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>
PERV	Porcines endogenes Retrovirus

PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Proteinkinase C
rev	reverse
rpm	<i>rotations / rounds per minute</i>
RPMI	<i>Rosswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse-Transkriptase
real time RT-PCR	Reverse-Transkriptase real time PCR
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
s	Sekunde(n)
sog.	sogenannt
SIV	simianes Immundefizienzvirus
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TM	Transmembranes Hüllprotein
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TREM-1	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells 1</i>
TREM-2	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
v/v	Volumenanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
w/v	Gewichtsanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
WB	Western Blot
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

In den vergangenen Jahrhunderten führten die bakteriellen Infektionen, wie Pest, Cholera oder Tuberkulose, zu großen Pandemien mit hoher Letalität. Aber auch Virusinfektionen, z.B. durch Pocken-, Influenza-, Masern-, oder Polioviren forderten viele Todesopfer. Die meisten bakteriellen Infektionen sind nach der Entdeckung der Antibiotika in gewissem Maße therapierbar geworden. Währenddessen haben die Virusinfektionen in den letzten Jahrzehnten einen immer größeren Stellenwert eingenommen, da sowohl die seit langem bekannten Virusinfektionen, z.B. durch Influenza- oder Hepatitisviren hervorgerufenen Erkrankungen, immer noch nicht besiegt sind, als auch immer neue Viren als Krankheitserreger auftreten. Zu den sog. *emerging viruses* gehören das humane Immundefizienzvirus (HIV), das SARS-Coronavirus und die Erreger des hämorrhagischen Fiebers, wie das Marburg- und das Ebolavirus und das Hantavirus. Vor allem sind seit dem Beginn der Epidemie vom erworbenen Immundefizienzsyndrom (AIDS, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) Anfang der Achtzigerjahre nach Schätzung der WHO (*World Health Organisation*) 25 Millionen Menschen an den Folgen einer HIV-Infektionen gestorben und weltweit leben im Jahr 2007 33 Millionen Menschen, die mit HIV infiziert sind. Allein im Jahr 2007 wurden 2,7 Millionen Menschen neu infiziert und 2 Millionen starben daran (AIDS epidemic 2007, UNAIDS/WHO).

Das durch HIV verursachte Krankheitsbild wurde im Jahr 1981 zuerst beschrieben (Gottlieb *et al.*, 1981) und wurde ab 1982 als Immunschwächekrankheit AIDS bezeichnet (Marx, 1982). Erst im Jahr 1983 konnte aus den AIDS-Patienten ein neuer Vertreter der humanen Retroviren isoliert werden (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Für diese Entdeckung erhielten Barre-Sinoussi und Luc Montagnier aus Frankreich im Jahr 2008 den Nobelpreis für Medizin. Die Entdeckung des Virus wurde in der nachfolgenden Zeit von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Gallo *et al.*, 1984; Popovic *et al.*, 1984) und das Virus wurde als Auslöser von AIDS beschrieben (Broder und Gallo, 1984; Gallo *et al.*, 1984). Das isolierte Virus wurde als HIV-1 bezeichnet. Später konnte ein weiterer Typ, welcher die Bezeichnung HIV-2 erhielt, aus einem westafrikanischen AIDS-Patienten isoliert werden (Clavel *et al.*, 1986). Die beiden Virustypen unterscheiden sich bis 50 % auf Proteinebene. Sie rufen beide beim Menschen eine Immunschwäche hervor, allerdings ist HIV-2 durch einen langsameren Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Aufgrund seiner geringeren Pathogenität waren die HIV-2 Infektionen ursprünglich vor allem auf Westafrika beschränkt, währenddessen sich HIV-1 Infektionen zu einer Pandemie entwickelt haben (Van Heuverswyn und Peeters, 2007). Seit dem Auftreten

des HI-Virus als AIDS-Erreger ist dieses Virus intensiv untersucht und der Verlauf der Infektion klinisch gut charakterisiert worden. Obwohl AIDS durch eine generalisierte Immundefizienz, die zu opportunistischen Infektionen führt, charakterisiert ist, ist noch unbekannt, welcher Mechanismus diese Immundefizienz hervorruft. Das Virus infiziert CD4⁺-Zellen (CD = *cluster of differentiation*) und während der Progression zu AIDS nimmt die Zahl der CD4⁺-Zellen kontinuierlich ab. Die Struktur der Lymphknoten und anderer lymphoiden Gewebe wird zerstört und es kommt zu Veränderungen in der Sekretierung verschiedener Zytokine. Besonders korreliert die Progression mit der Virusbelastung (Fauci *et al.*, 1993), u.a. was für eine aktive Immunsuppression durch das HIV bzw. durch ein virales Protein spricht. Das transmembrane Hüllprotein gp41 sowie ein synthetisches Peptid (genannt immunsuppressives (ISU-) Peptid), welches aus einer hochkonservierten Domäne von gp41 entspricht, zeigten in *in vitro* Versuchen eindeutig immunsuppressive Eigenschaften (Ruegg *et al.*, 1990b und 1991; Denner *et al.*, 1994, 1996 und 2000). Die Aufklärung dieses Pathogenesemehanismuses des HI-Virus kann wesentlich zur Entwicklung neuer Therapien und Präventionen beitragen.

1.1 Retroviren

Retroviren (Familie Retroviridae) sind bei allen Vertebraten zu finden. Sie verfügen über ein einzelsträngiges RNA-Genom und dieses RNA-Genom wird in einer Wirtszelle mit Hilfe des Enzym Reverse-Transkriptase (RT) in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben.

1.1.1 Einteilung der Retroviren

Die Familie der Retroviridae ist in sieben Genera (α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren, Lentiviren und Spumaviren) eingeteilt. Diese Unterteilung erfolgte anhand der Besonderheiten während der Infektionen und den durch sie verursachten Erkrankungsformen sowie anhand morphologischer und genetischer Unterschiede der Viren. HIV wird den Lentiviren zugerechnet. Retroviren sind meist wirtsspezifisch und ihre Infektionen rufen viele verschiedene Symptome hervor, wie z.B. Tumorerkrankungen, Immundefizienzen, neurologische Defekte bis hin zu offensichtlich harmlosen Infektionsverläufen.

Weiterhin kann man zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterscheiden. Exogene Retroviren besitzen alle notwendigen genetischen Informationen für den Ablauf eines

Infektionszyklus mit Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln und können horizontal von Organismus zu Organismus übertragen werden. Im Unterschied dazu sind endogene Retroviren, wie z.B. das humane endogene Retrovirus K (HERV-K), das porcine endogene Retrovirus (PERV) und das Koala-Retrovirus (KoRV), in allen Zellen eines Organismus im Genom integriert. Somit können sie vertikal über die Keimbahn an die Nachkommen weitergegeben werden. Auch endogene Retroviren können horizontal übertragen werden. Im menschlichen Genom findet man ebenfalls endogene Retroviren (humane endogene Retroviren = HERVs), sie betragen etwa acht Prozent des Gesamtgenom (Mallet und Prudhomme, 2004). Viele endogene Retroviren sind aber so weit genetisch deletiert, dass sie nicht mehr aktiviert sind und Partikel bilden können. Jedoch können einige wie z.B. PERV unter bestimmten Umständen zur Produktion von exogenen infektiösen Partikeln aktiviert werden (Tacke *et al.*, 2000 und 2003; Denner *et al.*, 2003).

1.1.2 Morphologie der Retroviren

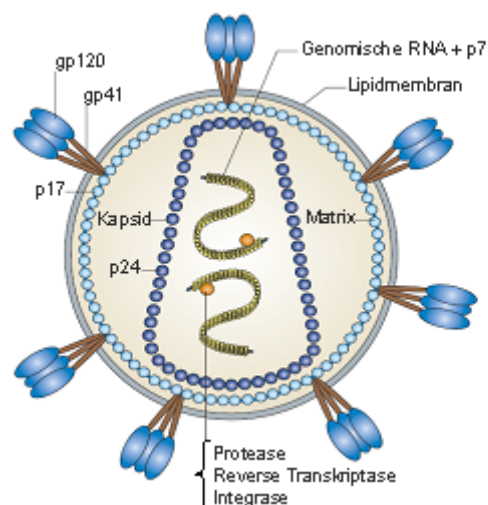


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Retroviruspartikels am Beispiel des HIV-1 (Karlsson *et al.*, 2008)

Die infektiösen Partikel der Retroviren haben einen ähnlichen Aufbau mit einem Durchmesser von 80 - 120 nm (Abbildung 1.1). Sie sind von einer äußeren Lipiddoppelmembran umhüllt, die von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abstammt. In der Virusmembran sind die viralen Glykoproteine als Heterotrimere, sog. Spikes, verankert, die mit den Rezeptoren und Korezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen interagieren und die Infektion initiieren. Das transmembrane Hüllprotein gp41 (TM) und das

Oberflächenhüllprotein gp120 (*surface glycoprotein*, SU) sind durch eine nicht-kovalente Bindung verbunden und der zytoplasmatische Schwanz von gp41 interagiert mit dem Matrixprotein, p17. Das Kapsidprotein p24 bildet das Viruskapsid, das bei den Lentiviren charakteristisch konisch geformt ist (Gelderblom *et al.*, 1987 und 1991). Im Kapsid liegt das virale Genom in Form von einzelsträngiger RNA vor, welche mit Nukleokapsidproteinen p7 komplexiert ist. Als weitere virale Komponenten befinden sich im Viruspartikel die Enzyme Reverse-Transkriptase (RT; p51/66 Heterodimer), Integrase (IN; p32) und Protease (PR; p10), die essentiell für den Replikationszyklus der Viren sind.

1.1.3 Genomstruktur der Retroviren

Das Genom der Retroviren liegt als zwei identisch ungespleißte einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 9 - 12 Kilobasen (kb) vor. Die RNA weist eine negative Polarität und mit der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf (Abbildung 1.2).

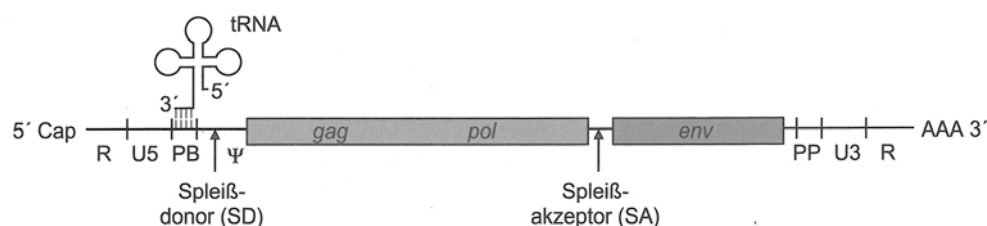


Abbildung 1.2: Darstellung des RNA-Genoms der infektiösen Retroviren (Modrow *et al.*, 2003)

U3 und U5: einzigartige (*unique*) Regionen; R: wiederholte (*redundant*) Regionen; PB (*Primer binding*): Bindungsstelle für tRNA; ψ : Verpackungssignal für die virale genomische RNA; PP: Polypurintrakt; SD/SA: Lage der Spleißstellen für die Synthese jener mRNAs, von denen die Env-Proteine translatiert werden.

Im Verlauf der Infektion wird die RNA durch die virale Reverse-Transkriptase in einen DNA-Doppelstrang umgeschrieben und durch die Integrase in das Genom der Wirtszelle eingebaut. Die integrierte virale DNA wird als Provirus bezeichnet (Abbildung 1.3). Während der Umschreibung werden an den beiden Enden des proviralen Genoms identische Sequenzfolgen generiert, die man als „long terminal repeats“ (LTR) bezeichnet. Das LTR ist für die Integration und Transkription des Provirus von Bedeutung und enthält unter anderem Promotor- und Enhancer-Sequenzen.

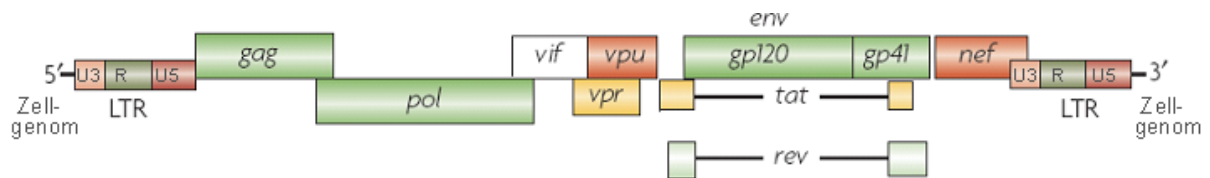


Abbildung 1.3: Darstellung des integrierten Provirus-DNA am Beispiel des HIV-1 (Ellis *et al.*, 2007)

Provirus des HIV-1 umfasst ca. 9,8 kb und kodiert mindestens neun Proteine. Dazu gehören strukturelle Proteine (Gag, Pol und Env), regulatorische (Tat: *transactivator of transcription*; Rev: *regulatory for expression of viral proteins*) und akzessorische (Vpu: *viral protein u*; Vpr: *viral protein r*; Vif: *viral infectivity factor*; Nef: *negative factor*).

Alle Retroviren weisen charakteristisch in ihrem Genom in mindestens drei Regionen auf, die für virale Proteine kodieren. Das Gen für das gruppenspezifische Antigen (*gag*) kodiert für das Kapsidprotein, das Matrixprotein und das Nukleokapsidprotein. Die Protease und die Reverse-Transkriptase werden durch das *pol*-Gen, das Oberflächenhüllprotein sowie das transmembrane Hüllprotein durch das *env*-Gen kodiert. Während einfache Retroviren wie γ -Retroviren im Wesentlichen nur drei strukturelle Gene verfügen, sind Lentiviren, z.B. HIV-1, komplexer aufgebaut (Coffin *et al.*, 1992). HIV-1 kodiert zusätzlich für regulatorische Proteine (Tat und Rev) und akzessorische Proteine (Vpu, Vpr, Vif und Nef). Sie sind Spleißvarianten der charakteristischen Genprodukte und an der Virusreplikation bzw. Immunpathogenese der Viren beteiligt.

1.1.4 Replikations- und Infektionszyklus der Retroviren

Die Replikation der HI-Viren ist sehr gut untersucht (Abbildung 1.4) und ist sowohl abhängig vom Wirtszelltyp als auch vom Proliferationsstadium der Wirtszelle (Stevenson, 2003). Im Gegensatz zu anderen Retroviren kann HIV-1 nicht nur proliferierende, sondern auch ruhende $CD4^+$ -Zellen des peripheren Blutes oder des lymphatischen Systems wie z.B. T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten infizieren.

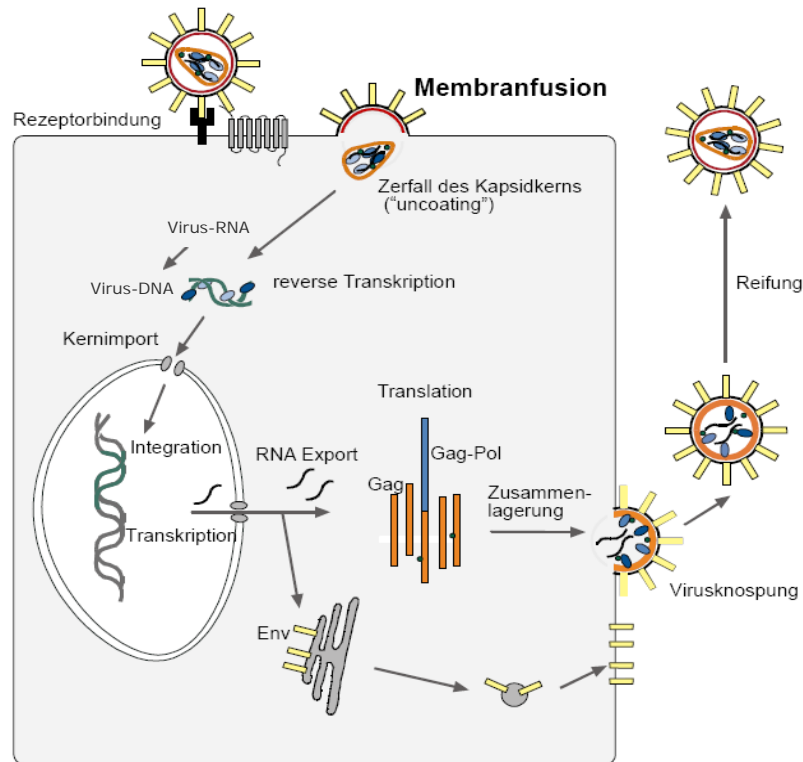


Abbildung 1.4: Replikationszyklus von HIV-1 (Daecke, 2002)

Die Infektion beginnt mit der Bindung des Oberflächenproteins (gp120) des HIV-1 an den CD4-Rezeptor (Dalglish *et al.*, 1984, Klatzmann *et al.*, 1984). Das CD4-Molekül (58 kDa) ist ein Mitglied der *Immunglobulinsuperfamilie*. Sein natürlicher Ligand während der zellulären Immunantwort ist eine konstante Region innerhalb der MHC-Klasse-II-Moleküle. Um den Membranfusionsprozess zu initiieren, nutzt HIV-1 zusätzlich die Chemokinrezeptoren CXCR4 oder CCR5 als Korezeptor, die an die variablen Regionen von gp120 binden. Diese Bindung induziert Konformationsänderungen im trimären gp120/gp41-Komplex, wodurch es zur Exposition eines stark hydrophoben, aminoterminalen Ende von gp41 kommt. Dieses ca. 25 Aminosäuren lange Fusionspeptid kann während der Infektion in die Zytoplasmamembran eindringen und so die Verschmelzung mit der viralen Hüllmembran vermitteln (Dragic *et al.*, 1996). Es wurden jedoch allerdings Individuen charakterisiert, die eine 32-Basenpaardeletion im CCR5-Gen aufweisen. Diese Deletion führt zu einer Leserastermutation, aus der ein deletiertes Protein (CCR5 Δ 32) resultiert. Während sich heterozygote Mutanten nur schwer infizieren lassen, sind homozygote sogar weitgehend resistent gegen eine Infektion mit HIV-1 (Liu *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996). Nach der Aufnahme des Viruskapsids in das Zytosol werden die virale RNA und die Enzyme aus dem Kapsid in das Zytosol freigesetzt, wobei die partikuläre Struktur des Kapsids erhalten bleibt. Diesen Prozess bezeichnet man als „uncoating“. Durch die *error-prone*

(fehleranfällige) virale Reverse-Transkriptase wird das diploide RNA-Genom in doppelsträngige DNA, welche zu beiden Seiten von LTRs flankiert wird, umgeschrieben. Dabei können Rekombinationen sowie ein fehlerhafter Einbau von Nukleotiden auftreten – Vorgänge, die zur hohen genetischen Varianz von HIV beitragen (Preston *et al.*, 1988). Die provirale DNA wird nun im Komplex mit der Kapsid-Komponente (p17) und dem akzessorischen Protein Vpr in den Zellkern transportiert und durch die Wirkung der viralen Integrase kovalent in das Wirtsgenom integriert (Allan *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 1987; Bushman *et al.*, 1990). Durch die Integration der viralen Erbinformation können zelluläre Gene zerstört oder unter der Kontrolle des viralen 3’LTR-Promotors aktiviert werden. Dadurch können in Wirtszellen Tumore induziert werden (Robinson, 1985; Sourvinos *et al.*, 2000). Die Integration findet vorzugsweise in transkriptionsaktiven Regionen der Wirts-DNA statt, da nur dort die Stränge der sonst kondensierten Struktur des humanen Genoms zugänglich ist (Schröder *et al.*, 2002). Weiter wurde die Beteiligung von nukleosomalen Strukturen und DNA-Bindungsproteinen an der Integration beschrieben (Pryciak und Varmus, 1992; Pruss *et al.*, 1994; Lewinski *et al.*, 2006). Das Provirus kann nun entweder abhängig vom Aktivierungszustand der infizierten Zelle transkribiert werden oder latent vorliegen (Stevenson *et al.*, 1990).

Im Verlauf der Aktivierung einer infizierten Zelle erfolgt die Bindung zellulärer Faktoren an die U3-Region des LTR, welche die Transkription der viralen Gene durch die zelluläre RNA-Polymerase II ermöglichen. Beim HIV-1 ist NFκB (*nuclear factor B*) ein hierfür wichtiges Protein, welches nach Stimulierung der infizierten Zellen durch das Immunsystem in seine aktive Form überführt wird und sich mit Sp1 an die regulatorischen Elemente des LTR bindet. Anfangs werden überwiegend regulatorische Proteine Tat, Rev und Nef exprimiert. Während Rev essentiell für den Transport viraler mRNAs ist, stabilisiert Tat die Transkriptionselongation viraler Gene.

Die Akkumulation des Tat- und Rev-Proteins erfolgt in der frühen Phase der Infektionszyklus. Danach werden Env-Vorläuferproteine (gp160) und akzessorische Proteine Vif, Vpu und Vpr translatiert. Der Precursor gp160 wird am endoplasmatischen Retikulum gebildet und die Spaltung in gp120 und gp41 wird durch eine zelluläre Protease hervorgerufen, die Glykosylierung erfolgt posttranskriptionell (McCune *et al.*, 1988).

Die *full-length* RNA dient entweder als genomische RNA für die neuen Viruspartikel oder als mRNAs für Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine. Die viralen Proteine und das Virusgenom lagern sich an der Zytoplasmamembran an, wo die unreifen Partikel von der Zelloberfläche knospen. In der Folge kommt der Reifungsprozess, der die Spaltung der Gag/Pol-

Vorläuferproteine durch die virale Protease in die einzelnen Proteine p17, p24, p7 sowie RT und IN bezeichnet (Wieggers *et al.*, 1998) (siehe 1.1.2). Erst nach diesem Prozess entstehen infektiöse Viruspartikel durch *self-assembly* (Kaplan *et al.*, 1994; Coffin *et al.*, 1997; Frankel und Young, 1998).

1.1.5 Virusproteine des HIV-1

1.1.5.1 Gruppenspezifische Antigene (Gag-Proteine)

Zum Komplex der gruppenspezifischen Antigene des HIV gehören Matrix-, Kapsid-, Nukleokapsid- und Linkerproteine (p6, p2 und p1). Alle Gag-Proteine werden als ein gemeinsames Vorläuferprotein (55 kDa) translatiert und im Verlauf der Virusmorphogenese in die einzelnen Komponenten gespalten (Henderson *et al.*, 1992; Wieggers *et al.*, 1998; Huseby *et al.*, 2005). Das Matrixprotein (MA) interagiert mit der Plasmamembran über den myristylierten Aminoterminus (Nermut *et al.*, 1994) und ermöglicht damit die Bildung infektiöser Virionen (Bryant und Ratner, 1990). Es fördert auch den Transport der viralen DNA in den Zellkern (Valentin *et al.*, 1990; von Schwedler *et al.*, 1994). Die Kapsidproteine bilden im Partikelinneren ein konisches Viruskapsid, in die das RNA-Genom und die viralen Enzyme verpackt sind. Das basische Nukleokapsidprotein umhüllt die virale RNA, wobei sie über zwei Zinkfinger motive an ψ (*psi = packaging site*)-Regionen der RNA binden (Sakaguchi *et al.*, 1993; Berkowitz und Goff, 1994). P6 ist verantwortlich für das Ablösen der frisch gebildeten Viruspartikel von der Zelloberfläche (South *et al.*, 1990; Bess *et al.*, 1992). Die Funktionen von p1 und p2 sind nicht bekannt.

1.1.5.2 Virale Enzyme (*pol*-Genprodukte)

Das *pol*-Gen kodiert für die viralen Enzyme Protease, Reverse-Transkriptase und Integrase (Craven *et al.*, 1991; Katz und Skalka, 1994). Es wird als Fusionsprotein mit dem Gag-Protein (Gag/Pol-Vorläuferprotein, p160) translatiert. Voraussetzung dafür ist die Leserlasterverschiebung um -1 in einer uridinreichen Region der mRNA während der Translation (Reil *et al.*, 1993). Dadurch wird das *gag*-Stoppcodon überlesen und die Pol-Domänen werden angefügt. Dies findet bei etwa 5 % der Translationsvorgänge statt. Die Gag/Pol-Polyproteine werden am Aminoterminus myristyliert und sind über diese Modifikation mit der Plasmamembran assoziiert. Die Spaltung in die enzymatisch aktiven Einzelkomponenten erfolgt erst während der Maturation im bereits freigesetzten Partikel autokatalytisch durch die

virale Protease (Wan *et al.*, 1996). Die Protease gehört zu den Aspartatproteasen (Toh *et al.*, 1985) und liegt im aktiven Zustand als Homodimer vor (Lapatto *et al.*, 1989). Die Reverse-Transkriptase kann als RNA- oder DNA-abhängige DNA-Polymerase wirken und hat zusätzlich die Aktivität der RNase H. Sie katalysiert die Umschreibung der viralen RNA in provirale DNA und baut den RNA-Anteil des gebildeten RNA/DNA-Hybrid ab. Im Vergleich zur zellulären DNA-Polymerase besitzt die RT keine Korrekturlese-Funktion und hat daher eine hohe Fehlerrate. Sie liegt bei einem Fehler auf 10^3 bis 10^4 Basen, während zelluläre DNA-Polymerase eine Fehlsynthese mit dem Faktor 10^{-7} bis 10^{-9} begehen (Preston *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988). Die hohe Sequenzvariabilität des Virus begünstigt bei einem Selektionsdruck, wie z.B. der immunologischen Abwehr des Wirtsorganismus, die Ausbildung von Fluchtmutanten. Die RT von HIV-1 ist ein Heterodimer (Le Grice *et al.*, 1991). Die große Untereinheit p66 enthält die Polymerase-Aktivität (Le Grice *et al.*, 1991; Hostomsky *et al.*, 1992) und die kleine, p51, hat eine strukturelle Rolle innerhalb des p51/p66-Heterodimers. Die Integrase wirkt sowohl als Endonuklease als auch als Ligase. Sie schneidet je zwei Basen an den beiden 3-Enden in den LTRs der doppelsträngigen proviralen DNA und katalysiert unter Benutzung dieser Enden eine kovalente Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom.

1.1.5.3 Virale Hüllproteine (*env*-Genprodukte)

Das *env*-Gen kodiert für das transmembrane Hüllprotein (TM, gp41) und das Oberflächenhüllprotein (SU, gp120), die auf der Oberfläche intakter Partikel trimere Komplexe (Spikes) ausbilden. Diese Komplexe interagieren mit den Rezeptoren und Korezeptoren auf der Zelloberfläche und initiieren so die Infektion der Zielzelle. Die viralen Hüllproteine werden als ein Vorläuferprotein (gp160) von einer einfach gespleißten, bicistronischen mRNA, die neben dem Env-Protein auch für das Vpu-Protein kodiert, am rauen endoplasmatischen Retikulum translatiert und glykosyliert (Pinter *et al.*, 1989). Der Precursor wird in den Golgi-Apparat transportiert und dort von einer zellulären Furinprotease in gp120 und gp41 geschnitten (Coffin *et al.*, 1997), wobei die beiden Untereinheiten nicht-kovalent gebunden bleiben (Chan *et al.*, 1997). Obwohl das ungespaltene Env-Protein gp160 CD4-Rezeptoren binden kann, ist die Spaltung notwendig, um das Fusionspotential des Proteins zu aktivieren, das für den Eintritt des Virus in die Zelle essentiell ist (Brody *et al.*, 1994).

Das Oberflächenhüllprotein gp120 enthält die Bindungsstelle für den CD4-Rezeptor und den Korezeptor (Lasky *et al.*, 1987). Es weist einen sehr hohen Glykosylierungsgrad und eine

hohe Sequenzvariabilität auf. Über 50 % des Molekulargewichts des Proteins besteht aus Kohlenhydraten (Leonard *et al.*, 1990). Die Glykosylierungen finden vorwiegend auf der äußeren Domäne statt (Kwong *et al.*, 1998). Dadurch kann die Induktion neutralisierender Antikörper gegen Peptidepitope des maskierten gp120, die „immunstille Seite“ genannt wird, verhindert werden (Parren *et al.*, 1999). Das gp120 ist in eine äußere und eine innere Domäne gefaltet. In der äußeren Domäne befinden sich fünf variable (V1 bis V5) und fünf konstante (C1 bis C5) Bereiche (Arthos *et al.*, 1989). Die V3-Domäne stellt die CD4-Rezeptorbindungsstelle dar. Die V-Regionen weisen sich als oberflächenexponierte, hoch immunogene Bereiche aus, so dass sie dem Selektionsdruck neutralisierender Antikörper ausgesetzt sind. Der Selektionsdruck führt mit der hohen Fehlerrate der RT zur Bildung neuer HIV-Varianten, die der neutralisierenden Wirkung der Immunglobuline entgehen. Unter anderem werden hauptsächlich neutralisierende Antikörper gefunden, welche an die V3-Region binden (Hwang *et al.*, 1991; Evans und Desrosiers, 2001). Sie kann auch über ihre Aminosäuresequenz definieren, welcher Korezeptor (CCR5 oder CXCR4) zur Auslösung des Fusionspotentials benutzt wird und somit welche Zellen infiziert werden können (Hartley *et al.*, 2005).

Das transmembrane Hüllprotein gp41 ist über eine hydrophobe Sequenz in der Membran verankert und vermittelt die Fusion der Virus- mit der Wirtszellmembran. Im Gegensatz zu gp120 ist gp41 schwach glykosyliert und hoch konserviert (Benit *et al.*, 2001). Das gp41 kann in drei Domänen unterteilt werden: die C-terminale extravirale Ektodomäne, die N-terminale intravirale Endodomäne und die zwischen diesen beiden liegende, stark hydrophobe transmembrane Domäne. Die Ektodomäne untergliedert sich dabei in das Fusionspeptid (FP), die N-terminale Helixregion (NHR) mit immunsuppressiver (ISU-) Domäne (Ruegg *et al.*, 1989; Denner *et al.*, 1994), den Cystein-Loop, die C-terminale Helixregion (CHR) und den kurzen membranproximalen externen Bereich (Abbildung 1.5). Das hydrophobe, glycinreiche FP ermöglicht während der Infektion eine Verbindung zwischen Virus- und Wirtszellmembran, indem es in die Lipidmembran der Zelle eindringt (Freed *et al.*, 1990; Pereira *et al.*, 1997). In der Endodomäne befinden sich zwei amphiphatische Domänen, LPP (*lentivirus lytic peptides*) -1 und -2. Sie weisen eine hohe Affinität zu Calmodulin auf (Miller *et al.*, 1993) und spielen eine wichtige Rolle während des Virus-Assembly und -Eintrittes (Dubay *et al.*, 1992), wobei sie an der Membranassoziation und der Multimerisation des gp41 teilnehmen (Lee *et al.*, 2000).

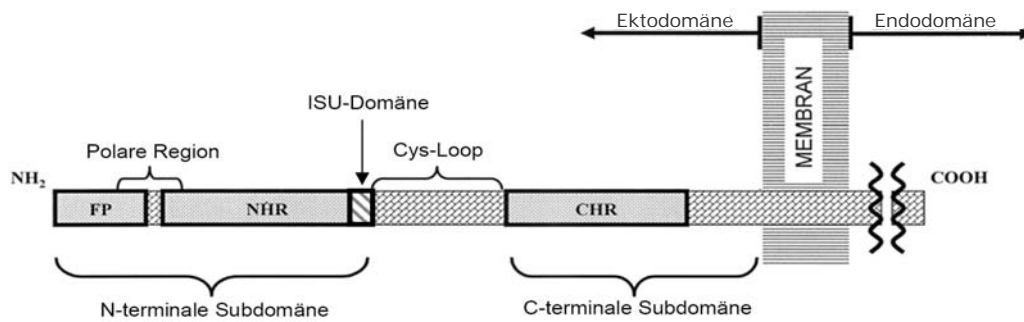


Abbildung 1.5: Schematische primäre Struktur des TM-Proteins gp41 von HIV-1 (Shnaper *et al.*, 2004)

FP: Fusionspeptid; NHR: N-terminale Helixregion; ISU: Immunsuppressive Domäne; CHR: C-terminale Helixregion.

Die viralen Hüllproteine vermitteln die Membranfusion während der HIV-Infektion (Abbildung 1.6). Die Bindung der C3-Region von gp120 an den CD4-Rezeptor initiiert eine sequentielle Konformationsänderung in trimerem gp120 (Salzwedel und Beger, 2000). Dadurch wird die V3-Region, welche die weitere Bindung an einem Korezeptor wie z.B. CXCR4 bzw. CCR5 ermöglicht, exponiert (Kwong *et al.*, 1998). Diese Bindungen des gp120 an den Rezeptoren führen zur Destabilisierung der nicht-kovalenten Bindung zwischen gp120 und gp41. Dabei wird das gp120 aus dem Komplex gelöst und das gp41 freigelegt. Nun kann das hydrophobe Fusionspeptid des gp41 in die *cis*-Monolayer der Zielzellmembran inserieren. Die dadurch entstandene Prähairpin-Struktur wird aber langsam durch die hydrophoben Wechselwirkungen der NHR und CHR zur thermodynamisch günstigen *six-helix-bundle*-Struktur umgelagert. Am Ende der Fusion liegen das Fusionspeptid und das transmembrane Segment des gp41 parallel innerhalb derselben Membran miteinander fusioniert vor und öffnen so die Fusionspore zur Aufnahme des Kapsids. Raviv *et al.* konnten mit Fusionshemmern zeigen, dass der gesamte Fusionsvorgang von simianem Immundefizienzvirus (SIV) gp36 bei 37 °C 19 min dauert (Raviv *et al.*, 2002).

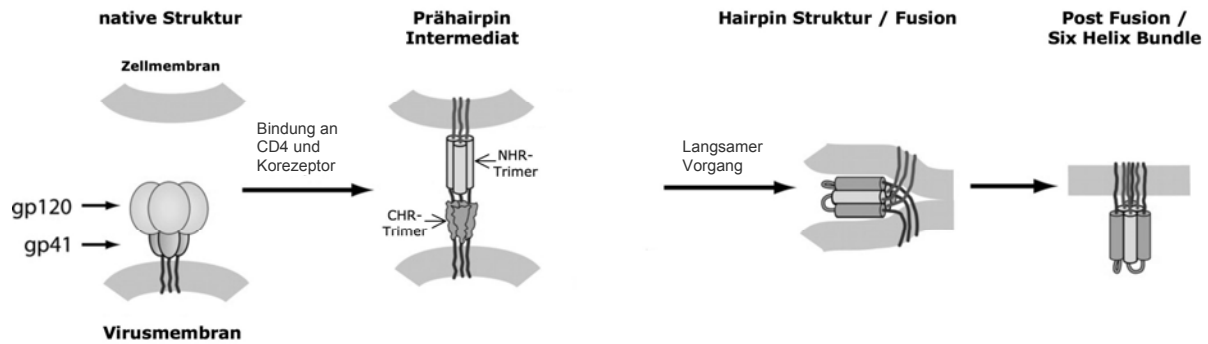


Abbildung 1.6: Modell der HIV-Hüllprotein-vermittelten Fusionsreaktion während der Infektion (Chan und Kim, 1998)

1.2 Retrovirale Immunsuppression

1.2.1 Immunsuppressive Domäne der Retroviren

Ratner *et al.* zeigten erstmals, dass TM-Proteine von unterschiedlichen Retroviren zum Teil hochkonservierte Domänen enthalten (Ratner *et al.*, 1985). Ähnliche Homologien wurden auch bei Filoviren wie dem Ebola- oder dem Marburg-Virus beschrieben. Durch weitere Struktur- und Sequenzvergleiche der TM-Proteine von Retroviren wurde ein Bereich in der Ektodomäne, welcher sich zwischen dem Cystein-Loop und NHR befindet, als besonders hochkonserviert definiert. Im Jahr 1985 konnte Cianciolo *et al.* eine 17 Aminosäure lange Sequenz, genannt CKS-17, in der Ektodomäne des p15E von γ -Retroviren, wie z.B. murinem Leukämievirus (MuLV) und feline Leukämievirus (FeLV) identifizieren und synthetisch herstellen (Cianciolo *et al.*, 1985). Das CKS-17 konnte, gebunden an BSA (bovines Serumalbumin), *in vitro* die Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten inhibieren. Aufgrund dieser immunsuppressiven Effekte des CKS-17 sowie dessen Homologie zu den anderen retroviralen TM-Proteinen wurden diese Peptide als immunsuppressive (ISU-) Peptide bezeichnet und die dementsprechenden Domänen des TM-Proteins als ISU-Domäne (Ruegg *et al.*, 1989; Denner *et al.*, 1994 und 1996) (Abbildung 1.7). Weitere Homologien, allerdings mit Abweichungen, konnten im Latenzmembranprotein des Epstein-Barr-Virus (EBV), für das ebenfalls eine immunsuppressive Wirkung beschrieben wurde, gefunden werden (Dukers *et al.*, 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 unterschiedlichen Retroviren

Fett gedruckt sind von der CKS-17-Sequenz abweichende Aminosäuren. PERV: porzines endogenes Retrovirus; KoRV: Koala-Retrovirus; MuLV: murines Leukämievirus; FeLV: felines Leukämievirus; HTLV-1: humanes T-Zell-Leukämievirus; HIV: humanes Immundefizienzvirus; EBV-LMP: Latenzmembranprotein des Epstein-Barr-Virus.

Das synthetische Peptid CKS-17 induziert verschiedene immunsuppressive Effekte *in vitro*. Es wirkt inhibierend auf die *respiratory burst* von humanen Monozyten (Harrell *et al.*, 1986), auf die Interleukin (IL) -1 Aktivität (Kleinerman *et al.*, 1987), auf die Produktion von Interferon (INF) - γ (Ogasawara *et al.*, 1990), auf die Immunglobulin-Sekretion (Mitani *et al.*, 1987) und auf die durch natürliche Killerzellen vermittelte Zytotoxizität (Harris *et al.*, 1987). Außerdem beeinflusst es die T_H1/T_H2 -Zytokinantwort und führt zur Modulation der Zytokinexpression (Haraguchi *et al.*, 1995a). Jedoch ist das Peptid nur dann biologisch aktiv, wenn es mit einem Trägerprotein, wie z.B. BSA, gekoppelt ist (Denner *et al.*, 1994). Mögliche Erklärungen dafür wären, dass die Peptide durch die Kopplung eine biologisch aktive Konformation erhalten könnten oder einfach eine Multiplizität für die Interaktion mit Zielmolekülen erforderlich sein könnte.

Die retroviralen ISU-Domänen zeigen weitere Homologien zu den Klasse-I-Interferonen (Denner, 1998; Chen *et al.*, 1999) (Abbildung 1.8). Zu den humanen Klasse-I-Interferonen gehören 14 IFN- α -, ein IFN- β - und ein IFN- ω -Molekül(e). Alle Klasse-I-Interferone benutzen denselben Rezeptor, nämlich IFN- α R1 und INF- α R2 (Uze *et al.*, 1994) und besitzen sowohl antiproliferative als auch antivirale und immunmodulatorische Eigenschaft. INF- α selbst sowie ein Peptid, welches mit einer helikalen Domäne von INF- α korrespondiert, üben ebenfalls proliferationshemmende und immunsuppressive Effekte aus (Ruegg und Strand, 1990b). Des Weiteren waren gegen das ISU-Peptid gerichtete Antikörper auch in der Lage, mit INF- α kreuzzureagieren (Chen *et al.*, 1999; Denner *et al.*, 2000). Daher besteht die Möglichkeit, dass sich die ISU-Domäne über den Interferon-Rezeptor ähnlich wie ein Interferon verhalten könnte (Denner *et al.*, 1998). Für INF- α selbst wurde eine Hemmung der

HIV-1 Replikation *in vitro* gezeigt (Poli *et al.*, 1994). Zusätzlich besitzt die ISU-Domäne eine limitierte Sequenzhomologie zu TGF- β , dies wird in Kapitel 1.3 näher erläutert.

HIV-1	L	Q	A	R	I	L	A	V	E	R	Y	L	K	D	Q	Q	L
FeLV, MuLV, PERV-A	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
human alpha-7 IFN	L	R	N	R	R	A	L	I	L	L		A	Q	M	G	R	I
murine alpha-1 IFN	L	R	N	K	R	A	L	T	L	L		V	Q	M	R	R	L
human alpha-1 IFN (9-24)	L	D	N	R	R	T	L	M	L	L		A	Q	M	S	R	I
human alpha-C IFN	L	G	N	R	R	A	L	I	L	L		G	Q	M	G	R	I
human alpha-2 IFN	L	G	S	R	R	T	L	M	L	L		V	Q	M	R	K	I
bovine alpha-2 IFN	L	V	G	R	Q	N	L	R	L	L		G	Q	M	R	R	L
porcine alpha-1 IFN	L	A	H	T	R	A	L	R	L	L		A	Q	M	R	R	I
human omega-1 IFN	L	L	S	R	Q	T	L	V	L	L		H	Q	M	R	R	I
ovine TP-1	L	D	A	R	E	N	L	K	L	L	D	R	M	N	R	L	X
ovine/bovine TP-1	L	Q	D	R	K	D	F	G	L	P	Q	E	M	V	E	G	D
ovine TP-1	L	K	D	R	R	D	F	R	F	P	Q	E	M	V	K	G	S
human beta-1 IFN	L	N	G	R	L	E	Y	C	L	K	D	R	M	N	F	D	I
HIV-1	L	Q	A	R	I	L	A	V	E	R	Y	L	K	D	Q	Q	L
human alpha-1 IFN (113-129)	N	A	D	S	I	L	A	V	K	K	Y	F	R	R	I	T	L

Abbildung 1.8: Sequenzhomologien zwischen den retroviralen ISU-Domänen und unterschiedlichen Interferonen (Denner *et al.*, 1998)

Umrundete und grau schattierte Aminosäuren sind identisch mit denen der ISU-Domäne vom felines Leukämievirus (FeLV). Konservative Aminosäureaustausche sind nur umrandet (R = K, L = I = V, F = Y). MuLv: murines Leukämievirus; PERV: porzines endogenes Retrovirus; TP : Tropoblastprotein.

Im TM-Protein gp41 von HIV-1 wurde trotz geringer Sequenzhomologie zur CKS-17 ebenfalls eine immunsuppressiv aktive Domäne beschrieben (Ruegg *et al.*, 1991; Denner *et al.*, 1994 und 1996). Die ISU-Domäne von HIV-1 erstreckt sich von AS 583 - 599 (Denner *et al.*, 1994; GeneBank Accession No. K03455). Das davon abgeleitete ISU-Peptid inhibiert die Mitogen-stimulierte Proliferation von humanen T- und B-Lymphozyten (Denner *et al.*, 1996). Darüber hinaus konnte das ISU-Peptid des HIV-1 die Proliferation von Maus-Lymphozyten, ebenfalls Mitogen-stimuliert, hemmen, wodurch auf eine interspezies-reaktive Eigenschaft der ISU-Peptide hingewiesen wird. Der zytopathogene Effekt von HIV-1 auf eine humane T-Zelllinie, MT4-Zellen, wurde auch durch das ISU-Peptid gehemmt (Denner *et al.*, 1994). Das HIV-1 ISU-Peptid ist ebenfalls in der Lage, die T_{H1}/T_{H2} -Zytokinantwort zu modulieren (Denner *et al.*, 1998). Außerdem wurde ein inhibitorischer Effekt des Peptids auf die Proteinkinase C (PKC) und cAMP nachgewiesen (Gottlieb *et al.*, 1990; Ruegg *et al.*, 1990; Ruegg und Strand, 1990a und 1991; Kadota *et al.*, 1991; Haraguchi *et al.*, 1995a und 1995b). Der N-terminale Leuzin-Zipper von gp41 (dp107), in dem sich ISU-Domäne befindet, interagiert während der Infektion mit CHR (dp178), wodurch Membranfusion und Internalisierung des Virus ermöglicht werden (Wild *et al.*, 1992 und 1995; Chan und Kim 1998). Die dem dp107 und dem dp178 entsprechenden synthetischen Peptide konnten diese

Interaktion verhindern und somit den Eintritt des Virus in die Zielzelle inhibieren (Wild *et al.*, 1992 und 1995; Chan und Kim, 1998). Das mit Trägerprotein gekoppelte ISU-Peptid konnte auch das Eindringen von Viruspartikel inhibieren (Henderson und Qureshi, 1993; Denner *et al.*, 1994).

1.2.2 Modulation der Zytokinproduktion durch das HIV-1 TM-Protein und ISU-Peptid

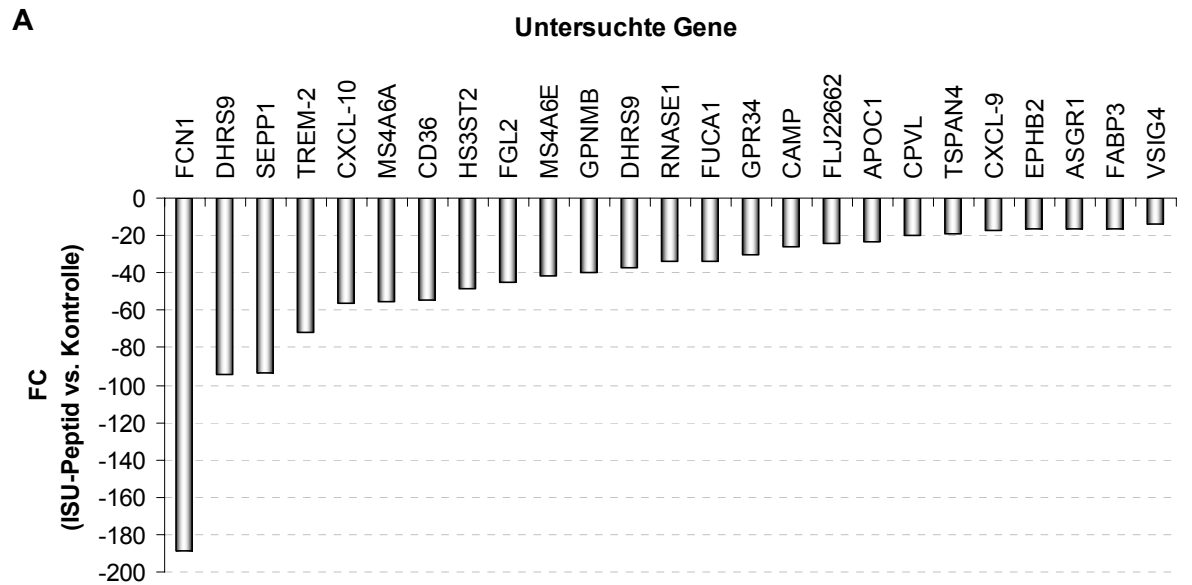
Viele Daten zeigen, dass retrovirale TM-Proteine bei der Induktion von Immunsuppression in infizierten Zellen eine wichtige Rolle spielen. Wie bereits geschrieben, modulieren die TM-Proteine und die aus den jeweiligen ISU-Domänen abgeleiteten synthetischen Peptide die Sekretionsmuster der Zytokine in normalen Lymphozytenpopulationen. Da das Immunsystem als komplexes Netzwerk aus verschiedenen Regulationsprozessen funktioniert, kann die von TM-Proteinen sowie ISU-Peptiden induzierte Immunsuppression auf dieser Veränderung des Zytokinmusters, die aus der Gleichgewichtsverschiebungen zytokinproduzierender Zellen (z.B. T_H1- und T_H2-Lymphozyten) resultiert, beruhen. Für das rekombinante gp41 Protein von HIV-1 konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* die Überexpression von Typ2-Zytokinen wie IL-10, IL-6 und INF- α induziert, während die Typ1-Zytokine wie IL-2 und Tumornekrosefaktor (TNF) - α herunterreguliert werden (Takeshita *et al.*, 1995). Des Weiteren konnte durch die in der Arbeitsgruppe Denner durchgeführten Zytokinarrays gezeigt werden, 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 und Gro-(α , β , γ) zu erhöhen und die Expression von IL-2 und CXCL-9 herabzusetzen. Erhöhte Expression von IL-10, IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α und Gro- α und verringerte Expression von IL-2 sind ebenfalls bei HIV-1 infizierten Individuen zu beobachten (Denner und Kurth, 2001; Stacey *et al.*, 2009). Es kann davon ausgegangen werden, dass das gp41 von HIV-1, vor allem dessen ISU-Domäne, nicht nur bei der Infektion, sondern auch bei der Pathogenese eine wichtige Rolle spielen könnte.

1.2.3 Modulation der Genexpression durch das HIV-1 ISU-Peptid

Um die durch die Zytokinarrays erworbenen Daten (siehe 1.2.2) auf mRNA-Ebene zu bestätigen, wurde in der Arbeitsgruppe Denner ein Microarray (AB1700 Human Genome Survey Microarray V2.0) mit RNA von PBMCs, die mit dem HIV-1 ISU-Peptid für 24 h

inkubiert worden waren, durchgeführt. Dabei wurde das Expressionsmuster von 29098 humanen Genen in PBMCs untersucht. Es konnte die Hochregulation von 385 Genen sowie die Herunterregulation von 361 Genen detektiert werden. Das FC (*fold change*) bei der Erhöhung sowie bei der Erniedrigung der Genexpression ist auf den Wert von PBMCs, die nicht mit dem Peptid behandelt sind, bezogen.

Die dadurch gezeigten Daten bestätigen bzw. ergänzen die in den Zytokinarrays beobachteten Einflüsse von HIV-1 ISU-Peptid auf die Modulation der Zytokinproduktion. Die Hochregulation von IL-6 (FC von 810) und IL-8 (FC von 42) (Lauck, 2008), sowie die Herunterregulation von CXCL-9 (FC von -18) (Abbildung 1.9) korrespondieren so mit den Ergebnissen der Zytokinarrays. Unter den 25 am stärksten hochregulierten Genen befanden sich weitere Zytokine, wie z.B. IL-1 α , CXCL-5, CXCL-6, IL-24, CXCL-1, CXCL-13 und IL-1 β , das extrazelluläre Protein MMP-1 (Matrix-Metalloprotease 1, FC von 560) und das Membranrezeptor TREM-1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 1*, FC von 95) (Lauck, 2008). Weiterhin findet man unter den 25 am stärksten herunterregulierten Genen das Zytokin CXCL-10 (FC von -57), das Lektin FCN1 (*collagen/fibrinogen domain-containing protein 1*, FC von -189) und den Membran-ständigen Rezeptor TREM-2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*, FC von -72) (Abbildung 1.9). Diese Proteine sollten in Hinsicht auf eine Signaltransduktion und Immunsuppression weiter untersucht werden. Das rekombinante TM-Protein von HERV-K zeigte ebenfalls vergleichbare Ergebnisse (Denner *et al.*, unveröffentlicht).

**B**

	Name	Gensymbol	FC (ISU-Peptid vs. Kontrolle)
1	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	FCN1	-188,7260209
2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	DHRS9	-94,6229669
3	selenoprotein P, plasma, 1	SEPP1	-93,4641759
4	triggering receptor expressed on myeloid cells 2	TREM-2	-71,5572446
5	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL-10	-56,3391076
6	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	MS4A6A	-55,5233314
7	CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)	CD36	-54,5248746
8	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2	HS3ST2	-48,1068573
9	fibrinogen-like 2	FGL2	-45,3674330
10	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6E	MS4A6E	-41,8051835
11	glycoprotein (transmembrane) nmb	GPNMB	-40,1350402
12	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	DHRS9	-37,0917894
13	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	RNASE1	-34,0517149
14	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	FUCA1	-33,8224631
15	G protein-coupled receptor 34	GPR34	-30,6564624
16	cathelicidin antimicrobial peptide	CAMP	-25,7603663
17	Putative phospholipase B-like 1 precursor	FLJ22662	-23,8440262
18	apolipoprotein C-I	APOC1	-23,5466842
19	carboxypeptidase, vitellogenic-like	CPVL	-20,2833356
20	tetraspanin 4	TSPAN4	-19,0155158
21	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CXCL-9	-17,6744593
22	EPH receptor B2	EPHB2	-16,4608856
23	asialoglycoprotein receptor 1	ASGR1	-16,2466501
24	fatty acid binding protein 3, (mammary-derived growth inhibitor)	FABP3	-16,2339848
25	V-set and immunoglobulin domain containing 4	VSIG4	-13,8041727

Abbildung 1.9: Darstellung der 25 am stärksten herunterregulierten Gene nach Inkubation von PBMCs mit dem HIV-1 ISU-Peptid (Denner *et al.*, unveröffentlicht)

Humane PBMCs von einem gesunden Spender wurden für 24 h mit dem HIV-1 ISU-Peptid inkubiert, die RNAs wurden isoliert und mittels Microarray wurde die Änderung der Genexpression detektiert. FC (*fold change*) der herunterregulierten Gene wird sowohl graphisch (A) als auch tabellarisch (B) dargestellt.

1.3 Transforming growth factor- β 1

Wie für viele Retroviren beschrieben, ruft das HI-Virus eine Immundefizienz bei den Infizierten hervor, jedoch ist der Mechanismus dieser Unterdrückung des Immunsystems noch völlig unklar. Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben, besitzen das TM-Protein gp41, sowie das von dessen hochkonservierten Domäne in der N-terminalen Helixregion abgeleitete ISU-Peptid immunsuppressive Eigenschaften. Es ist aber bis heute noch nicht aufgeklärt, wie ISU die Immunantwort zu modulieren vermag. Es kann jedoch die Hypothese aufgestellt werden, dass diese ISU-Domäne an einen putativen Rezeptor auf der Oberfläche der Immunzellen spezifisch bindet und dadurch eine Signalkaskade zur Vermittlung immunsuppressiver Effekte auslösen kann. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass das retrovirale ISU-Peptid mit einem potenten immunsuppressiven Faktor, dem *transforming growth factor- β* (TGF- β) eine limitierte Sequenzhomologie zeigt (Huang und Huang, 1998) (Abbildung 1.10).

TGF- β motif		W/R X X D																									
TGF- β ₁	β_1^{25} (41-65)	A	N	F	C	L	G	P	C	P	Y	I	<u>W</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	T	Q	Y	S	K	V	L	A	L	Y	
TGF- β ₂	β_2^{25} (41-65)	A	N	F	C	A	G	A	C	P	Y	L	<u>W</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	T	Q	H	S	R	V	L	S	L	Y	
TGF- β ₃	β_3^{25} (41-65)	A	N	F	C	S	G	P	C	P	Y	L	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	T	T	H	S	T	V	L	G	L	Y	
CKS-25		T	S	L	S	E	V	V	L	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C	
CKS-25	RA/DA	T	S	L	S	E	V	V	L	Q	N	R	A	G	L	A	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C	
CKS-17										L	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	L	L	F	L	K	E	G	G	L	
MoMuLV	p15E	T	S	L	S	E	V	V	L	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C	
FLV	p15E	T	S	L	S	E	V	V	L	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C	
AKV	p15E	T	S	L	S	E	V	V	L	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C	
GLV	p15E	T	S	L	S	E	V	V	L	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C	
MMCF	p15E	T	S	L	S	E	V	V	L	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C	
AMCF	p15E	T	S	L	S	E	V	V	L	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C	
FeLV	p15E	T	S	L	S	E	V	V	L	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	I	L	F	L	Q	E	G	G	L	C	
BLV	gp30	L	N	V	A	S	V	V	A	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	W	L	Y	I	R	L	G	F	Q	S	
MPMV	gp20	D	S	L	A	E	V	V	L	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	L	L	T	A	E	Q	G	G	I	C	
SRV		D	S	L	A	E	V	V	L	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	L	L	T	A	E	Q	G	G	I	C	
HTLV-1	gp21	L	K	I	A	N	Y	A	A	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	L	L	F	W	E	Q	G	G	L	C	
HTLV-2	gp21	L	R	V	A	Q	Y	A	A	Q	N	R	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	L	L	F	W	E	Q	G	G	L	C	
HIV-1	gp41	⁵⁴⁶ S	G	I	V	Q	Q	Q	N	N	L	L	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	A	Q	Q	H	L	L	Q	L	T	V	⁵⁷⁰
		⁵⁷⁰ V	W	G	I	K	Q	L	Q	A	R	I	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	R	Y	L	K	D	Q	Q	L	L	G	⁵⁹⁴

Abbildung 1.10: Aminosäuresequenzen für eine konservierte Region von retroviralen TM-Proteinen und von humanen TGF- β 1-, TGF- β 2- und TGF- β 3-Peptiden (Huang und Huang, 1998)

Die putative „*active-site motif*“, von TGF- β ist unterstrichen. Das gp41 von HIV-1 enthält zwei Motives (RAIE und LAVE) und die HIV-ISU-Domäne enthält das zweite Motiv. MoMuLV: Moloney-murines Leukämievirus; FLV: Friend-Leukämievirus; AKV: murines Leukämievirus; GLV: Gross-Leukämievirus; MMCF: *mink-cell focus-forming virus of Moloney origin*; AMCF: *mink-cell focus-forming virus of AKR origin*; FeLV: felines Leukämievirus; BLV: bovines Leukämievirus; MPMV: Mason-Pfizer Monkey Virus; SRV: simianes Retrovirus; HTLV-1: humanes T-Zell-Leukämievirus Typ 1; HTLV-2: humanes T-Zell-Leukämievirus Typ 2.

Der TGF- β wurde als proliferationsfördernd für Fibroblasten beschrieben (Moses *et al.*, 1981; Roberts *et al.*, 1981). TGF- β gehört zu einer großen Familie sekretierter Wachstumsfaktoren, ein multifunktionelles Zytokin, das in fünf verschiedenen Isoformen vorkommt, bei Säugetierzellen jedoch nur in 3 Formen. Es kommt als latenter Komplex bestehend aus dem TGF- β -Homodimer (24 kDa), den TGF- β -Propeptiden (genannt *latency-associated protein*

oder LAP) und dem latenten TGF- β -bindenden Protein (LTBP) vor. Ein reifes TGF- β Molekül verbleibt assoziiert durch nicht-kovalente Interaktion mit LAP, wodurch die Bindung von TGF- β an seinem Rezeptor blockiert ist (Chen *et al.*, 2005). Fast alle Zelltypen sind in der Lage, TGF- β s zu synthetisieren. Besonders Immunzellen wie Thrombozyten, aktivierte T- und B-Zellen, aktivierte Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten, und Fibroblasten sind dazu befähigt (Roberts und Sporn, 1990). Da TGF- β und seine Rezeptoren ubiquitär (d.h. annähernd in allen Zellen gebildet wird) vorkommen, ist die Aktivierung von TGF- β kritisch reguliert, zwar erst durch Interaktionen mit spezifischen Membranrezeptoren (Ossege *et al.*, 1996; Cox und Maurer, 1997) und über intrazellulärer Botenstoffe (Smads) die Transkription spezifischer Zielgene steuern (Piek *et al.*, 1999).

TGF- β hat vielfältige biologische Funktionen, wie z.B. Regulierung der Proliferation sowie die Differenzierung der Zellen, embryonaler Entwicklung und der Apoptose (Massague *et al.*, 1994; Govinden und Bhoola 2003; Lee *et al.*, 2007). Seine wachstumshemmenden und immunsuppressiven Effekte sind bezüglich auf HIV bemerkenswert. Es war gezeigt worden, dass TGF- β die Akkumulation und Effektorfunktion der T_H1-Zellen inhibiert (Gorelik *et al.*, 2002; Fahlen *et al.*, 2005) und durch Induktion von FoxP3 an der Konversion der CD4⁺CD25⁻ naiven T-Zellen zu CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen beteiligt ist (Chen *et al.*, 2003). Es wurde beschrieben, dass TGF- β in PBMCs der HIV-Infizierten hochexprimiert wird (Hu *et al.*, 1996) und *in vitro* die Virusreplikation fördert (Lotz und Seth, 1993). Hierbei könnte TGF- β als endogener immunsuppressiver Faktor den Organismus vor dem Gewebeschaden, verursacht durch eine chronische Aktivierung der Leukozyten, schützen und bei der nicht-zytopathischen Immundefizienz mitwirken (Lotz und Seth, 1993). In der Microarray Analyse der Arbeitsgruppe konnte jedoch keine Hochregulation von TGF- β 1 Expression durch das ISU-Peptid, sondern eher eine Herunterregulation mit einem Faktor von -3,5 im Vergleich bei unbehandelten PBMCs gezeigt (Denner *et al.*, unveröffentlicht).

Huang und Huang konnten zeigen, dass eine verlängerte Version des immunsuppressiven Peptids, von CKS-17, genannt CKS-25, die Bindung von TGF- β 1 an die TGF- β -Rezeptoren der Nerzlungenepithelzell-Oberfläche hemmt (Huang und Huang, 1998). Zur Klärung des Mechanismus zur Unterdrückung der Immunantwort bei HIV-Infizierten ist die Frage interessant, in wie weit das ISU-Peptid des HIV ebenfalls in der Lage ist, mit TGF- β um den Rezeptor zu konkurrieren und so die TGF- β -induzierte Signaltransduktion zu interferieren.

1.4 Zielsetzung

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) ist seit mehr als 25 Jahren als Erreger des erworbenen Immundefizienzsyndrom (AIDS) beim Menschen bekannt. Obwohl das Virus sehr gut charakterisiert ist, ist es immer noch unklar, wie die Immunsuppression beim Infizierten zustande kommt. Viele Daten sprechen für eine aktive Immunsuppression durch das HIV bzw. durch ein virales Protein. Das virale transmembrane Hüllprotein gp41 und ein synthetisches Peptid (genannt ISU-Peptid), das einer hochkonservierten Region des gp41 entspricht, hemmen *in vitro* die Proliferation humaner Immunzellen und modulieren deren Zytokinproduktion. Es wurde jedoch noch nicht aufgeklärt, wie dieser immunsuppressive Effekt hervorgerufen wird. Durch die von der Arbeitsgruppe durchgeführten Zytokinarrays sowie Microarrays nach Inkubation des ISU-Peptids mit humanen PBMCs konnte gezeigt werden, dass das ISU-Peptid die Expression mehrerer Zytokine und anderer zellulärer Gene modulieren kann.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte das zeitliche Genexpressionsmuster des in den Zytokinarrays hochregulierten IL-10 mittels ELISA und Reverse-Transkriptase real time PCR (real time RT-PCR) Analysen untersucht werden. Des Weiteren sollten die im Microarray detektierte Herunterregulation der Expression von CXCL-9, TREM-2 und FCN1 sowie die Hochregulation der Expression von IL-6, MMP-1 und TREM-1 mittels real time RT-PCR bestätigt werden. Darüber hinaus sollten diese veränderten Genexpressionsmuster, die auf das HIV-ISU-Peptid zurückzuführen sind, mit der Genexpression in HIV-1 infizierten PBMCs verglichen werden. Hierzu wurden PBMCs mit HIV-1_{Ba-L} und HIV-1_{III_B} Isolaten infiziert und die Genexpression wurde mittels real time RT-PCR untersucht.

Die hochkonservierte ISU-Domäne aller retroviralen TM-Proteine hat eine limitierte Sequenzhomologie mit TGF- β 1. Es war von Huang und Huang 1998 gezeigt worden, dass ein verlängertes synthetisches Peptid (CKS-25), das von der immunsuppressiven Domäne des transmembranen Hüllproteins p15E der Gammaretroviren abgeleitet wurde, in der Lage ist, die Bindung von TGF- β 1 an seine Rezeptoren zu hemmen. Da TGF- β ebenfalls ein immunsuppressiver Faktor ist, sollte dieser Versuch mit dem ISU-Peptid von HIV-1 wiederholt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Name	Herkunft/Firma	Verdünnung
<u>Primärantikörper</u>		
Ziegenerum I (ZS1)	AG Denner, RKI (Immunist mit HIV-ISU-Peptid)	1:250 (WB)
B3	AG Denner, RKI (Immunist mit HIV-ISU-Peptid)	1:2 (WB)
Anti-human TGF- β 1	Abcam, Cambridge, UK	1:1000 (IF)
<u>Sekundärantikörper</u>		
Anti-Goat IgG HPRT	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	1:3000 (WB)
Anti-Mouse HRP	Dako, Hamburg, Deutschland	1:2000 (WB)
<u>Fluorochrom-Konjugate</u>		
Extravidin-Cy3	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	1:100 (IF)
Goat Anti-Mouse Alexa594	Invitrogen, Paisley, UK	1:400 (IF)

2.1.2 Puffer und Chemikalien

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

Die Kennzeichnung PBS „ohne“ bedeutet, dass kein MgCl₂ in der Zusammensetzung vorhanden ist. Im Gegensatz zur Kennzeichnung PBS ist MgCl₂ vorhanden.

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
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, complete TM EDTA-free	Roche, Mannheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G-250	Roth, Karlsruhe, Deutschland

DMEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTP-Mix, 10mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol reinst.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FKS (fötales Kälberserum, 10 %)	PAA, Pasching, Österreich
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES (1 M)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Interleukin-2 (IL-2)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
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
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	Pierce, Rockford, USA
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 0,1 μ g/ μ l	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Orange-G	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PCR-Puffer (10 \times)	Roche, Mannheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000 U / 10000 μ g/ μ l)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phytohämagglutinin (PHA), 9 μ g/ml	Remel Europe, United Kingdom
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
RNase-freies Wasser	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq-Polymerase (Ampli-Taq Gold™, 5 U/ μ l)	Roche, Mannheim, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	USB Corporation, Cleveland, USA
Tricin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRI-Reagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 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
CO ₂ -Inkubator Sanyo MCO-20AIC	Sanyo Biomedical, Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland
ELISA Reader Spectra Classic	Tecan, Crailsheim, Deutschland
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
pH Meter MP 200	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, 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	
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ThermoStat Plus (Thermomixer)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Labofuge A	Heraeus, Hanau, Deutschland
Trans-Blot SD® Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München, Deutschland
VF2 (Vortexer)	Janke&Kunkel, IKA® Labortechnik, Staufen, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage Sartorius Excellence E2000D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zählkammer Neubauer Improved	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Electron Corporation (Kendro), Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
Zentrifuge Heraeus Sepatech Minifuge RF	Thermo Electron Corporation (Kendro), Langenselbold, Deutschland

2.1.4 Kommerzielle Kits

Kit	Firma
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
BD OptEIA™ Human IL-10 ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham / GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Mem-Per Eukaryotic Membrane Protein Kit	Pierce, Rockford, USA
Extraction Reagent Kit	
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	Pierce, Rockford, USA
Quanti Tect Gene Expression Assays IL-10	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript™ III Platinum® One-Step	Invitrogen, Carlsbad, USA
	Quantitative RT-PCR System

2.1.5 Peptide

Für die Immunfluoreszenz- und Western Blot- Analyse

Die Monomere der folgenden von HIV-1 gp41 abgeleiteten synthetischen Peptide, die über einen 6-Aminohexansäure (Ahx) Linker an Biotin (Bio) gekoppelt waren, wurden von der Firma Genaxxon (Biberach, Deutschland) geliefert. Die Reinheit und Qualität wurden von der Firma mittels HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) und MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization – Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry*) geprüft.

- HIV-ISU: Bio-Ahx-Ahx-KQLQARILAVERYLKDQQL
- HIV-RAN: Bio-Ahx-Ahx-QQEKVAADKLRLIQYQLLR

Für die Analyse zur IL-10 Sekretion und zur Modulation der Expression von zellulären Genen

Die folgenden von HIV-1 gp41 abgeleiteten Peptide wurden von den unterschiedlichen Firmen geliefert und mittels EDC zu Peptid-Homopolymeren gekoppelt.

Tabelle 2.1: Sequenz und Herkunft der verwendeten Peptid-Polymere

Bezeichnung	Typ	Abkürzung	Aminosäuresequenz	Herkunft
HIV-ISU	Homopolymer	K176	NH ₂ -KQLQARILAVERYLKDQQL-COOH	Genaxxon
	Homopolymer	K209, K210, K221	NH ₂ -KQLQARILAVERYLKDQQL-COOH	JPT
HIV-RAN	Homopolymer	K46, K49	NH ₂ -QQEKVAADKLRLIQYQLLR-NH ₂	Jerini
	Homopolymer	K211, K212, K222	NH ₂ -QQEKVAADKLRLIQYQLLR-COOH	JPT

2.1.6 Primer und Sonden

Name	5'-3' Sequenz	Fragmentgröße [bp]
hs GAPDH fwd	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	
hs GAPDH rev	TGGTCCACACCCATGACGA	149
hs GAPDH Sonde	HEX-CTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGG[BHQ1]	
hs IL-10 fwd	CCACGCTTTCTAGCTGTT	
hs IL-10 rev	CTCCCTGGTTTCTCTTCCTAA	92
hs IL-10 Sonde	TCTTGTCTCTGGGCTT	
hs IL-6 fwd	GGTACATCCTCGACGGCATCT	
hs IL-6 rev	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC	81
hs IL-6 Sonde (Keller <i>et al.</i> , 2003)	6Fam-TGTTACTCTTGTTACATGTCTCCTTTCTCAGGGCT[BHQ1]	
hs MMP-1 fwd	CATCCAAGCCATATATGGACG	
hs MMP-1 rev	TCTGGAGAGTCAAATTCTCT	610
hs MMP-1 Sonde	6Fam-CTGGGCTGTTTCAGGGACAGAA[BHQ1]	
hs TREM-1 fwd	GCCTCACATGCTGTTTCGAT	
hs TREM-1 rev	GGTACAAATGACCTCAGCGT	578
hs TREM-1 Sonde	6Fam-CAGCCAGGAGAATGACAATGTTGA[BHQ1]	
hs TREM-2 fwd	CGGAATCTACAACCCCATGA	
hs TREM-2 rev	CTCCACATGGGCATCCTC	177
hs TREM-2 Sonde	6Fam-TCTCTACCAGTGCCAGAGCCTCCA[BHQ1]	
hs CXCL-9 fwd	GGAGTGCAAGGAACCCAGTA	
hs CXCL-9 rev	TCTTTCAAGGATTGTAGGTGGATAGTC	84
hs CXCL-9 Sonde (Schwartz <i>et al.</i> , 2000)	6Fam-TCGCTGTTCTGCATCAGCACCA[BHQ1]	
hs FCN1 fwd	CTGCAAGGACCTGCTAGACC	
hs FCN1 rev	AGTCCACAGAGCCATCCATC	152
hs FCN1 Sonde	6Fam-TATTTCTGAGCGGCTGGCACA[BHQ1]	
HIV-1 <i>gp41</i> fwd	GGARCAGCIGGAAGCACIATGG	
HIV-1 <i>gp41</i> rev	CCCCAGACIGTGAGITICAACA	145
HIV-1 <i>gp41</i> Sonde	6Fam-TGACGCTGACGGTACAGGCCAGAC[BHQ1]	

Die Oligonukleotide (Primer) und die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide (Sonden) für humanes IL-10 wurden von Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen, alle anderen für diese Arbeit verwendete Primer und Sonden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland). Die Sonden wurden am 5'-Ende mit FAM oder HEX als Donorfluorophor und am 3'-Ende mit BHQ1 als Akzeptorfluorophor gekoppelt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung von RNase-freiem Wasser

Zur Herstellung von Lösungen und Reaktionsansätzen für Arbeiten zur RNA-Analyse, wie z.B. Reverse-Transkriptase real time PCR (real time RT-PCR) wurde das RNase-freie Wasser verwendet. Dazu wurde das sterile Wasser mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Das DEPC bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine, z.B. Histidin, welches sich im katalytischen Zentrum vieler RNasen befindet, und inaktiviert die RNasen damit. Die Lösung wurde über Nacht (üN) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und anschließend 20 min autoklaviert. Dadurch wird sowohl das Wasser sterilisiert als auch das DEPC in seine Bestandteile CO₂ und Ethanol zersetzt.

2.2.1.2 Isolierung von RNA aus PBMCs mittels RNeasy-Kit

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus mit den Peptiden behandelten PBMCs (siehe 2.2.4.3) wurde das RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen inklusive DNase-Verdau verwendet und pro Säule wurden maximal ca. 3×10^6 Zellen eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation wurden zunächst die Zellen im Kulturmedium mit einer Pipette gut resuspendiert. Anschließend wurden sie in Eppis bzw. Falcontubes transferiert und für 10 min bei $2000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Bestimmung des IL-10-Gehaltes mittels ELISA bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren (siehe 2.2.3.1). Das Zellpellet wurde mit 800 µl PBS „ohne“ gewaschen und erneut bei $2000 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde es in 600 µl RLT-Puffer und 6 µl β-Mercaptoethanol homogenisiert und gevortext. Dabei werden die Zellen durch das Guanidin-Isothiocyanat im RLT-Puffer sowie das β-Mercaptoethanol lysiert und die RNasen wurden in Zell-Lysat denaturiert. Nachdem 700 µl Ethanol (70 % in DEPC-Wasser) zugesetzt wurden, wurde die Suspension in zwei Schritten von jeweils 700 µl und 600 µl auf die RNeasy Minisäule gegeben und bei $10000 \times g$ für 15 s zentrifugiert. Dabei wird die RNA an der Silicamembran der Minisäulen zurückgehalten. Die Säule wurde mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen, erneut bei $10000 \times g$ für 15 s zentrifugiert und dann mit 80 µl einer Mischung aus DNaseQ und RDD-Puffer (Verhältnis 1:7, RNase-free DNase Set, Qiagen) für 15 min inkubiert. Dem folgten Waschschrte mit 350 µl Puffer RW1 und mit 500 µl Puffer RPE jeweils bei $10000 \times g$ für 15 s und ein weiterer Waschschrte mit 500 µl Puffer RPE bei $12000 \times g$ für 1 min. Zur Entfernung aller Pufferreste wurde die Säule noch einmal für 15 s bei

12000 × g zentrifugiert. Zuletzt wurde die RNA durch Zugabe von 50 µl DEPC-Wasser und Zentrifugation bei 12000 × g für 1 min eluiert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und es wurden nur RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet. Nach Messung der RNA-Konzentration (siehe 2.2.1.4) wurde die RNA mit DEPC-Wasser auf 10 ng/µl verdünnt und aliquotiert bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Isolierung von Nukleinsäuren aus humanen PBMCs mittels TRI-Reagent und RNeasy-Kit

Die Gesamt-RNA und die genomische DNA aus HIV-1_{Ba-L} sowie HIV-1_{III_B} infizierten PBMCs (siehe 2.2.4.3) wurden mit Hilfe einer Kombination aus TRI-Reagent der Firma Sigma und RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen isoliert. Dabei erlaubt das TRI-Reagent sowohl eine chemische Inaktivierung der infektiösen Viren als auch eine gleichzeitige Isolation von RNA und DNA. Nach definierter Infektionszeit wurden die Zellen abgeschabt, da die in der Gesamtpopulation enthaltenen Makrophagen adhärent wachsen, während lymphoide Zellen in Suspension wachsen. Die Zellen wurden in Falcontubes transferiert und für 10 min bei 2000 × g zentrifugiert. Die Überstände wurden für den IL-10 ELISA bei -80 °C gelagert (siehe 2.2.3.1) und die Zellen wurden mit 5 ml PBS „ohne“ gewaschen und erneut bei 2000 × g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in TRI-Reagent (5 bis 10 × 10⁶ Zellen/ml) resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 200 µl Chloroform dazugegeben und die Probe wurde mindestens 15 s geschüttelt und dann erneut für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation für 15 min mit 12000 × g bei 4 °C entstehen drei Phasen. Zunächst wurde die RNA-haltige wässrige obere Phase vorsichtig entnommen und zur weiteren RNA-Isolation in ein neues Eppi überführt. Das entsprechende Volumen an Ethanol (70 % in DEPC-Wasser) wurde zugegeben, vermischt und auf eine RNeasy-Minisäule gegeben. Weitere Schritte erfolgten wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben und die isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert. Zur DNA-Isolation wurde die DNA-haltige Interphase nach dem Protokoll der Firma Sigma gereinigt. Das DNA-Pellet wurde in 300 µl 8 mM NaOH resuspendiert und anschließend für 10 min bei 12000 × g und 4 °C zentrifugiert, um unlösliches Material von der DNA zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Eppi transferiert und HEPES (6,6 µl von 0,1 M HEPES in 1 ml DNA-Lösung) wurde zugegeben, um einen für die PCR-Reaktion optimalen pH-Wert von 8,4 einzustellen.

2.2.1.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentration von isolierten Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (peQLab) gemessen. Als Kalibrierungsprobe wurde das jeweils zur Elution verwendete Wasser verwendet. Dabei wird die Reinheit der Proben durch die Bestimmung des Extinktionsquotienten 260nm/280nm ermittelt. Das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, wogegen Proteine aufgrund der aromatischen Seitenketten einiger Aminosäure wie Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufzeigen. Der Quotient aus 260 nm / 280 nm soll bei DNA-Proben bei 1,8 bis 2,0 liegen.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Agarose ist ein Polymer aus D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose und dient dabei als interne Matrix, in dem DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im DNA-Rückgrat zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle in der Gelmatrix hängt von verschiedenen Faktoren, wie Molekülgröße, Molekülkonformation, Agarosekonzentration und angelegter Gleichspannung ab. Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich in der Matrix proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Je nach zu erwartender Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1 - 2 % erstellt. Dafür wurde die Agarose in TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) durch Aufkochen gelöst und luftblasenfrei in Gelkammer (BioRad) gegossen. Die aufzutragenden Proben wurden mit der entsprechenden Menge $10 \times$ DNA-Ladepuffer versetzt und die Geltaschen beladen. Zur Abschätzung der Fragmentgröße wurde 5 μ l des Q'Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermantas) als Längenstandard mitgeführt. Die Elektrophorese wurde horizontal bei 5 - 8 V/cm², was einer Spannung von 80 - 120 V entspricht, durchgeführt. Anschließend wurden die Gele zur Markierung der DNA für 20 min in einem Ethidiumbromidbad (2 μ g/ml) inkubiert. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender Farbstoff und interkaliert dabei zwischen die Basen der DNA. Mit einem Transilluminator können die Moleküle durch eine Fluoreszenzanregung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht werden. Die abgestrahlte Wellenlänge ist energieärmer und somit im sichtbaren Bereich $E_{\max} = 590$ nm, wobei sich die Lichtintensität proportional zur vorhandenen DNA-Menge ist. Die Gele wurden digital mit dem BioRad Geldoc200 dokumentiert.

<u>50 × TAE-Puffer:</u>	2 M Tris, 1 M Eisessig, 50 mM EDTA
<u>10 × DNA-Ladepuffer:</u>	50 % (v/v) Glycerin, 2 % (v/v) 1 × TAE, Spatelspitze Orange G

2.2.1.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit der selektiven *in vitro* Amplifikation eines DNA-Abschnittes (Mullis *et al.*, 1986). Es handelt sich dabei um eine zyklische Reaktion, die das Aufschmelzen der komplementären DNA-Stränge (Denaturierung), die Anlagerung kurzer Oligonukleotide (Primer) *up-* bzw. *downstream* der Zielsequenz (Primer-Annealing) und die Neustrangsynthese/Kettenverlängerung (Elongation) umfasst. Während der Elongation verlängert die aus *Thermus aquaticus* gewonnene thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) die Primer am freien 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 spezifischen DNA-Fragmentes kommt.

Gradienten-PCR

Um die optimale Annealingtemperatur in der PCR und real time PCR bzw. real time RT-PCR eingesetzten Primer zu bestimmen, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt, bei der die Annealingtemperaturen steigend um eine bestimmte Gradzahl zunahm. Zu Beginn der Reaktion wurde die Taq-Polymerase für 7 min bei 95 °C aktiviert (*hot-start*). Anschließend erfolgten 36 Amplifikationszyklen, welche sich aus den Schritten Denaturierung (30 s bei 95 °C), Annealing (30 s bei einer Temperaturspanne von 50 - 65 °C) und Elongation (30 s - 1 min 45 s bei 72 °C) zusammensetzten. Bei einer Temperaturspanne des Annealings von 50 - 65 °C entstand folgender Gradient: 49,8 °C, 50,2 °C, 51,1 °C, 52,5 °C, 54,3 °C, 56,2 °C, 58,3 °C, 60,2 °C, 62 °C, 63,5 °C, 64,6 °C, 65,1 °C. Die Elongationszeit lag je nach Fragmentlänge zwischen 30 s und 1 min 45 s. Zum Abschluss der Reaktion wurde die finale Extension (5 min bei 72 °C) durchgeführt und anschließend wurde die Amplifikate bei 4 °C gelagert. Die amplifizierten Fragmente wurden auf 1 - 2 %iges Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.5) aufgetrennt. Die durch Ethidiumbromid sichtbar gemachten Banden wurden in ihrer Intensität verglichen.

PCR-Reaktionsansatz:

Template	100 - 200 ng DNA
Primer fwd (10 pmol/μl)	0,50 μl
Primer rev (10 pmol/μl)	0,50 μl

10 × PCR-Puffer	2,50 µl
dNTPs (10 mM)	0,50 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,75 µl
Ampli-Taq Gold (5 U/µl)	0,25 µl
Nuclease-freies ddH ₂ O	ad 25 µl

PCR zum Nachweis der Provirusintegration

Mittels PCR ist es möglich, genomische DNA hinsichtlich einer Provirusintegration zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden HIV-1 *gp41*-spezifische Primer für den Nachweis einer Integration des HIV-1_{Ba-L} sowie HIV-1_{III_B} in das Genom humaner PBMCs eingesetzt. Die optimale Konzentration der Primer, MgCl₂ und dNTPs wurden experimentell ermittelt. Die Reaktion wurde in einem 25 µl-Ansatz durchgeführt. Um eine mögliche Kontamination auszuschließen, wurde eine Wasserprobe ohne Template als Negativkontrolle mitgeführt.

PCR-Reaktionsansatz:

Template	200 ng DNA
Primer HIV-1 <i>gp41</i> fwd (10 pmol/µl)	0,50 µl
Primer HIV-1 <i>gp41</i> rev (10 pmol/µl)	0,50 µl
Sonde HIV-1 <i>gp41</i> (10 pmol/µl)	0,50 µl
10 × PCR-Puffer	2,50 µl
dNTPs (10 mM)	0,63 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,75 µl
Ampli-Taq Gold (5 U/µl)	0,25 µl
Nuclease-freies ddH ₂ O	ad 25 µl

Temperaturprofil:

35 Zyklen 95 °C/10 min – [95 °C/30 s – 52 °C/45 s – 72 °C/20 s] – 72 °C/5 min – 4 °C/∞
 ----- 35 × -----

2.2.1.7 Quantitative real time PCR

Die quantitative real time PCR stellt eine Weiterentwicklung der PCR dar, welche die zeitgleiche Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuren erlaubt. Die Grundlage für diese Methode wurde im Jahr 1993 durch Higuchi *et al.* geschaffen (Higuchi *et al.*, 1993). 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 sog. Threshold Cycle oder CT-Wert. Der CT-Wert beschreibt denjenigen PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. In der Arbeit wurden ausschließlich sequenzspezifische TaqMan-Sonden verwendet, die eine höhere Signalspezifität sowie eine gesteigerte Sensitivität im Vergleich zur klassischen SYBR-

Green-Methode gewährleisten. 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 zwischen den beiden Primern an die Ziel-DNA binden. Die Fluoreszenz des Reporter-Fluorochroms wird bei intakten TaqMan-Sonden durch einen in räumlicher Nähe befindlichen Quencher mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) unterdrückt (Livak *et al.*, 1995). Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang und die Reporter-Fluoreszenz bleibt zunächst unterdrückt. Das 5'-Ende der Sonde wird aber während der Synthese der DNA durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut, wodurch sich Quencher und Reporter voneinander entfernen. Der Reporter kann deshalb ein Fluoreszenzsignal aussenden, das vom Gerät detektiert wird. Dabei ist die Zunahme der Fluoreszenz zwischen den Zyklen proportional zur Anzahl der neu synthetisierten Stränge und kann man so die untersuchende Sequenz zeitgleich quantifizieren.

One-Step Reverse-Transkriptase real time PCR (One-Step real time RT-PCR)

Zur Quantifizierung der Transkription von verschiedenen zellulären Genen (IL-10, CXCL-9, FCN1, IL-6, TREM-1/-2 und MMP-1) wurde eine modifizierte Variante der quantitativen real time PCR, sog. One-Step Reverse-Transkriptase real time PCR (One-Step real time RT-PCR) angewendet. Dabei laufen die Umschreibung der RNA in cDNA und die spezifische Amplifikation sowie die Detektion der Transkripte in einem Ansatz kombiniert ab. Die Reverse-Transkriptase wird nach der cDNA-Synthese bei 95 °C hitzeinaktiviert. Es wurde das SuperScripIII one-step RT Kit von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. In jeder Reaktion wurden 50 ng Gesamt-RNA eingesetzt und alle Werte wurden als Triplikate gemessen. Die Messung der Reporterfluoreszenz erfolgte mit dem Mx4000 Multiplex Quantitative PCR System (Stratagene, Amsterdam, Niederland), die Erfassung der Daten mit der dazugehörigen Software (Version 4.20). Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate wurden mit Microsoft Excel berechnet. Um die Zytotoxizität der HIV-ISU-Homopolymere bzw. HIV-1 zu untersuchen und um die Replikate untereinander vergleichen zu können, wurde das „house keeping“-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit dem zu untersuchenden Gen koamplifiziert. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Livak und Schmittgen (2001). Als Negativkontrolle wurde ein Reaktionsansatz mit ddH₂O statt mit RNA untersucht. Zusätzlich wurde von jeder RNA-Probe ein Aliquot mit der Ampli-Taq Gold und ohne Reverse-Transkriptase angesetzt, um mögliche DNA-Kontaminationen feststellen zu können. Die verwendeten Primerpaare

wurden zuvor einzeln geprüft, um zu untersuchen, ob Interferenzen zwischen den gleichzeitig verwendeten Primerpaaren auftreten.

Zur Quantifizierung der Genexpression von TREM-2 wurden mit Hilfe des „Primer3Plus“ Programms Primerpaare und eine Sonde dafür designed. Wurden Primer und Sonde im Überschuss zugegeben und konnten aufgrund optimaler Bedingungen (Salzkonzentration, Temperatur und Sequenzhomologie) alle passenden, denaturierten DNA-Einzelstränge binden, kommt es in der Theorie in jedem Zyklus zu einer Verdopplung der Amplifikate, was einer Effizienz von 100 % entspricht. In der Praxis ist diese Effizienz bei jedem eingesetzten Primerpaar verschieden und von Faktoren wie Sekundärstrukturbildung und Amplifikatlänge abhängig. Daher wurde in der Arbeit im Zuge der Ermittlung der Primereffizienz mit Hilfe der CT-Werte definierter Template-Verdünnung Standardkurve generiert. Dafür wurde die Gesamt-RNA (200, 100, 50 und 25 ng) eingesetzt und wie oben geschrieben, One-Step real time RT-PCR als Duplex mit GAPDH und jeweils als Triplikate durchgeführt. Die Effizienz (E) konnte mit Hilfe der Steigung (m) der Standardkurve nach folgender Formel berechnet werden:

$$E (\%) = (10^{-1/m} - 1) \cdot 100$$

IL-10

Reaktionsansatz:

RNA (10 ng/μl)	5 μl
Primermix IL-10 (20 ×)	1,25 μl
Sonde IL-10 (20 ×)	1,25 μl
Primer GAPDH fwd (10 pmol/μl)	0,50 μl
Primer GAPDH rev (10 pmol/μl)	0,50 μl
Sonde GAPDH (10 pmol/μl)	0,50 μl
2 × reaction mix	12,5 μl
SSIII RT/Platinum-Taq	0,50 μl
Nuklease-freies ddH ₂ O	ad 25 μl

Temperaturprofil:

45 Zyklen 50 °C/10 min – 95 °C/2 min – [95 °C/15 s – 56 °C/30 s – 72 °C/30 s] – 4 °C/∞
 ----- 45 × -----

CXCL-9/ FCN1/ IL-6/ TREM-1/ TREM-2/ MMP-1

Reaktionsansatz:

RNA (10 ng/μl)	5 μl
Primer X fwd (10 pmol/μl)	0,5 μl
Primer X rev (10 pmol/μl)	0,5 μl
Sonde X (10 pmol/μl)	0,5 μl
Primer GAPDH fwd (10 pmol/μl)	0,5 μl

Priemr GAPDH rev (10 pmol/μl)	0,5 μl
Sonde GAPDH (10 pmol/μl)	0,5 μl
2 × reaction mix	12,5 μl
SSIII RT/Platinum-Taq	0,5 μl
Nuklease-freies ddH ₂ O	ad 25 μl

CXCL-9/ IL-6/ Temperaturprofil:

45 Zyklen 50 °C/10 min – 95 °C/2 min – [95 °C/15 s – 60 °C/1 min] – 4 °C/∞
 ----- 45 × -----

MMP-1/ TREM-1 Temperaturprofil:

40 Zyklen 50 °C/10 min – 95 °C/2 min – [95 °C/15 s – 60 °C/2 min] – 4 °C/∞
 ----- 40 × -----

FCN1/ TREM-2 Temperaturprofil:

45 Zyklen 50 °C/10 min – 95 °C/2 min – [95 °C/15 s – 60 °C/30 s – 72 °C/30 s] – 4 °C/∞
 ----- 45 × -----

Reaktionsansatz zur DNA-Kontaminationskontrolle

RNA (10 ng/μl)	5 μl
Primer X fwd (10 pmol/μl)	0,50 μl
Primer X rev (10 pmol/μl)	0,50 μl
Sonde X (10 pmol/μl)	0,50 μl
Primer GAPDH fwd (10 pmol/μl)	0,50 μl
Primer GAPDH rev (10 pmol/μl)	0,50 μl
Sonde GAPDH (10 pmol/μl)	0,50 μl
10 × PCR-Puffer	2,50 μl
dNTPs (10 mM)	0,50 0μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,75 μl
Ampli-Taq Gold(5 U/μl)	0,25 μl
Nuklease-freies ddH ₂ O	ad 25 μl

Real time PCR zur Quantifizierung der Provirusintegration

Um eine Provirusintegration von HIV-1 im Genom exakt zu quantifizieren, wurde die auf TaqMan-Sonde basierte real time PCR eingesetzt. Zunächst wurde mit Hilfe der CT-Werte definierter Kopienzahl eines Plasmids pCAL-n mit HIV-1 *gp41* Sequenz (genannt pUR006) eine Standardkurve generiert. Das Plasmid pUR006 wurde in der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Hierfür wurde die real time PCR nicht nur mit dem Plasmid durchgeführt, sondern auch mit uninfizierter genomischer DNA (200 ng). Damit konnte ein ähnliches PCR-Milieu wie bei der PCR mit der Provirus-integrierten genomischen DNA geschaffen werden. Anhand der Standardkurve konnte die Anzahl der Proviren in einer bestimmten Menge der genomischen DNA (200 ng), welche aus HIV-1 infizierten PBMCs isoliert worden ist (siehe **2.2.1.3**), ermittelt werden.

RT-PCR-Reaktionsansatz:

Template	Plasmid + 200 ng DNA bzw. 200 ng DNA
Primer HIV-1 <i>gp41</i> fwd (10 pmol/μl)	0,50 μl

Primer HIV-1 <i>gp41</i> rev (10 pmol/μl)	0,50 μl
Sonde HIV-1 <i>gp41</i> (10 pmol/μl)	0,50 μl
10 × PCR-Puffer	2,50 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,75 μl
dNTPs (10mM)	0,63 μl
Ampli-Taq Gold (5 U/μl)	0,25 μl
Nuclease-freies ddH ₂ O	ad 25 μl

Temperaturprofil:

35 Zyklen 95 °C/10 min – [95 °C/30 s – 52 °C/45 s – 72 °C/20 s] – 72 °C/5 min – 4 °C/∞
 ----- 35 × -----

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**2.2.2.1 Kopplung von Peptiden zu Polymeren**

Es wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass das immunsuppressive (ISU-) Peptid mit einem Molekulargewicht unter 4 kDa allein nicht in der Lage ist, immunregulatorische Effekte auszuüben (Denner *et al.*, 1994). Daher müssen die monomeren ISU-Peptide an größere Trägermoleküle wie z.B. BSA gekoppelt oder selbst zu Polymeren verknüpft werden. In dieser Arbeit wurde die Kopplung zu Polymeren gewählt, um eine höhere Multiplizität an wirksamen Peptiden in den Assays zu erreichen. Für die chemische Kopplung von Peptiden wurde ein reaktives Carbodiimid, EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid) als quervernetzende Substanz (Crosslinker) eingesetzt. EDC reagiert dabei mit den Carboxylgruppen des jeweiligen Peptids und bildet ein reaktives Zwischenprodukt, welches mit primären Aminen eines weiteren Peptids eine Amidbindung eingehen kann. Zur Herstellung der Polymere wurden zu 2 ml PBS „ohne“ jeweils 4 mg HPLC-gereinigtes Peptid und 38,4 mg EDC sowie 2 mg N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS) hinzugegeben und vermischt. Das NHS erhöht die Halbwertszeit des Zwischenproduktes in Wasser (Staros *et al.*, 1986) und verlängert somit die Reaktionszeit. Nach Inkubation des Reaktionsgemisches für 3 h bei Raumtemperatur erfolgte die Dialyse gegen PBS „ohne“ bei 4 °C (MWCO (*molecular weight cut off*): 10000 Da, Spectra/Por Biotech) zur Entfernung der niedermolekularen Fraktionen. Die Charakterisierung der Polymere erfolgte mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.2.3) und Western Blot Analyse (siehe 2.2.3.3). Als Kontrollpeptid wurde randomisiertes Peptid (genannt HIV-RAN-Peptid) verwendet, welches aus den gleichen Aminosäuren vom HIV-ISU-Peptid aufgebaut ist, deren Reihenfolge aber nicht der Sequenz vom ISU-Peptid entspricht.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem BCATM Protein Assay Kit der Firma Pierce durchgeführt. Der BCA Protein Assay kombiniert die Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch die Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin in einem alkalischen Milieu mit einer hoch sensitiven und selektiven colormetrischen Detektion von Cu⁺ durch Bicinchoninsäure (BCA). Durch die Chelatisierung von Cu⁺ mit je zwei BCA entsteht ein Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm besitzt und dadurch eine photometrische Quantifizierung erlaubt. Für den Assay wurde zuerst eine Gebrauchslösung aus 50 Teilen BCA Reagenz A und einem Teil BCA B hergestellt. Von der fertigen Gebrauchslösung wurden 200 µl pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 10 µl der zu untersuchenden Proben vermischt. Als Vergleichsstandard diente eine „Albumin Standard“, von dem ebenfalls je 10 µl der Konzentration 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 zu untersuchenden Proben wurden als Triplikate, die Standards als Duplikate untersucht.

2.2.2.3 Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine bzw. Peptide nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche Tricin-Sodium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Schägger und Jagow, 1987; Schägger *et al.*, 1988). Vor dem Auftragen der zu untersuchenden Proben wurden diese mit gleichen Volumen Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend bei maximaler Umdrehungszahl kurz zentrifugiert. Durch den Vorgang werden die Proteine sowohl durch die Hitze als auch durch die im Probenpuffer enthaltene Sodium-Dodecylsulfat (SDS) und β-Mercaptoethanol denaturiert. Bei SDS handelt es sich um ein anionisches Detergenz, welches durch Anlagerung an Proteine deren Eigenladung überdecken, so dass Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. β-Mercaptoethanol ist eine reduzierende Thiolverbindung und spaltet Disulfidbrückenbindungen in Proteinen auf. Wasserstoff- und Disulfidbrücken der Proteine wurden so zerstört und dessen Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgelöst. Dadurch kann gewährleistet werden, dass nur die Größe bzw. das Molekulargewicht als Trennkriterium wirksam werden. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes wurde als Massenstandard 10 µl des PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) eingesetzt. Die Trennung erfolgte vertikal in der SDS-

Gelkammer bei konstanter Stromstärke (Sammelgel: 0,03 A, Trenngel: 0,06 A). Anschließend wurde das Gel der Western Blot Analyse unterzogen (siehe 2.2.3.3) bzw. mit Coomassie Blue gefärbt. Die Färbung erfolgte 10 - 15 min und anschließend wurde das Gel für mindestens 2 h bei Raumtemperatur entfärbt.

<u>Probenpuffer:</u>	50 mM Tris-HCl (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
<u>Gelpuffer:</u>	3 M Tris-HCl (pH 8,4), 0,3 % (w/v) SDS
<u>Anodenpuffer:</u>	200 mM Tris (pH 8,9)
<u>Kathodenpuffer:</u>	100 mM Tris (pH 8,25), 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS
<u>Entfärblösung:</u>	25 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der SDS-Gele

Trenngel (pH 8,8, 10 % Acrylamid)	Sammelgel (pH 6,4, 4 % Acrylamid)
2,5 ml Gelpuffer	1,0 ml Gelpuffer
2,5 ml ddH ₂ O	1,6 ml ddH ₂ O
2,5 ml Acrylamid (30 %)	0,4 ml Acrylamid (30 %)
50 μ l APS	50 μ l APS
5 μ l TEMED	5 μ l TEMED

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 IL-10 Capture ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Der IL-10 ELISA wurde neben der RT real time PCR genutzt, um die IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit Peptid-Homopolymeren zu untersuchen. Der ELISA ist ein immunologisches Verfahren zum quantitativen Nachweis von Proteinen, Viren oder auch niedermolekularen Verbindungen wie Hormonen, Toxinen oder Pestiziden. Es beruht auf der Eigenschaft von Antikörpern, Epitope auf dem Protein/Molekül zu erkennen und daran spezifisch zu binden. Der Nachweis dieser Interaktion erfolgt in der Regel durch einen Sekundärantikörper, an den ein Enzym (z.B. *horse radish peroxidase* = HRP) gekoppelt ist, welches den Umsatz eines bestimmten Substrates (z.B. Wasserstoffperoxid H₂O₂) durch eine Farbänderung detektieren kann. Die Bestimmung des IL-10 Gehaltes in Zellkulturüberständen wurde mittels BD OptEIA Human IL-10 ELISA Kit (BD Bioscience) durchgeführt. Zunächst wurden die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit jeweils 100 μ l *capture-antibody* in *coating buffer* μ N bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde mit Hilfe des ELISA Washers (Tecan) 3 \times mit 300 μ l Waschpuffer pro Well gewaschen und zur Entfernung der Pufferreste die Mikrotiterplatte auf Zellstoff ausgeschlagen. Nach einstündiger Inkubation mit 200 μ l *assay diluent* pro Well wurde drei Waschschrte wiederholt. Die Überstände aus der

jeweiligen Inkubation wurden aufgetaut und 100 µl pro Well aufgetragen. Als Standard wurden Verdünnungen von 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6, 7,8, 3,9 und 0 pg/ml rekombinantem IL-10 pipettiert und 2 h bei Raumtemperatur 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 Raumtemperatur inkubiert, 7 × gewaschen (Einwirkzeit jeweils 30 s) und anschließend die Substratlösung hinzugegeben (100 µl/Well). Nach 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurden 50 µl Stopplösung in jedes Well pipettiert und die Absorption am ELISA Reader Spectra Classic (Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenz von 560 nm gemessen. Durch den Vergleich mit der Kalibriergeraden konnte der IL-10 Gehalt der Proben bestimmt werden.

2.2.3.2 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde untersucht, ob biotinylierte HIV-ISU-Peptide, in der Lage sind, die Bindung von TGF-β1 an die Oberfläche von Mv1Lu zu hemmen. Um zunächst die Bindung der HIV-ISU-Peptide an die Zellen festzustellen, wurden jeweils 1×10^5 Mv1Lu-Zellen (siehe 2.2.4.4) in einer 6-Well-Platte (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) auf ein Deckgläschen ausgesät und μ N im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden 3 × mit PBS „ohne“ gewaschen und für 15 min in eisgekühltem 4 % Paraformaldehyd (PFA) auf Eis und für 30 min in 8 % PFA bei Raumtemperatur nacheinander fixiert. Danach erfolgte das Quenching in 50 mM NH₄Cl für 10 - 30 min. Die Zellen wurden immer dazwischen 3 × mit PBS „ohne“ gewaschen. Anschließend wurden sie mit 10 µg biotinyliertem HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Peptid über einen Zeitraum von 15 min, 30 min bzw. 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgten erneute Waschschrte. Um eine putative Interaktion zwischen den Peptiden und einem Rezeptor auf der Oberfläche der Zellen zu stabilisieren, wurde ein Vernetzer (Crosslinker), Bissulfosuccinimidylsuberat (BS³), verwendet. Bei BS³ handelt es sich um einen homobifunktionalen und wasserlöslichen Crosslinker mit einer Länge von 11,4 Å. Da BS³ nicht membrangängig ist, ist er ideal für ein Crosslinking des Moleküls auf der Zelloberfläche. Er enthält beidseitig je einen aminreaktiven 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 Lysin in der Seitenkette oder am N-Terminus, die für diesen Crosslinker zugänglich sind. Durch die Na⁺-Sulfonsäuregruppen ist BS³ sehr gut in Wasser und damit auch in den gängigsten Puffern löslich. Dazu wurde BS³ in einer finalen Konzentration von 2 mM eingesetzt und die

Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Durch anschließende Zugabe von Tris-HCl (pH 7,5) mit einer finalen Konzentration von 20 mM für 15 min bei Raumtemperatur wurde die Crosslinking-Reaktion gestoppt. Um Reste von BS³ vollständig zu entfernen, wurden die Zellen 3 × mit PBS „ohne“ gewaschen. Zur Detektion einer möglichen Bindung der Peptide an Zellen wurde ExtrAvidin-Cy3 in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben und die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert. ExtrAvidin-Cy3 ist in der Lage, spezifisch an die mit Biotin gekoppelten Peptide zu binden und ermöglicht durch die Kopplung mit dem Fluorochrom Cy3 eine Visualisierung dieser Bindung. Um nicht gebundene ExtrAvidin-Cy3-Moleküle zu entfernen, erfolgte erneut ein Waschschriff. Vor der Einbettung der Zellen wurde das Deckgläschen kurz in ddH₂O eingetaucht, um Salze abzuwaschen. Anschließend wurde es auf einen Objektträger, auf dem bereits 25 µl Moviol/Dapi (1:25000) (Millipore, Billerica, USA) aufgebracht wurde, mit der Zellseite nach unten gelegt und üN bei Raumtemperatur ausgehärtet. Die Lagerung bis zur Auswertung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops erfolgte in Dunkelheit.

Um die Bindung von TGF-β1 an Zellen festzustellen, wurden die Zellen, wie oben beschrieben, fixiert und mit 5 µg sowie 10 µg humanem TGF-β1 für 1 h inkubiert. Parallel dazu wurden die lebenden Zellen (d.h. vor der Fixierung) ebenfalls mit TGF-β1 für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte ein Crosslinking mit BS³. Zur Detektion einer möglichen Bindung der TGF-β1 an Zellen wurden die Zellen mit Mouse Anti-Human TGF-β1 (1:1000 Verdünnung) für 45 min und mit Goat Anti-Mouse Alexa 594 (1:400 Verdünnung) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Einbettung und Auswertung wurden wie oben durchgeführt. Das verwendete TGF-β1 wurde dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. Bauer vom Universitätsklinikum Freiburg zur Verfügung gestellt.

2.2.3.3 Western Blot Analyse

Die immunologische Analyse von Proteinen bzw. Peptiden erfolgte mittels Western Blot Analysen (Towbin *et al.*, 1979). In der Arbeit wurde diese Methode zur Charakterisierung der gekoppelten Peptide (siehe **2.2.2.1**) und zur Bindungsanalyse von biotinylierten HIV-ISU-Peptiden sowie TGF-β1 mit Gesamtzellextrakten bzw. Membranproteinen angewendet. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im elektrischen Feld durch das Semidry-Blotting-Verfahren auf eine Nylonmembran übertragen und durch Inkubation mit Antisera oder Antikörpern wurden bestimmte Proteine aus einer Vielzahl identifiziert. Zunächst wurden das SDS-Gel sowie zwei Blotting-Filterpapiere 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 *Semi-Dry* Transfer Cell (BioRad Trans-Blot SD[®] Semi-Dry Transfer Cell, Biorad, Hercules, USA) aufgebaut und die Proteine wurden bei 20 V für 30 min auf die PVDF-Membran geblottet. Anschließend wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer schüttelnd inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen und dadurch unspezifische Bindungen zu minimieren. Die weitere Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1,5 h bei Raumtemperatur bzw. üN bei 4 °C. Nach dem Waschen mit Waschpuffer (3 × 10 min) wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert und erneut gewaschen (3 × 10 min). Die Detektion erfolgte mittels *enhanced chemoluminescence* (ECL, ECL Western Blotting Detection Reagents Kit, Amersham). Das im Kit enthaltene Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion) wird durch die mit den Sekundärantikörpern konjugierte HRP und Wasserstoffperoxid oxidiert, wobei es in einen angeregten Zustand versetzt wird. Die dabei gespeicherte Energie wird in Form von Licht (Chemilumineszenz) wieder abgegeben. Die ECL äußert sich in verstärkter und länger anhaltender Emission von Licht, die durch Zugabe von Phenolen erreicht wird. Die Membran wurde 1 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert und anschließend in einer Photokassette (Kodak) der CL-XPosure[™] Clear Blue X-Ray Film (Pierce) aufgelegt. Die Entwicklung erfolgte in der Entwicklermaschine Curix 60 (Agfa).

<u>Blockierungspuffer:</u>	PBS, 5 % (w/v) Milchpulver, 0,05 % (v/v) Tween20
<u>Transferpuffer:</u>	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 1,875 ml 20 %iges SDS
<u>Waschpuffer (PBS-T):</u>	PBS, 0,05 % (v/v) Tween20

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Isolierung humaner PBMCs aus Vollblut und Buffy Coats

Die Separation mononukleären Zellen aus dem Vollblut bzw. aus dem Buffy Coat erfolgte mit Hilfe von LeucoSep[®] (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Dieses System beruht auf dem Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation unter Verwendung von Lymphozytenseparationsmedium (Ficoll-Isopaque, PAA Laboratories, Pasching, Österreich). Während der Zentrifugation werden Lymphozyten und PBMCs entsprechend ihrer spezifischen Dichte in einer Interphase zwischen der Plasmafraktion (Plasma und Thrombozyten) und dem Separationsmedium angereichert. Die unerwünschten Erythrozyten und Granulozyten werden aufgrund ihrer höheren Dichte davon separiert und bilden das Zellsediment. Zunächst wurde das periphere Blut von einem gesunden Spender in einem

Heparinröhrchen (BD Vacutainer® Tube Sodium Heparin, Becton Dickinson, Heidelberg) entnommen bzw. ein Buffy Coat (Blutspenderdienst, Berlin Wannsee) aus dem Vollblut eines gesunden, HIV-negativen Stammspenders, wobei durch Zentrifugation das Großteils des Plasmas und des Erythrozytenkonzentrats entfernt worden ist, verwendet. Vor Beginn der Isolation der PBMCs wurden 15 ml des Separationsmediums in ein 50 ml Leucosep-Röhrchen mit Filterscheibe vorgelegt und für 1 min bei $800 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Medium befand sich daraufhin unterhalb der Trennscheibe und anschließend wurden bis zu 30 ml mit Heparin (17 U/ml) versetztes Blut in jeweils ein Röhrchen gegeben und für 15 min bei $800 \times g$ ohne Bremse zentrifugiert. Danach ergab sich eine spezifische Schichtung der Blutbestandteile. Die oberste Phase, das Blutplasma, wurde verworfen. Darunter sammelten sich die Lymphozyten in einem Ring an, der vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues 50 ml Falcontube überführt wurde. Die isolierten PBMCs wurden in 50 ml PBS „ohne“ gewaschen und für 10 min bei $250 \times g$ zentrifugiert. Wies das daraus resultierende Zellpellet eine rote Färbung auf, deutet dies auf eine Kontamination mit Erythrozyten hin. Bei einer Kontamination wurde das Zellpellet in 10 ml 0,86 %igen Ammoniumchlorid für 20 min bei $37^\circ C$ inkubiert, um die restlichen Erythrozyten zu entfernen. Danach wurden die Zellen $3 \times$ mit PBS „ohne“ für 10 min bei $250 \times g$ gewaschen und erneut resuspendiert. Anschließend wurde die Lebendzellzahl bestimmt (siehe 2.2.4.2).

2.2.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit 0,4 %igen Trypanblau im Verhältnis 1:1 vermischt. Trypanblau ist ein negativ geladenes Chromophor, welches unspezifisch mit Proteinen interagiert. Es kann durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol eindringen, mit intrazellulären Proteinen reagieren und diese Zellen tiefblau färben. Währenddessen erscheinen lebende Zellen aufgrund der intakten Zellmembran 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 Zählfeldern wurden die lebenden Zellen gezählt. Der Mittelwert der Zellzahlen der vier Zellkammern 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 Zellen wurden anschließend in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

2.2.4.3 Zellkulturversuche mit humanen PBMCs

Die frisch isolierten humanen PBMCs wurden wie folgt unterschiedlich vorbehandelt und bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Inkubationszeiten variieren zwischen wenigen Stunden und 7 Tagen.

Behandlung mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren

Hierfür wurde eine NunclonTM delta Surface 96-Well-Platte (Nunc A/S Roskilde, Dänemark) und als Kulturmedium RPMI (Rosswell Park Memorial Institut) -Medium mit 10 % (v/v) FKS, 100 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES und 4 mM Glutamin verwendet. Pro Well wurden 100 µl Zellsuspension (3×10^6 Zellen/ml) und 100 µl Peptid-Polymerlösung (50 µg/ml) pipettiert, so dass eine Endkonzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml und 25 µg/ml Polymer erreicht. Als Kontrolle diente die Inkubation nur in Kulturmedium.

Infektion mit HIV-1_{BA-L} bzw. HIV-1_{IIB} Isolaten

Die naiven PBMCs wurden in T175-Zellkulturflasche (50 ml, 2×10^6 Zellen/ml) (TPP, Trasdingen, Schweiz) ausgesät und mit einer Kombination aus IL-2 (100 U/ml) und Phytohämagglutinin (PHA; 9 µg/ml) für drei Tagen stimuliert. Hierfür wurde RPMI-Medium mit 15 % (v/v) FKS, 100 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES und 4 mM Glutamin verwendet. Danach wurden die Zellen abgeschabt, um die adhären wachsenden Makrophagen nicht zu verlieren, und einmal mit PBS „ohne“ gewaschen, um PHA und abgestorbene Zellen zu entfernen. Sie wurden für 10 min bei $250 \times g$ pelletiert und das frische Kulturmedium (mit IL-2, jedoch ohne PHA) aufgenommen. Die Zellzahl wurde noch mal auf 2×10^6 Zellen/ml aufgestellt (siehe 2.2.4.2) und eine definierte Anzahl der PBMCs wurde mit zwei HIV-1 Stämme, HIV-1_{Ba-L} (CCR5-trop) und HIV-1_{IIB} (CXCR4-trop) infiziert. Der Titer betrug $10^{7,9}$ Viruspartikel/ml. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei $50 \times g$. Dabei könnte es vorkommen, dass mehr Viren im Medium durch Zentrifugation auf die Oberflächen der Zellen landen und somit mehr Zellen mit Viren infiziert werden. Danach wurden die jeweils 4×10^6 Zellen in eine T25-Zellkulturflasche (TPP, Trasdingen, Schweiz) verteilt und bis zu den jeweiligen definierten Messpunkten kultiviert.

Parallel dazu wurden die PBMCs ohne Vorstimulierung mit HIV-1_{III B} infiziert, um Effekte von IL-2 und PHA auf die Expression der Gene in PBMCs auszuschließen. Dazu wurden frisch isolierten PBMCs, wie oben geschrieben, mit HIV-1_{III B} infiziert und in RPMI-Medium ohne IL-2 sowie PHA kultiviert.

Die genaue Anzahl der PBMCs sowie der Viruspartikel, und die Kultivierungszeiten für jeden Infektionsversuch sind im Ergebnisteil angegeben.

2.2.4.4 Kultivierung von Mv1Lu

Zur Kultivierung der Nerzlungenepithel-Zelllinie Mv1Lu (ATCC, USA) wurden 10 cm² Kulturschalen (TPP, Trasadingen, Schweiz) verwendet und als Kulturmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 10 % (v/v) FKS, 100 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES und 4 mM Glutamin verwendet. Alle 2 - 3 Tagen wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS „ohne“ gewaschen. Um die Zellen von der Zellkulturflasche abzulösen, wurden sie mit 0,25 % Trypsin (w/v) benetzt und zur Unterstützung der enzymatischen Reaktion für 1 min bei 37 °C inkubiert. Durch anschließendes leichtes Klopfen an die Kulturschale wurden die Zellen gelöst und durch Zugabe von Zellkulturmedium wurde die Trypsinierung gestoppt. Folglich wurden die Zellen für 3 min bei 250 × g abzentrifugiert, das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in entsprechender Verdünnung auf neue Kulturschalen überführt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung einer One-Step real time RT-PCR zur Quantifizierung der Expression verschiedener zellulärer Gene

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression wurden One-Step Reverse-Transkriptase real time PCR (real time RT-PCR) -Systeme als Duplex mit GAPDH angewendet (siehe 2.2.1.7). Die PCR-Systeme für IL-10, TREM-1, MMP-1 waren etabliert (Lauck, 2008), die für TREM-2, CXCL-9, FCN1 und IL-6 wurden neu aufgebaut. Alle Auswertungen außer denen für TREM-1 und TREM-2 erfolgten nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Livak und Schmittgen (2001).

3.1.1 Optimierung der PCR-Konditionen mittels Gradienten-PCR

Um die optimale Annealingtemperatur für die jeweiligen Primerpaare von TREM-2, FCN1, IL-6 experimentell zu bestimmen, wurde Gradienten-PCR durchgeführt (siehe 2.2.1.6). Zusätzlich dazu wurde ebenfalls der optimale Temperaturbereich für das GAPDH-Primerannealing ermittelt, da alle real time RT-PCRs als Duplex mit GAPDH durchgeführt wurden. Allerdings sind die Amplifikate auf PCR (zelluläre DNA als Matrize, die Introns enthält) länger als die durch real time RT-PCR (cDNA als Matrize) gewonnenen. Dementsprechend wurde die Elongationszeit bei der PCR berücksichtigt und folgende Elongationszeit wurde ermittelt: TREM-2 (1577 bp), 1 min 45 s; IL-6 (1139 bp), 1 min 20 s; FCN1 (552 bp), 45 s; GAPDH (239 bp), 30 s. Für CXCL-9 konnte keine Gradienten-PCR durchgeführt werden, da der fwd-Primer im *exon junction* Bereich liegt. So konnten DNA-Kontaminationen automatisch ausgeschlossen werden. Der Gradient der Annealingtemperatur wurde zwischen 50 °C und 65 °C gewählt, die optimale Temperatur wurde nach der durchgeführten Gelelektrophorese anhand optimaler Ergebnisse im Agarosegel ermittelt.

Exemplarisch wird eine Gradienten-PCR Analyse von TREM-2 dargestellt (Abbildung 3.1A). Ab einer Temperatur von 58,3 °C (Spur 7) nahm die Intensität der Banden zu, gleichzeitig konnten keine unspezifischen Banden detektiert werden. Als optimale Annealingtemperatur für die TREM-2 Primerpaare wurde somit 60 °C bestimmt. Für FCN1 und IL-6 wurde ebenfalls 60 °C als optimale Annealingtemperatur ermittelt (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren erlaubt eine Annealingtemperatur zwischen 56,2 °C und 60,2 °C (Spur 6 - 8) spezifische GAPDH-Amplifikate (Abbildung 3.1B).

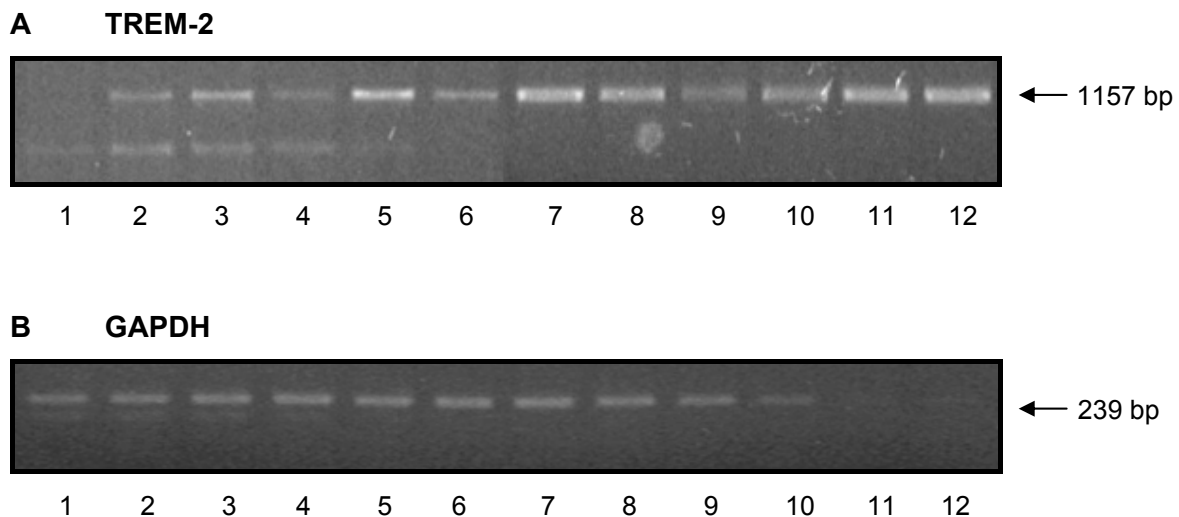


Abbildung 3.1: Gradienten-PCR Analyse zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur

(A) PCR-Amplifikate mit TREM-2 Primerpaaren (2 %iges Agarosegel) und (B) GAPDH Primerpaaren (1 %iges Agarosegel). Zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur für Primerpaare wurde eine Gradienten-PCR mit 100 - 200 ng DNA durchgeführt und die PCR-Amplifikate auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Annealingtemperatur ist in Spur 1: 49,8 °C; 2: 50,2 °C; 3: 51,1 °C; 4: 52,5 °C; 5: 54,3 °C; 6: 56,2 °C; 7: 58,3 °C; 8: 60,2 °C; 9: 62 °C; 10: 63,5 °C; 11: 64,6 °C; 12: 65,1 °C.

3.1.2 Etablierung einer Duplex real time RT-PCR

Um die real time RT-PCR für TREM-2, CXCL-9, FCN1 und IL-6 als Duplex mit GAPDH zu etablieren, wurden vorab mögliche Primerinterferenzen überprüft. Dabei wurden real time RT-PCRs einmal mit dem einzelnen Primerpaar für das zu untersuchende Gen und einmal für das GAPDH einzeln sowie für beide Primerpaaren zusammen (als Duplex) durchgeführt. Die jeweiligen Zyklusanzahlen, die den Schwellenwert (CT) überschritten haben, wurden miteinander verglichen (Abbildung 3.2). Bei der Duplex real time RT-PCR für IL-6 wurde kein Auftreten einer Primerinterferenz beobachtet. Im Unterschied dazu zeigten die CT-Werte von TREM-2, CXCL-9 und FCN1 Unterschiede bei dieser Analyse. Bei den jeweiligen Duplex Analysen wurden die CT-Werte von GAPDH ebenfalls mit einem ähnlichen Niveau wie die von TREM-2, CXCL-9 und FCN1 verändert. Da bei der Auswertung alle CT-Werte des untersuchten Gens mit den Werten von GAPDH normalisiert wurden, konnten diese Primerpaare für Duplex real time RT-PCR Analysen weiter verwendet werden.

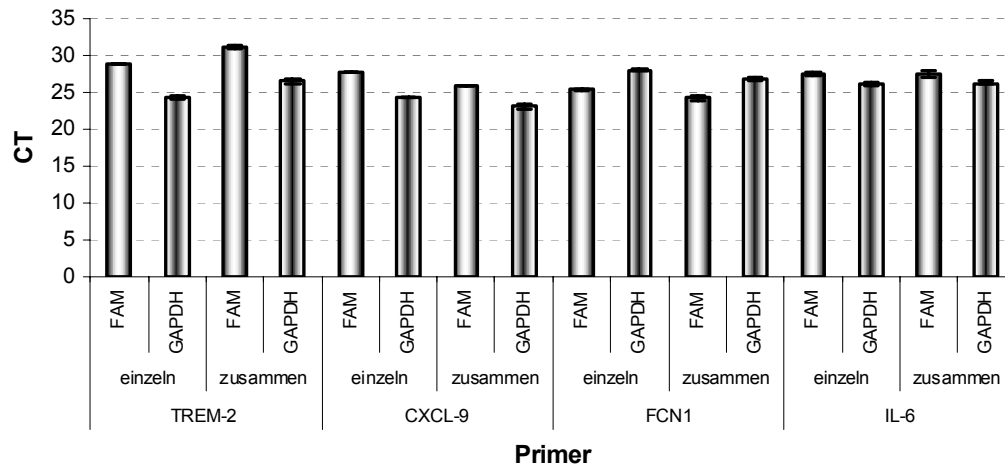


Abbildung 3.2: Untersuchungen zum Auftreten von Primerinterferenzen bei der Duplex real time RT-PCR

Es wurden One-Step real time RT-PCRs einmal mit einem Primerpaar allein (einzeln) und einmal mit den beiden Primerpaaren (zusammen) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD. FAM: FAM-Fluorochrom gekoppeltes zu untersuchendes Gen.

3.1.3 Effizienzbestimmung der real time RT-PCR

Die Primerpaare und die Sonde für TREM-2 wurden mit Hilfe des „Primer3Plus“ Programms entwickelt. Daher wurden die Primereffizienzen von TREM-2 (Target-Gen) und GAPDH (Referenz-Gen) bei der One-Step Duplex real time RT-PCR anhand einer Standardkurve bestimmt. Die eingesetzte Menge an RNA wird in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl dem CT dargestellt (Abbildung 3.3). Unter Zuhilfenahme der Formel (siehe 2.2.1.7) konnte eine Effizienz (E) von 85,6 % für TREM-2 und 86,8 % für GAPDH bestimmt werden. Da die Amplifikationseffizienzen für TREM-2 und GAPDH annähernd übereinstimmten, konnten diese Primerpaare in Duplex real time RT-PCR weiter eingesetzt werden und die relative Genexpression von TREM-2 bezogen auf GAPDH quantifiziert werden.

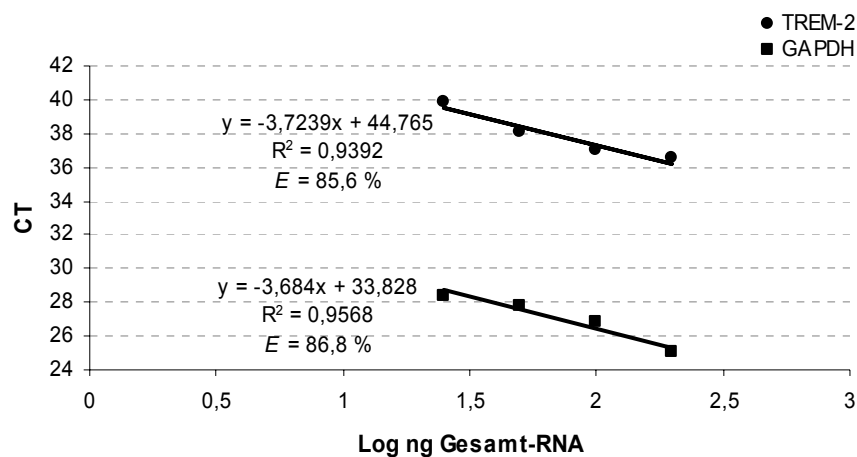


Abbildung 3.3: Standardkurve zur Ermittlung der TREM-2/GAPDH Primereffizienz für One-Step Duplex real time RT-PCR

Eine Verdünnungsreihe mit aus PBMCs isolierter Gesamt-RNA (200, 100, 50 und 25 ng) wurde in Zweischritten hergestellt und bei einer One-Step TREM-2/GAPDH Duplex real time RT-PCR verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD. E = Effizienz.

3.2 Charakterisierung der Peptid-Homopolymere

Das HIV-1 ISU-Peptid, das von der ISU-Domäne des TM-Proteins gp41 von HIV-1 abgeleitet ist, wurde synthetisch hergestellt. Das randomisierte Peptid (RAN-Peptid) weist dieselben Aminosäuren wie das ISU-Peptid auf, jedoch in zufälliger Reihenfolge. Die allen in der Arbeit verwendeten HIV-ISU-Peptide wurden nach der Synthese nicht modifiziert und enthielten somit eine C-terminale COOH-Gruppe. Währenddessen wurden die HIV-RAN-Peptide einmal nicht modifiziert und einmal amidiert (siehe Tabelle 2.1). Die Reinheit und Qualität der synthetisch hergestellten Peptide wurden von der Firma mittels HPLC und MALDI-TOF-MS analysiert. Dabei wurde eine Reinheit von $> 80 - 90\%$ garantiert. Auf Grund des hohen Anteils hydrophober Aminosäuren sind die Peptide in der Regel bedingt in Wasser löslich. Die Peptide der Firma JPT (HIV-ISU: K209, K210 und K221; HIV-RAN: K211, K212 und K222) waren jedoch deutlich weniger wasserlöslich und sind nach der Polymerisierung ausgefallen.

Da das HIV-1 ISU-Peptid nur einen immunsuppressiven Effekt hervorruft, wenn es an ein Trägermolekül gebunden wurde (Denner *et al.*, 1994), wurden die eingesetzten Peptide mittels EDC zu Homopolymeren gekoppelt, um eine biologisch aktive Konformation zu erlangen (siehe 2.2.2.1). Die Kopplungsausbeute lag durchschnittlich bei 20%, die Konzentration wurde nach Pierce ermittelt (siehe 2.2.2.2). Die gekoppelten HIV-ISU- bzw.

HIV-RAN-Homopolymere wurden mittels SDS-PAGE dargestellt und mittels einer Western Blot Analyse charakterisiert (Abbildung 3.4). Die exemplarisch dargestellten HIV-ISU-Homopolymere, K209 und K210, sowie die HIV-RAN-Homopolymere, K211 und K212, enthielten alle COOH-Gruppe am C-Terminus.

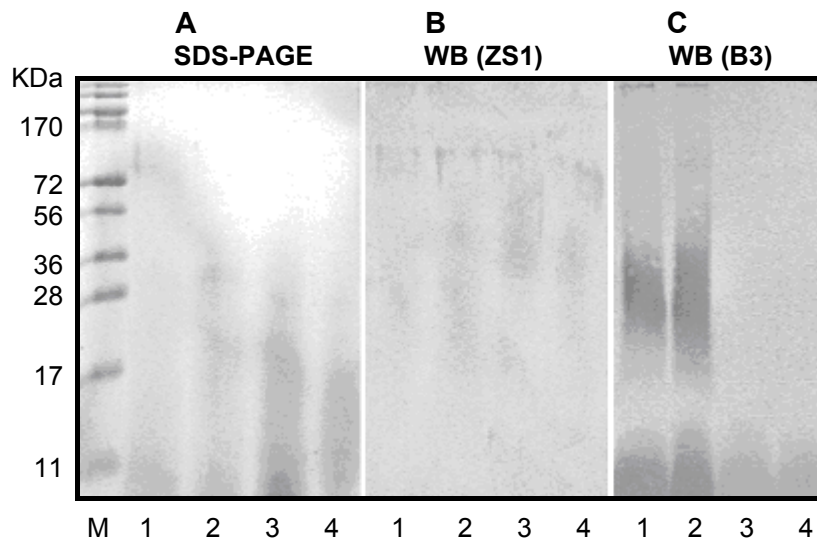


Abbildung 3.4: Exemplarische Darstellung der Peptid-Homopolymere mittels SDS-PAGE und Western Blot

Das Coomassie-gefärbte SDS-Gel (A) und die Western Blot Analyse (B und C) eines HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymers (10 µg/ml) sind dargestellt. Als primärer Antikörper wurden bei B, ZS1 (1:250) und bei C, B3 (1:2) eingesetzt. M: Marker; 1: K209 (HIV-ISU); 2: K210 (HIV-ISU); 3: K211 (HIV-RAN); 4: K212 (HIV-RAN).

Die berechnete Größe des monomeren Peptids beträgt 2,3 kDa. Anhand des SDS-Gels konnten niedermolekulare Polymere mit unterschiedlichen Polymerisationsstufen als Schmierband gezeigt werden. Die hochmolekularen Strukturen konnten auf Grund ihrer geringen Konzentration erst durch die Western Blot Analyse detektiert werden. Der Unterschied zwischen den ISU- und RAN-Homopolymeren konnte ebenfalls charakterisiert werden. Dafür wurden zwei unterschiedlich hergestellte primäre Antikörper verwendet. Das ZS1 ist ein spezifisches Antiserum der Ziege¹, die mit dem ISU-Peptid, gebunden an das Trägermolekül KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) immunisiert worden war. Es reagiert überwiegend mit hochmolekularen HIV-ISU-Polymeren, allerdings ebenso mit RAN-Homopolymeren. Der monoklonale Maus-Antikörper B3 wurde nach Immunisierung mit dem HIV-ISU-Peptid, gekoppelt an BSA, gewonnen. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnten nur hochmolekulare HIV-ISU-Polymere detektiert werden.

3.3 Einfluss der HIV-ISU- und HIV-RAN-Homopolymere auf die IL-10 Produktion humaner PBMCs *in vitro*

In früheren Arbeiten wurde beobachtet, dass die Qualität der HIV-ISU-Homopolymere im Bezug auf die IL-10 Induktionsstärke je nach Kopplungsansatz und Spender der PBMCs unterschiedlich ist. Daher wurde vor der jeweiligen Kinetik ein Vorversuch durchgeführt, um die Funktionalität der einzusetzenden Charge der hergestellten Homopolymere zu bestimmen. Hierzu wurden die PBMCs mit unterschiedlichen Chargen der Polymeren (50, 25, 12,5 und 6,2 µg/ml) für 24 h inkubiert und mittels ELISA wurden die IL-10 Konzentration im Zellkulturüberstand gemessen (Abbildung 3.5). Als optimale Konzentration für die allen Kinetiken wurde 25 µg/ml bestimmt.

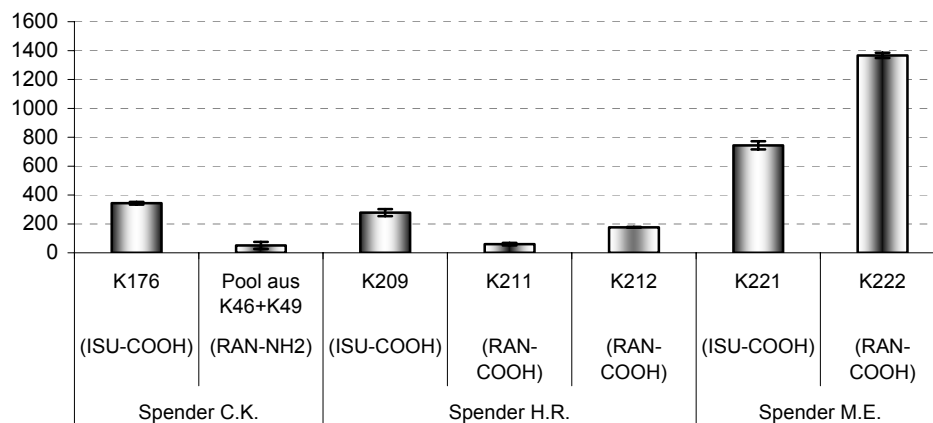
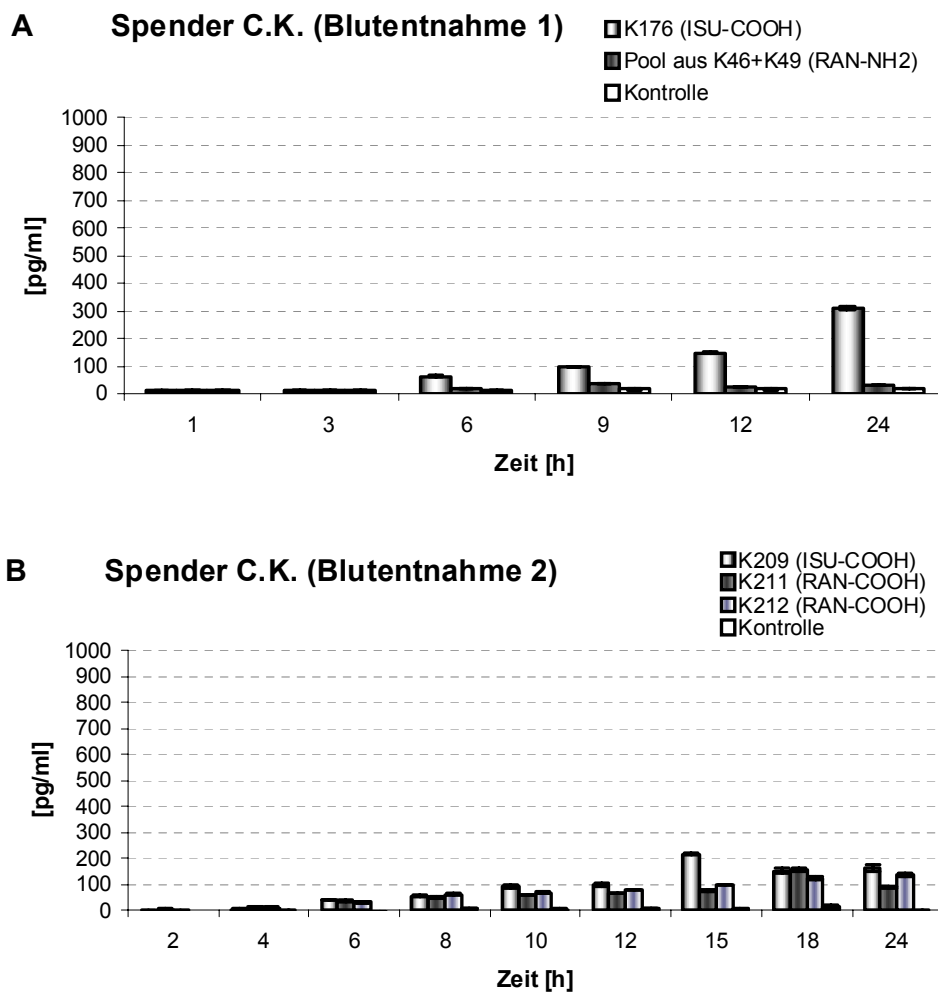


Abbildung 3.5: Analyse der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach einer 24-stündigen Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren mittels ELISA

PBMCs von drei verschiedenen gesunden Spendern (C.K., H.R. und M.E.) wurden mit 25 µg/ml HIV-ISU-Homopolymer (K176, K209 und K221) bzw. 25 µg/ml HIV-RAN-Homopolymer (Pool aus K46 + K49, K211, K212 und K222) für 24 h inkubiert, die Konzentration an IL-10 im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten ± SD. ISU- bzw. RAN-COOH: HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymer mit COOH-Gruppe am C-Terminus; RAN-NH2: HIV-RAN-Homopolymer mit NH₂-Gruppe am C-Terminus.

Um den Einfluss von HIV-ISU-Homopolymeren auf die IL-10 Expression genauer zu untersuchen, wurden PBMCs von zwei gesunden Spendern mit den ISU-Homopolymeren behandelt und drei Kinetiken mit 6 - 9 Messpunkten über einen Zeitraum von 24 h durchgeführt. Bei dem Spender C.K. erfolgte die Blutspende an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (Blutentnahme 1 und 2). Die Veränderung der IL-10 Expression wurde sowohl auf Protein-Ebene mittels ELISA (siehe 2.2.3.1) als auch auf mRNA-Ebene mittels real time RT-PCR (siehe 2.2.1.7) untersucht. Parallel wurden die PBMCs mit HIV-RAN-Homopolymeren bzw. nur mit Medium inkubiert.

Nach Inkubation der PBMCs von Spender C.K. (Blutentnahme 1) mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K176 mit COOH am C-Terminus), stieg die IL-10 Sekretion ab 6 h kontinuierlich an und erreichte nach 24 h ein Maximum von 310 pg/ml. Die Inkubation der PBMCs mit dem RAN-Homopolymer (Pool aus K46 + K49 mit NH₂ am C-Terminus), zeigte wie unbehandelte Zellen keine signifikante Änderung in der IL-10 Sekretion, wobei nur eine geringfügige IL-10 Konzentration bei maximal 30 pg/ml gemessen wurde (Abbildung 3.6A).



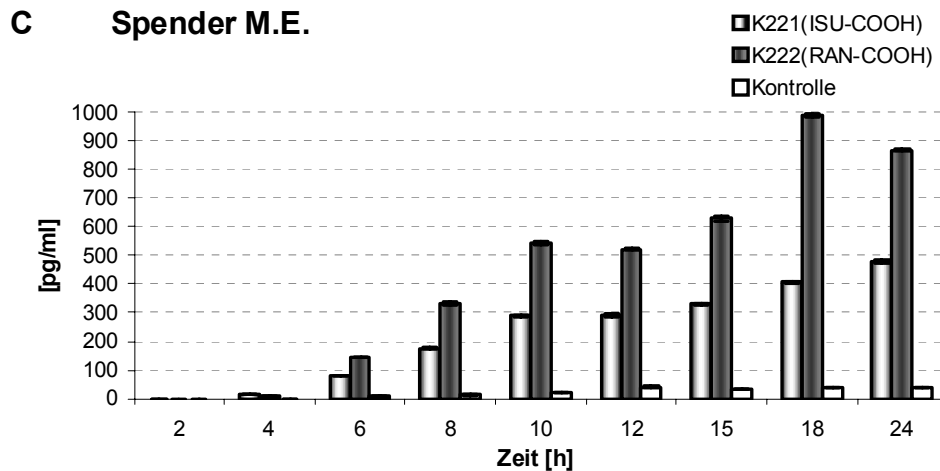


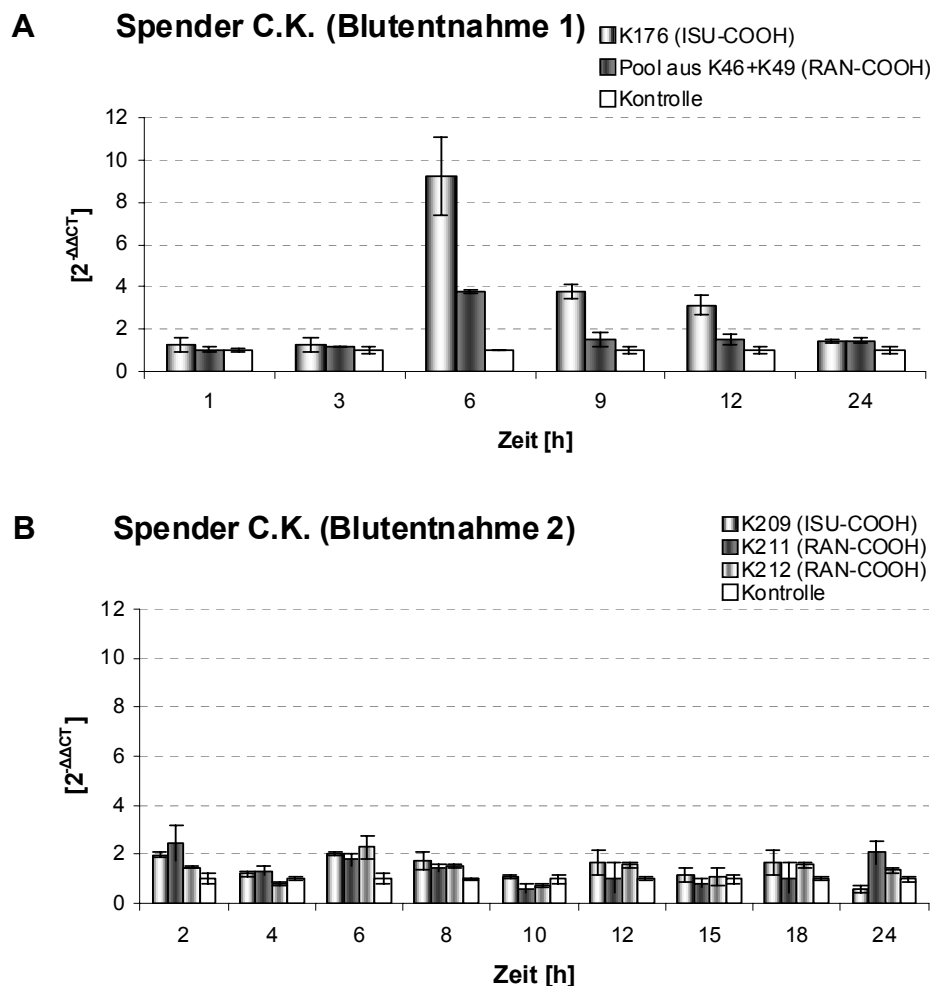
Abbildung 3.6: Analyse der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels ELISA

PBMCs von zwei verschiedenen gesunden Spendern (C.K.: A und B; M.E.: C) wurden mit 25 µg/ml HIV-ISU-Homopolymer (K176, K209 und K221) bzw. 25 µg/ml HIV-RAN-Homopolymer (Pool aus K46 + K49, K211, K212 und K222) inkubiert, die Konzentration an IL-10 im Zellkulturüberstand wurde über einen Zeitraum von 24 h an sechs (A) bzw. neun (B und C) Messpunkten mittels ELISA gemessen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten ± SD.

Die PBMCs desselben Spenders C.K., allerdings zu einem späteren Zeitpunkt (Blutentnahme 2), wurden mit einem anderen ISU-Homopolymer (K209 mit COOH am C-Terminus) und zwei RAN-Homopolymeren (K211 und K212 mit jeweils COOH am C-Terminus) inkubiert. In dieser Kinetik wurden zwei unterschiedliche RAN-Homopolymere, die beim Vorversuch mit PBMCs von H.R. unterschiedlich starke IL-10 Induktionen hervorriefen (siehe Abbildung 3.5), verwendet. Die Kinetik wurde ebenfalls über einen Zeitraum von 24 h, jedoch mit 9 Messpunkten durchgeführt (Abbildung 3.6B). Nach der Inkubation mit dem ISU-Homopolymer (K209) zeigte die Sekretion von IL-10 eine kontinuierliche Zunahme und erreichte eine maximale Konzentration von 220 pg/ml nach 15 h. Danach erfolgte eine Abnahme auf einen Wert von 160 pg/ml und verblieb dann auf diesem Niveau bis 24 h. Die HIV-RAN-Homopolymere (K211 und K212) lösten ebenfalls eine IL-10 Sekretion aus. Die Inkubation mit dem Homopolymer K211, der im Vorversuch keinen signifikanten Anstieg der IL-10 Sekretion induzierte (siehe Abbildung 3.5), führte zu einem Maximum des IL-10 Gehaltes von 154 pg/ml nach 18 h und danach zu einer leichten Abnahme. Die Inkubation der PBMCs mit dem Homopolymer K212, die beim Vorversuch eine deutlich höhere IL-10 Sekretion als die mit K211 induzierte, zeigte in dieser Kinetik eine ähnlich vergleichbare Auswirkung wie K211 auf die IL-10 Sekretion, allerdings einen kontinuierlichen Anstieg bis auf ein Maximum von 140 pg/ml nach 24 h.

Die PBMCs des Spenders M.E. zeigten eine starke IL-10 Freisetzung im Unterschied zu den anderen Spendern. Vor allem löste das RAN-Homopolymer (K222 mit COOH am C-Terminus) eine stärkere IL-10 Antwort als das ISU-Homopolymer (K221 mit COOH am C-Terminus) aus. Die IL-10 Sekretion der mit K221 inkubierten PBMCs erreichte ein Maximum von 480 pg/ml nach 24 h und der mit K222 inkubierten Zellen 990 pg/ml nach 18 h (Abbildung 3.6C).

Obwohl bei den Kinetiken eine ansteigende IL-10 Sekretion auf Protein-Ebene bei den mit den HIV-ISU-Homopolymeren inkubierten PBMCs beobachtet werden konnte, war aber IL-10 unter den hochregulierten Genen im Microarray nicht detektiert worden. Da der Microarray das Genexpressionsmuster auf der mRNA-Ebene nach 24 h gemessen hat, sollte der zeitliche Verlauf der IL-10 Expression auf RNA-Ebene genauer untersucht werden.



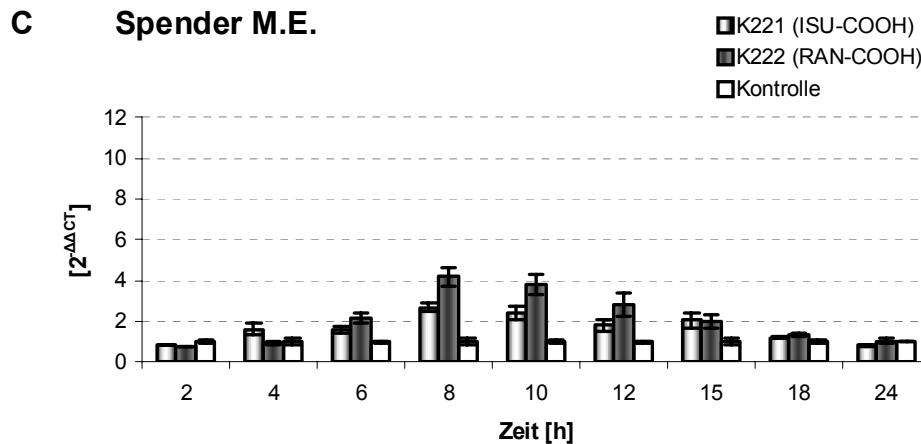


Abbildung 3.7: Kinetik der IL-10 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels real time RT-PCR

PBMCs von zwei verschiedenen gesunden Spendern (C.K.: A und B; M.E.: C) wurden mit 25 µg/ml HIV-ISU-Homopolymer (K176, K209 und K221) bzw. 25 µg/ml HIV-RAN-Homopolymer (Pool aus K46 + K49, K211, K212 und K222) inkubiert und die Expression wurde über einen Zeitraum von 24 h an sechs (A) bzw. neun (B und C) Messpunkten gemessen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten ± SD.

Nach einer 6-stündigen Inkubation der PBMCs von Spender C.K. (Blutentnahme 1) mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K176) wurde eine deutliche Erhöhung der IL-10 Expression um den Faktor 9,5 beobachtet (Abbildung 3.7A). In der Folge nahm die Expression ab, bis sie nach 24 h wieder das Ausgangsniveau erreichte. Bei der Inkubation mit dem HIV-RAN-Homopolymer (Pool aus K46 + K49) wurde eine 3,5-fache Erhöhung ebenfalls nach 6 h beobachtet.

Bei der Inkubation der PBMCs von Spender C.K. zu einem späteren Zeitpunkt (Blutentnahme 2) mit einem anderen HIV-ISU-Homopolymer (K209) sowie anderen HIV-RAN-Homopolymeren (K211 und K212) ergab sich ein anderes Genexpressionsmuster (Abbildung 3.7B). Es war keine signifikante IL-10 Erhöhung bei der Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer zu beobachten. Zwischen dem ISU-Homopolymer und zwei RAN-Homopolymeren zeigte IL-10 Expression ebenfalls keinen signifikanten Unterschied, während deren IL-10 Sekretionen im Vorversuch unterschiedlich waren (siehe Abbildung 3.5). Diese Beobachtungen korrelierten mit der IL-10 Konzentration auf der Protein-Ebene im Zellkulturüberstand (siehe Abbildung 3.6B).

Bei dem Spender M.E. hat nach Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K221) die IL-10 Expression kontinuierlich zugenommen und war nach 8 h um den Faktor 1,5 erhöht (Abbildung 3.7C). Danach erfolgte eine kontinuierliche Abnahme bis auf das Ausgangsniveau. Wie im Vorversuch auf die Protein-Ebene beobachtet (siehe Abbildung 3.5)

löste das HIV-RAN-Homopolymer (K222) eine stärkere IL-10 Expression als das ISU-Homopolymer mit einer maximalen Hochregulation um das 4,2-fache aus.

Die drei Kinetiken mit den jeweiligen verschiedenen HIV-ISU-Homopolymeren und PBMCs von den zwei unterschiedlichen Spendern konnten zeigen, dass die Expression von IL-10 6 - 8 h nach der Inkubation mit den Peptiden am höchsten ist. Das HIV-RAN-Homopolymer, das als negative Kontrolle dienen sollte, löste ebenfalls sehr unterschiedliche IL-10 Antworten aus. Vor allem zeigte das Homopolymer mit COOH-Ende am C-Terminus (K211, K212 und K222) im Vergleich zu dem RAN-Homopolymer mit NH₂-Ende am C-Terminus (K46 und K49) eine signifikant hohe Expression von IL-10.

3.4 Einfluss von HIV-ISU- und HIV-RAN-Homopolymeren auf die Expressionen verschiedener zellulärer Gene in humanen PBMCs *in vitro*

In einem von der Arbeitsgruppe durchgeführten Microarray konnte gezeigt werden, dass HIV-ISU-Polymere in der Lage sind, die Expression von 361 Genen herunterzuregulieren. Unter den 25 am stärksten herunterregulierten Genen fanden sich TREM-2, CXCL-9 und FCN1 (siehe Abbildung 1.9). Des Weiteren wurde im Microarray die Hochregulation von 385 Genen detektiert. IL-6, MMP-1 und TREM-1 befanden sich unter den 25 am stärksten hochregulierten Genen (Lauck, 2008). Um diese im Microarray detektierten Herunter- sowie Hochregulation der Gene durch das HIV-ISU-Peptid in PBMCs genauer zu untersuchen, wurden Kinetiken über einen Zeitraum von 24 h (Ausnahme bei der Kinetik von FCN1: über 9 h) mit PBMCs von den verschiedenen gesunden Spendern und mit unterschiedlichen HIV-ISU- sowie HIV-RAN-Homopolymeren durchgeführt, und per One-Step Duplex real time RT-PCRs deren Genexpressionsmuster analysiert.

3.4.1 Einfluss auf die Expression von TREM-2, CXCL-9 und FCN1 in humanen PBMCs *in vitro*

TREM-2

Bei TREM-2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) handelt es sich um einen Immunrezeptor, der auf Makrophagen und Mikroglia exprimiert wird (Colonna *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007). Bei einer Lipopolysaccharid (LPS) -Stimulation wurde eine Herunterregulation von TREM-2 und eine Hochregulation von TREM-1 gezeigt (Bouchon *et*

al., 2001; Turnbull *et al.*, 2006). Eine entsprechende Veränderung der Genexpressionen konnte bei den ISU-Peptiden im Microarray beobachtet werden. Diese im Microarray beobachteten antagonistischen Unterschiede in der Expression von TREM-2 gegenüber TREM-1 wurde im Rahmen einer Kinetik über einen Zeitraum von 24 h mit Hilfe real time RT-PCR Analyse genauer untersucht.

Dabei konnte die TREM-2 Expression im Vergleich zu den anderen Genexpressionen nicht nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Livak und Schmittgen quantifiziert werden (2001). Nach dieser Methode ergeben sich ΔCT -Werte aus der Subtraktion des in der Regel konstant bleibenden GAPDH CT-Wertes und des CT-Wertes vom untersuchenden Gen. Bei der weiteren Auswertung beziehen sich die ΔCT -Werte, von den mit den Peptiden behandelten PBMCs auf die ΔCT -Werte der unbehandelten Zellen, die normalerweise im Verlauf der Kinetik relativ konstant bleiben. In der vorliegenden Kinetik wurde aber beobachtet, dass die ΔCT -Werte (GAPDH CT - TREM-2 CT) der Expression in den unbehandelten PBMCs nicht konstant blieben. Daher wurden die ΔCT -Werte der Expression in den mit Peptiden behandelten Zellen nicht auf die Werte von den unbehandelten Zellen bezogen, sondern einzeln dargestellt (Abbildung 3.8).

Spender C.K.

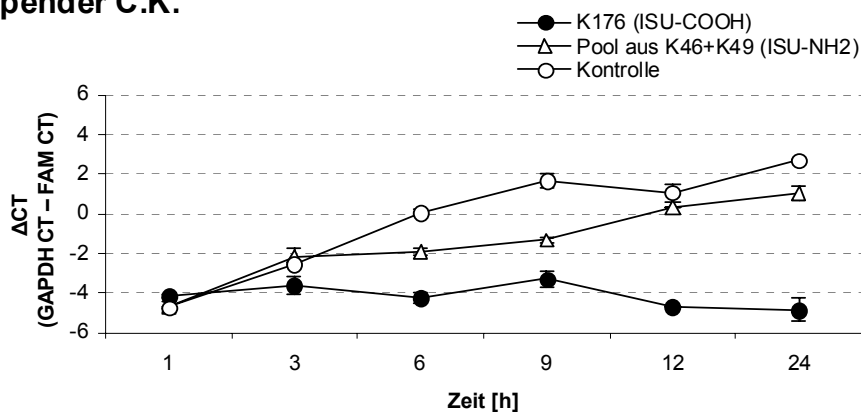


Abbildung 3.8: Kinetik der TREM-2 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels real time RT-PCR

PBMCs von einem gesunden Spender (C.K.) wurden mit 25 $\mu\text{g/ml}$ HIV-ISU-Homopolymer (K176) bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ HIV-RAN-Homopolymer (Pool aus K46 + K49) inkubiert, die Expression wurde über einen Zeitraum von 24 h an sechs Messpunkten gemessen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

Die ΔCT -Werte von unbehandelten PBMCs zeigten einen kontinuierlichen Anstieg eines Wertes von -4,8 nach 1 h bis auf +2,8 nach 24 h. Bei den mit dem HIV-RAN-Homopolymer (Pool aus K46 + K49) inkubierten Zellen war ebenfalls ein vergleichbarer Anstieg der ΔCT -Werte zu beobachten, von einem Wert von -4,7 nach 1 h bis auf +1,1 nach 24 h.

Währenddessen behielten die ΔCT -Werte der mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K176) inkubierten PBMCs über 24 h einen konstanten Wert von -3,7 bis -4,7.

Mit Hilfe der Kinetik konnte gezeigt werden, dass die Expression von TREM-2 in PBMCs nach der Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer immer konstant blieb, während sie bei unbehandelten PBMCs stets zunahm.

CXCL-9

CXCL-9 gehört zu Chemokinen und wird im Rahmen einer Entzündungsreaktion vor allem von Makrophagen produziert. Mit Hilfe einer Kinetik über einen Zeitraum von 24 h wurde die im Microarray beobachtete Herunterregulation von CXCL-9 Expression nach der Inkubation mit den Peptiden genauer untersucht. Eine Herabsetzung der CXCL-9 Sekretion durch das ISU-Peptid wurde ebenfalls bei den Zytokinarrays beobachtet. Bei den PBMCs des Spenders C.K. wurde nach der Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K176) eine Hochregulation der CXCL-9 Expression nach 6 h um einen Faktor von 11,5 beobachtet (Abbildung 3.9). Nach 9 h sank die Genexpression schnell auf den Wert wie bei den unbehandelten Zellen. Dem folgte eine 4,2-fache leichte Erhöhung der Expression nach 24 h. Im Vergleich dazu zeigte die Inkubation mit dem HIV-RAN-Homopolymer (Pool aus K46 + K49) eine 3,5-fache Erhöhung der Genexpression von CXCL-9 nach 6 h.

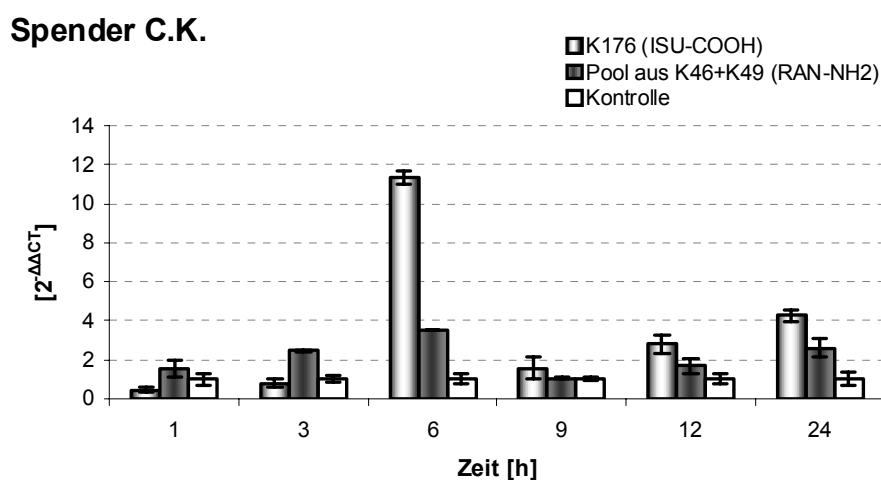


Abbildung 3.9: Kinetik der CXCL-9 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels real time RT-PCR

PBMCs von einem gesunden Spender (C.K.) wurden mit 25 $\mu\text{g/ml}$ HIV-ISU-Homopolymer (K176) bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ HIV-RAN-Homopolymer (Pool aus K46 + K49) inkubiert, die Expression wurde über einen Zeitraum von 24 h an sechs Messpunkten gemessen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

Die im Mikroarray detektierte Herunterregulation der CXC-9 Expression nach 24 h konnte hier nicht bestätigt werden. Im Gegenteil wurde eine Hochregulation der CXCL-9 Expression nach 6 h beobachtet.

FCN1

FCN1 (*collagen/fibrinogen domain containing 1*) ist ein mustererkennendes Molekül (*pattern recognition molecule*) des Komplementsystems und wird vorwiegend in PBMCs exprimiert (Honore *et al.*, 2008). Für die FCN1 Expression wurde im Microarray durch das HIV-ISU-Polymer die stärkste Herunterregulation induziert (siehe Abbildung 1.9). Das Genexpressionsmuster von FCN1 wurde mit Hilfe einer Kinetik über einen Zeitraum von 9 h untersucht (Abbildung 3.10).

Um die Daten im Bezug auf eine Herunterregulation deutlich zu machen, wurden die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte in prozentuale Angaben umgerechnet.

Spender C.K.

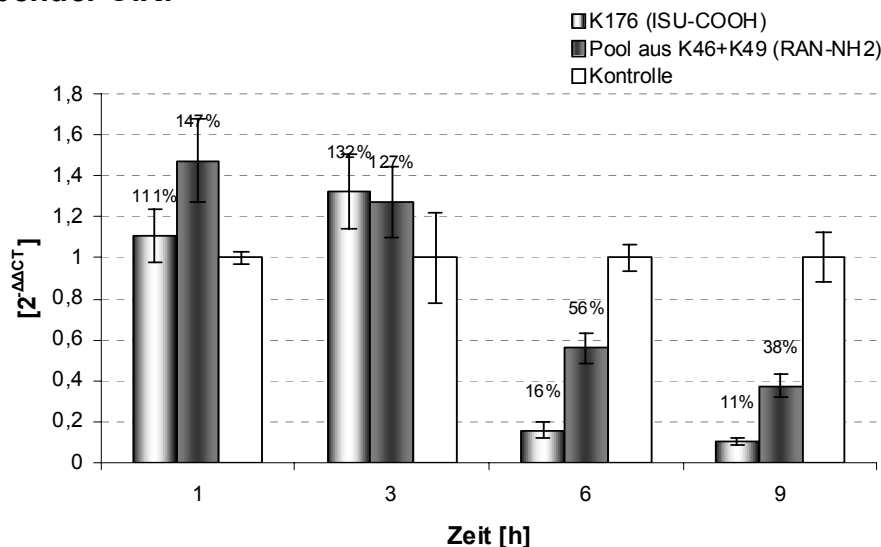


Abbildung 3.10: Kinetik der FCN1 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 9 h mittels real time RT-PCR

PBMCs von einem gesunden Spender (C.K.) wurden mit 25 $\mu\text{g/ml}$ HIV-ISU-Homopolymer (K176) bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ HIV-RAN-Homopolymer (Pool aus K46 + K49) inkubiert, die Expression wurde über einen Zeitraum von 9 h an vier Messpunkten gemessen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD mit prozentualen Angaben.

Bei den mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K176) inkubierten PBMCs wurde eine Herunterregulation der FCN1 Expression nach 6 h bis auf 16 %, nach 9 h auf 11 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen detektiert. Im Vergleich dazu löste das HIV-RAN-

Homopolymer (Pool aus K46 + K49) eine leichte Herunterregulation aus, nach 6 h auf 56 % und nach 9 h auf 38 %.

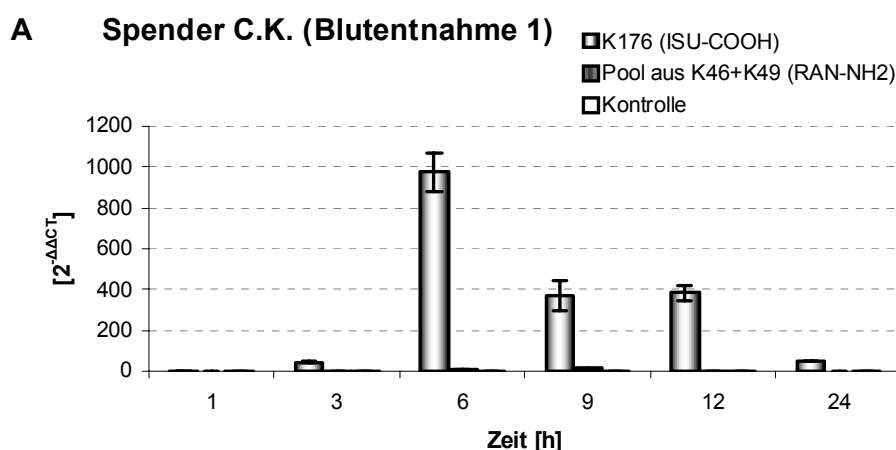
Mit Hilfe der Kinetik konnte gezeigt werden, dass die FCN1 Expression durch das HIV-ISU-Peptid herunterreguliert wurde.

3.4.2 Einfluss auf die Expression von IL-6, TREM-1 und MMP-1 in humanen PBMCs *in vitro*

IL-6

IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin und wurde im Microarray als das am stärksten hochregulierte Gen detektiert. Eine Hochregulation der IL-6 Expression wurde auch bei HIV-1 infizierten Individuen (Cicala *et al.*, 2002; Woelk *et al.*, 2004) und in Experimenten mit rekombinantem gp41 von HIV-1 beschrieben (Takeshita *et al.*, 1995; Koutsonikolis *et al.*, 1997; Barcova *et al.*, 1998; Speth *et al.*, 2000).

Die Inkubation der PBMCs des Spenders C.K. (Blutentnahme 1) mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K176) führte nach 3 h zu einer Hochregulation von IL-6 um einen Faktor von 46 und erreichte nach 6 h die maximale Expression mit einer 980-fachen Hochregulierung (Abbildung 3.11A). Dem folgte eine schnelle Abnahme der Expression bis auf dem Faktor 380 zwischen 9 - 12 h und dem Faktor 54 nach 24 h. Im Vergleich dazu zeigten die PBMCs nach der Inkubation mit dem HIV-RAN-Homopolymer (Pool aus K46 + K4) nach 9 h nur eine 16-fache Erhöhung als Maximum.



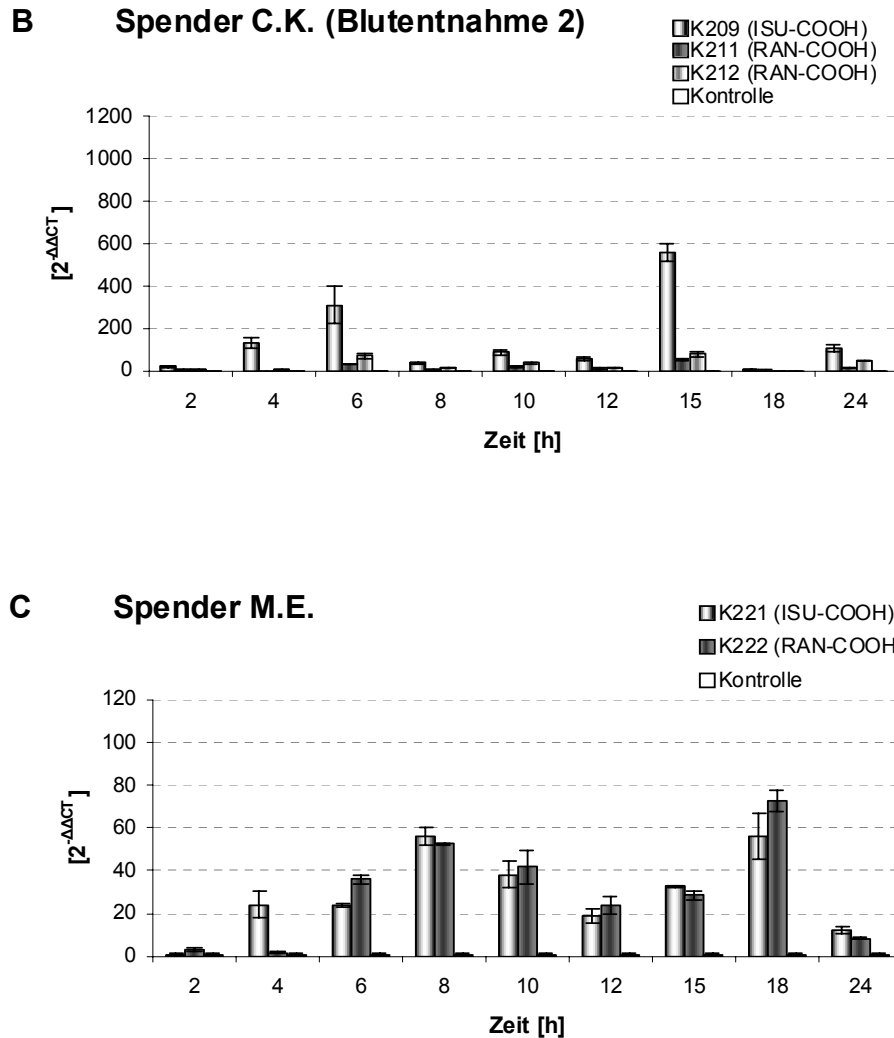


Abbildung 3.11: Kinetik der IL-6 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels real time RT-PCR

PBMCs von zwei verschiedenen gesunden Spendern (C.K.: A und B; M.E.: C) wurden mit 25 $\mu\text{g/ml}$ HIV-ISU-Homopolymer (K176, K209 und K221) bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ HIV-RAN-Homopolymer (Pool aus K46 + K49, K211, K212 und K222) inkubiert, die Expression wurde über einen Zeitraum von 24 h an sechs (A) bzw. neun (B und C) Messpunkten gemessen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

Die PBMCs des Spenders C.K. (Blutentnahme 2) zeigten nach der Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K209) eine kontinuierliche Zunahme der IL-6 Expression, bis nach 6 h eine 310-fache Hochregulation erreicht war (Abbildung 3.11B). Ähnlich wie beim Spender C.K. (Blutentnahme 1) zu beobachten war, senkte sich die IL-6 Expression innerhalb von 2 h bis auf dem Faktor von 37 schnell ab und wurde wieder nach 15 h um den Faktor von 560 hochreguliert. Nach 24 h zeigte sich weiter eine 107-fache Hochregulation. Bei den HIV-RAN-Homopolymeren (K211 und K212) konnte ein ähnliches Genexpressionsmuster wie bei dem ISU-Peptid beobachtet werden (K211: eine 30-fache Hochregulation nach 6 h und eine 52-fache nach 15 h; K222: eine 70-fache nach 6 h und eine 80-fache nach 15 h). Allerdings

sind bei der IL-6 Expression die Unterschiede zwischen den ISU- und RAN-Homopolymeren signifikant, obwohl bei der IL-10 Expression bei der selben Kinetik (siehe Abbildung 3.7B) keine Unterschiede zu beobachten waren.

Bei den PBMCs des Spenders M.E. zeigte sich für die IL-6 Expression bei der Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K221) ein vergleichbares Expressionsmuster, erste Hochregulation nach 8 h um einen Faktor von 60, schnelle Abnahme und zweite 60-fache Hochregulation nach 18 h (Abbildung 3.11C). Nach 24 h verringerte sich die Expression bis auf dem Faktor von 12. Im Vergleich mit der Kinetik mit den PBMCs von Spender C.K. (Blutentnahme 2) sind allerdings die zwei Peaks 3 h später zu beobachten. Wie beim IL-10 Expressionsmuster gezeigt wurde (siehe Abbildung 3.7C), war das HIV-RAN-Homopolymer (K222) auch biologisch aktiv und rief eine IL-6 Expression hervor, wobei sich kein Unterschied zu dem ISU-Homopolymer zeigte.

Beim Vergleich der IL-6 Expression in den drei Kinetiken, wird deutlich, dass das HIV-ISU-Homopolymer eine starke Hochregulation der IL-6 Expression induzierte. Das Expressionsmuster zeigte zwei Peaks: Den ersten in einem Zeitraum zwischen 6 h und 8 h; den zweiten zwischen 15 und 18 h.

TREM-1

TREM-1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 1*) befand sich im Microarray unter den 25 am stärksten hochregulierten Genen, während TREM-2 bei den herunterregulierten Genen zu finden war. In früheren Arbeiten von Lauck konnte gezeigt werden, dass die im Microarray beobachtete Hochregulation der TREM-1 Expression nicht durch die ISU-Homopolymer ausgelöst wurde, sondern durch die Herunterregulation unbehandelter PBMCs entstanden war (Lauck, 2008). Wie im vorangegangenen Kapitel bereits beschrieben, trugen die dafür verwendeten RAN-Peptide allerdings ein NH₂ am C-Terminus. Um diese Beobachtung weiter zu bestätigen wurde in der Arbeit eine Kinetik mit anderen Homopolymeren – einem HIV-ISU- (K209) und zwei HIV-RAN- (K211 und K212) – durchgeführt (Abbildung 3.12). Alle Peptide hatten eine C-terminale Carboxylgruppe.

Da die CT-Werte bei den unbehandelten Zellen nicht konstant blieben, wurden hier wie bei der Auswertung von TREM-2 die Δ CT-Werte einzeln dargestellt.

Spender C.K.

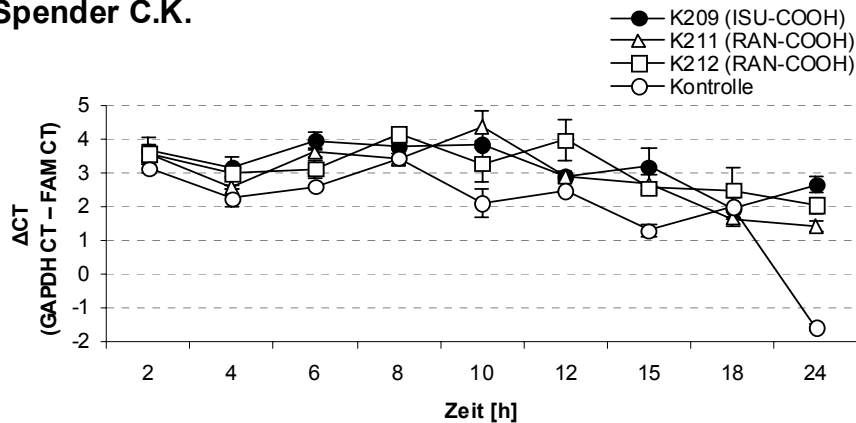


Abbildung 3.12: Kinetik der TREM-1 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels real time RT-PCR

PBMCs von einem gesunden Spender (C.K.) wurden mit 25 $\mu\text{g/ml}$ HIV-ISU-Homopolymer (K209) bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ HIV-RAN-Homopolymer (K211 und K212) inkubiert, die Expression wurde über einen Zeitraum von 24 h an neun Messpunkten gemessen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

Es zeigte sich, dass die Expressionen in den mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K209) inkubierten PBMCs über den 24-stündigen gesamten Verlauf der Kinetik einen relativ konstanten ΔCT -Wert von +3 bis +3,9 aufwiesen, allerdings ausgenommen der ΔCT -Wert von 18 h. Die Inkubation mit dem RAN-Homopolymer K212 zeigte einen ähnlich konstanten ΔCT -Wert von +2,2 bis +4 über 24 h. Das RAN-Homopolymer K211 löste ab 10 h eine leichte Abnahme des ΔCT -Wertes von +4 zu +1,5 aus. Im Gegensatz dazu blieben die ΔCT -Werte der unbehandelten Zellen bis 8 h in dem Bereich von 2,5 bis 3,5, danach nahmen die Werte kontinuierlich bis auf einen Endwert von -1,7 nach 24 h ab.

Mit Hilfe der Kinetik konnte die frühere Beobachtung bestätigt werden, dass die TREM-1 Expression in unbehandelten PBMCs im Laufe der Zeit herunterreguliert wurde, während sie in mit dem HIV-ISU-Homopolymer behandelten konstant blieb. Allerdings zeigte das RAN-Homopolymer mit einem COOH-Terminus die gleiche biologische Aktivität im Bezug auf TREM-1 Expression wie das ISU-Homopolymer.

MMP-1

MMP-1 (Matrix-Metalloprotease 1) ist ein extrazelluläres Protein, für das eine Interaktion mit dem Tat-Protein von HIV-1 bereits beschrieben wurde (Rumbaugh *et al.*, 2006). Die im Microarray detektierte Hochregulation von MMP-1 Expression konnte durch vorhergehende Kinetiken sowohl auf der Protein-Ebene als auch auf der mRNA-Ebene bestätigt werden (Lauck, 2008). Dabei konnte die MMP-1 Expression nur bei den mit den HIV-ISU-, aber nicht bei den mit den HIV-RAN-Homopolymeren inkubierten sowie bei den unbehandelten

PBMCs detektiert werden. Allerdings wurde das hierfür verwendete RAN-Peptid nach der Synthese am C-Terminus durch Amidierung modifiziert. Daher wurde gezielt ein nicht modifiziertes HIV-RAN-Peptid, welches eine C-terminale freie Carboxylgruppe trägt, eingesetzt, um die vorhergehenden Ergebnisse von Lauck zu bestätigen (Lauck, 2008) (Abbildung 3.13).

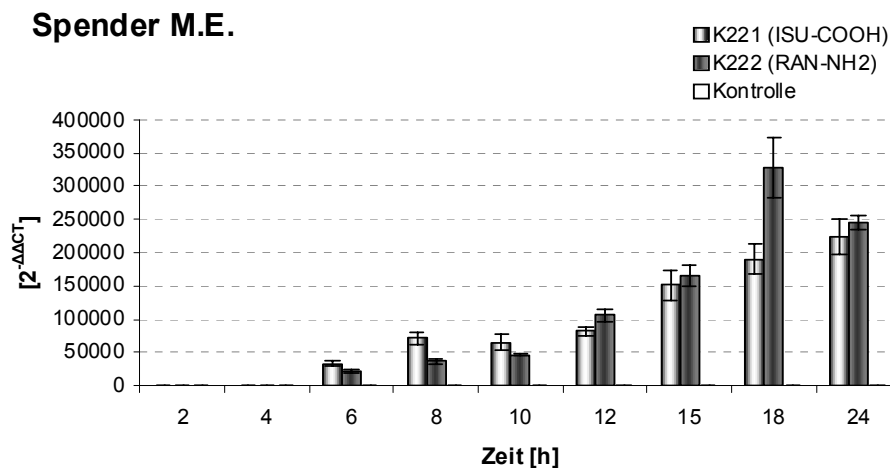


Abbildung 3.13: Kinetik der MMP-1 Expression humaner PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU- bzw. HIV-RAN-Homopolymeren über einen Zeitraum von 24 h mittels real time RT-PCR

PBMCs von einem gesunden Spender (M.E.) wurden mit 25 µg/ml HIV-ISU-Homopolymer (K221) bzw. 25 µg/ml HIV-RAN-Homopolymer (K222) inkubiert, die Expression wurde über einen Zeitraum von 24 h an neun Messpunkten gemessen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PBMCs (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten ± SD.

Nach Inkubation der PBMCs von Spender M.E. mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K221) zeigte die MMP-1 Expression ab 6 h einen kontinuierlichen Anstieg und erreichte nach 24 h ein Maximum (Faktor von $2,2 \times 10^5$). Bei den PBMCs, die mit dem HIV-RAN-Homopolymer (K222) inkubiert wurden, konnte ein ähnliches MMP-1 Expressionsmuster beobachtet werden. Allerdings erreichte die Genexpression nach 18 h das Maximum bei einer $3,3 \times 10^5$ -fachen Hochregulation. Dem folgte eine leichte Herabsetzung bis auf dem Faktor von $2,5 \times 10^5$. Bei den unbehandelten PBMCs wurde keine MMP-1 Expression detektiert.

Die hier zu sehenden hohen Werte der MMP-1 Expression hängen damit zusammen, dass in unbehandelten PBMCs keine MMP-1 Expression festgestellt werden konnte. Die Auswertung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Livak und Schmittgen (2001), bei der die Veränderung der Genexpression auf den CT-Wert unbehandelter Kontrollansätze bezogen wurde. Da bis zum letzten Zyklus der real time RT-PCR bei den Kontrollansätzen keine MMP-1 Expression detektiert werden konnte, wurden die CT-Werte für die unbehandelten PBMCs mit dem letzten Zyklus gleichgesetzt, wodurch sich ein CT-Wert von 40 ergab. Der für die

Berechnung der Expressionsunterschiede entscheidende $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert (Subtraktion des ΔCT -Wertes des mit Peptiden behandelten PBMCs und des ΔCT -Wertes der unbehandelten PBMCs) wurde dadurch künstlich erhöht und aus der anschließenden des $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wertes wurden die so hohen Genexpressionswerte resultiert.

Mit Hilfe der Kinetik konnte wie in der früheren Untersuchung von Lauck eine Hochregulation von MMP-1 Expression bei den mit dem ISU-Homopolymer inkubierten PBMCs sowie keine MMP-1 Expression bei den unbehandelten PBMCs festgestellt werden. Allerdings zeigten die PBMCs, die mit dem RAN-Homopolymer mit einer C-terminalen COOH-Gruppe behandelt wurden, ebenfalls eine Hochregulation von MMP-1 Expression.

3.5 Untersuchung der Genexpressionen in den mit HIV-1 infizierten humanen PBMCs *in vitro*

Die Änderungen der Expression der Gene von IL-10, IL-6, TREM-1/-2, CXCL-9, FCN1 und MMP-1, die mit Hilfe der 24-Stunden Kinetiken bei den mit den von HIV-1 ISU-Domäne abgeleiteten Peptiden behandelten PBMCs zu beobachten waren, sollten nun mit den Genexpressionen der mit HIV-1 infizierten PBMCs verglichen werden. Hierfür wurde eine definierte Zahl von PBMCs aus Buffy Coats von gesunden, HIV-1 negativen Stamm Spendern mit zwei HIV-1 Stämmen, einem CCR5 (oder Monozyten)-tropen HIV-1_{Ba-L} sowie einem CXCR4 (oder T-Zell)-tropen HIV-1_{III B} infiziert (siehe 2.2.4.3). Um Effekte von IL-2 und PHA auf die Expression der Gene in PBMCs auszuschließen, wurden PBMCs ohne Vorstimulierung mit HIV-1_{III B} infiziert (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: kinetische HIV-1 Infektionsversuche humaner PBMCs

Versuch	Stimulierung (PHA und IL-2)	Virus-Stamm bzw. -Titer	Zellzahl	Kultivierungszeit [h/d]* Nach Infektion
I	Ja	$1 \times 10^{7,9}$ HIV-1 _{Ba-L}	$1,2 \times 10^8$ PBMCs	6 h, 9 h, 12 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d
II	Ja	$14 \times 10^{7,9}$ HIV HIV-1 _{III B}	$2,8 \times 10^7$ PBMCs	1 d bis 7 d
III	Nein	$14 \times 10^{7,9}$ HIV HIV-1 _{III B}	$2,8 \times 10^7$ PBMCs	1 d bis 7 d

* Nach dem Infektionsvorgang wurden die PBMCs für die jeweiligen Messpunkte getrennt inkubiert. d = day.

Die Analyse der einzelnen Genexpressionsmuster erfolgte mittels real time RT-PCR. Da die CT-Werte des Referenz-Gens, GAPDH, relativ konstant blieben, konnten die CT-Werte von untersuchten Genen weiter durch die von GAPDH normalisiert werden.

3.5.1 Quantifizierung der HIV-1 Provirusintegration in humanen PBMCs mittels real time PCR Analyse

Etwa 5 - 14 % der Europäer und weitaus weniger Prozent bei der asiatischen oder afrikanischen Bevölkerung tragen eine 32-Basenpaardeletion im CCR5-Gen (Balanovsky *et al.*, 2005). Individuen mit homozygoter Deletion sind äußerst resistent gegenüber einer HIV-1 Infektion bei wiederholter Virusexposition. Heterozygote Träger besitzen jedoch immer noch eine partielle Resistenz, und oder zeigen einen verlangsamten Krankheitsverlauf. Daher war vor der Untersuchung der Genexpressionsmuster nötig festzustellen, ob die PBMCs von unbekanntem Spender mit HIV-1 infizierbar waren. Hierfür wurde in allen Versuchen zunächst mittels PCR Analyse mit HIV-1 *gp41*-spezifischen Primern Provirusintegrationen nachgewiesen (siehe 2.2.1.6). Im Versuch I konnte bereits 12 h nach Infektion mit HIV-1_{Ba-L} eine Provirusintegration festgestellt werden (Abbildung 3.14). Im Laufe der Infektionszeit hatte die Bandenintensität zugenommen (Spur 6, 8, 10 und 12) und nach 7 Tagen war sie so stark wie die der positiven Kontrolle (Spur 14 und 15). Dies wies darauf hin, dass die PBMCs durch die Viren infiziert wurden.

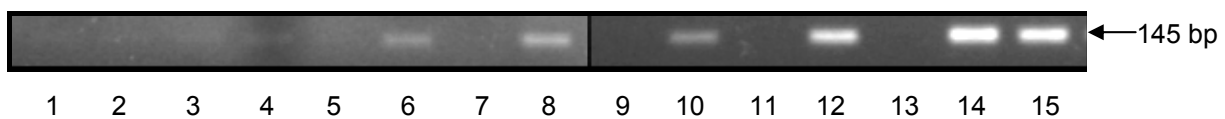


Abbildung 3.14: PCR Analyse zum Nachweis der Provirusintegration von HIV-1_{Ba-L} in das das Genom humaner PBMCs

200 ng DNA aus mit HIV-1_{Ba-L} infizierten PBMCs wurde als Template in einer PCR mit HIV-1 *gp41*-spezifischen Primern eingesetzt und die PCR-Amplifikate wurde auf einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Spur 1: 6 h uninfiziert.; 2: 6 h infiziert.; 3: 9 h uninfiziert.; 4: 9 h infiziert.; 5: 12 h uninfiziert.; 6: 12 h infiziert.; 7: 1 d uninfiziert.; 8: 1 d infiziert.; 9: 2 d uninfiziert.; 10: 2 d infiziert.; 11: 3 d uninfiziert.; 12: 3 d infiziert.; 13: 7 d uninfiziert.; 14: 7 d infiziert.; 15: positive Kontrolle (DNAs aus den mit HIV-1_{Ba-L} durchinfizierten PBMCs).

Des Weiteren wurde der HIV-1_{III B} Virus-Stock vorab darauf getestet, wie hoch die Infektivität ist, da die Viren fast ein Jahr bei -196 °C gelagert wurden. Dazu wurde die HIV-1 Provirusintegration in das zelluläre Genom mit Hilfe der real time PCR quantifiziert (siehe 2.2.1.7). Durch die Quantifizierung der Proviren konnte auch ein Zusammenhang zwischen der Viruslast und dem Genexpressionsmuster der zu untersuchenden Gene untersucht werden. Zunächst wurde die Effizienz sowie die Sensitivität der real time PCR ermittelt, um ein real time PCR System zur Bestimmung der Nachweisgrenze der HIV-1 Provirusintegration zu etablieren. In der Arbeitsgruppe war bereits ein Plasmid kloniert worden, genannt pUR006 (pCAL-n mit HIV-1 *gp41* als Insert). Die Plasmid- bzw. DNA-Konzentration wurde

photometrisch und die Kopienzahl rechnerisch bestimmt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe in Zwischenschritten hergestellt, die theoretisch einen Bereich von 50000 bis unter eine Kopie abdeckte. Anschließend wurde die Verdünnungsreihe mit der jeweiligen definierten Kopienzahl des Plasmids in die HIV-1 *gp41* spezifische real time PCR als Triplikate eingesetzt. Anhand einer Formel (siehe 2.2.1.7) konnte bis auf 48,8 Kopien eine Primereffizienz von 105 % ermittelt werden (Abbildung 3.15). Daher wurden 49 Kopien pro Ansatz als Nachweisgrenze der Provirusintegration von diesem PCR-System festgelegt.

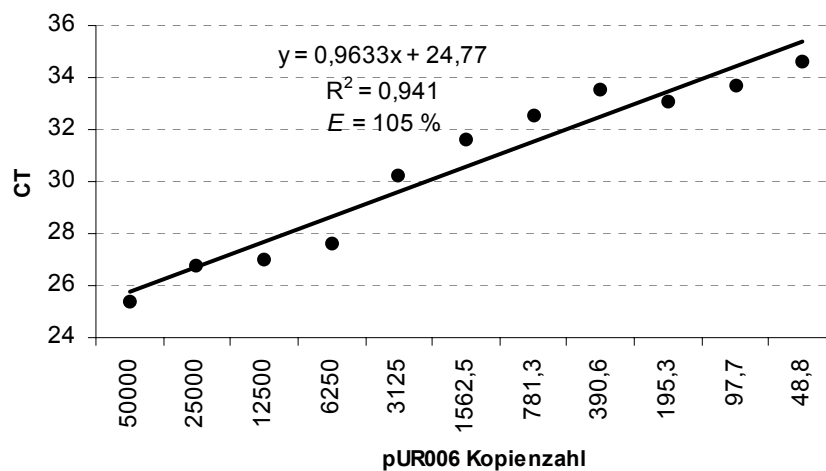
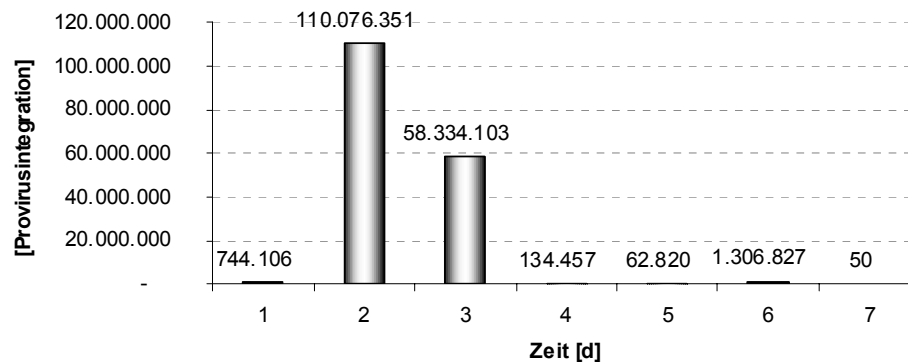
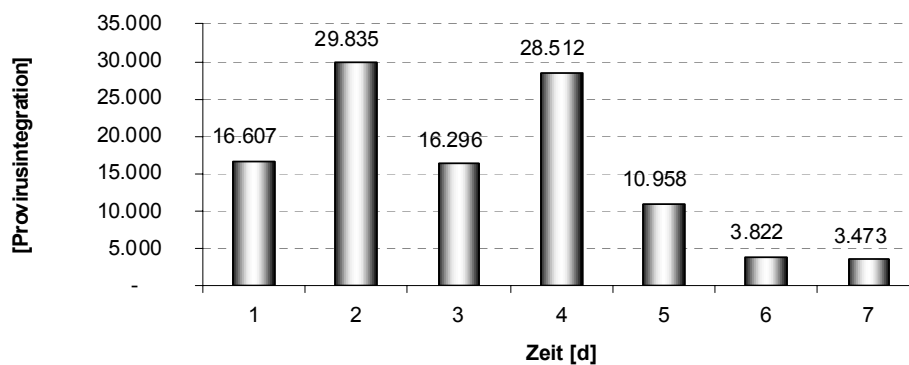


Abbildung 3.15: Sensitivität und Effizienz der real time PCR zum Nachweis der HIV-1 Provirusintegration

E = Effizienz.

Anhand dieser Standardkurve konnte nach der Infektion der PBMCs mit HIV-1_{III B} die Provirusintegration in das zelluläre Genom quantifiziert werden (Abbildung 3.16). In den stimulierten PBMCs wurde im Vergleich zu den unstimulierten über den gesamten Zeitraum von 7 Tagen eine wesentlich höhere Anzahl von Proviren nachgewiesen.

A HIV-1_{IIIB} (Mit Stimulierung)**B HIV-1_{IIIB} (Ohne Stimulierung)****Abbildung 3.16: Quantifizierung der Provirusintegration im Genom humaner PBMCs mittels real time PCR**

PBMCs aus Buffy Coats von einem HIV-negativen, gesunden Spender wurden nach dreitägiger Stimulierung mit IL-2 und PHA (**A**) sowie ohne Vorstimulierung (**B**) mit HIV-1_{IIIB} infiziert und über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert. Die aus den Zellen isolierte genomische DNA (200 ng) wurde für die real time PCR als Template eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

Bei den stimulierten PBMCs wurde nach 2 Tagen eine Provirusintegration von 1100×10^5 beobachtet. Dem folgte eine Abnahme nach 3 Tagen, die auf das Absterben der infizierten Zellen zurückgeführt werden kann. Nach 6 Tagen war eine leichte Erhöhung der Provirenanzahl auf 13×10^5 zu beobachten. Es könnte daraus geschlossen werden, dass die bis dahin uninfizierten Zellen durch die neu gebildeten Viren infiziert wurden. Die unstimulierten Zellen wiesen eine deutlich niedrige Provirenanzahl auf und viele Zellen wurden bereits am ersten Tag nach der Infektion infiziert. Nach 2 Tagen wurde eine maximale Anzahl der Proviren bestimmt. Dem folgte eine leichte Abnahme nach 3 Tagen und erneute Erhöhung nach 4 Tagen. Dies könnte wie oben erwähnt durch das Absterben der Zellen und durch erneuten Infektionszyklus zu Stande gekommen sein.

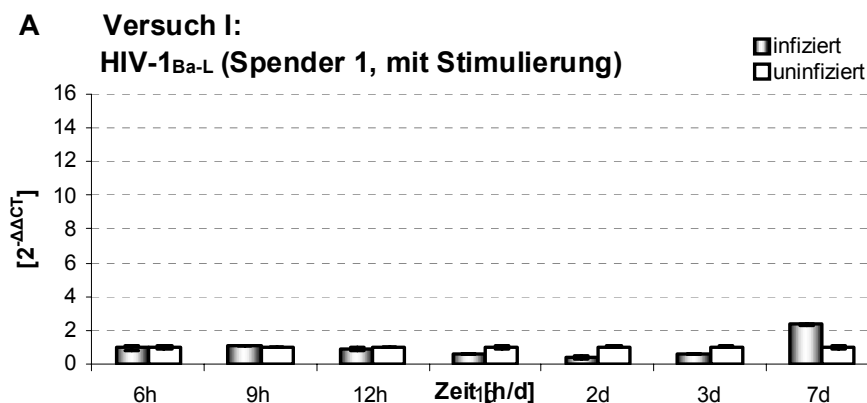
3.5.2 Genexpressionsmuster von IL-10, IL-6, CXCL-9, FCN1, TREM-1/-2 und MMP-1 in den mit HIV-1 infizierten humanen PBMCs

Die Expression von verschiedenen zellulären Genen (IL-10, IL-6, CXCL-9, FCN1, TREM-1/-2 und MMP-1) bei mit HIV-ISU-Homopolymeren behandelten PBMCs wurden mit denen Genexpressionen in mit HIV-1 infizierten PBMCs verglichen. Im Vergleich zu den Kinetiken bei den mit ISU-Peptid behandelten PBMCs, wurde hierfür als erster eindeutiger Messpunkt 6 h definiert, da der Infektionsvorgang von HIV-1 zwei bis drei Stunden dauert.

In diesem ersten Versuch konnte nur eine schwache Veränderung der Expression der zu untersuchenden Gene beobachtet werden, was darauf zurückgeführt werden kann, dass die Zahl der Viren im Verhältnis zu den Zellzahlen zu niedrig war, um die Zellen gleichzeitig durchzuinfizieren. Daher wurden bei den weiteren Versuchen ca. $2,8 \times 10^7$ PBMCs mit $14 \times 10^{7,9}$ HIV-1_{IIIIB} infiziert (siehe Tabelle 3.1). Dies entsprach der ca. 50-fachen Menge an Viren als im Versuch I im Verhältnis zu den Zellen. Im Versuch II wurden die PBMCs von Spender 2 wie im Versuch I stimuliert und mit HIV-1_{IIIIB} infiziert. Währenddessen wurde beim Versuch III eine Infektion ohne Vorstimulierung der Zellen vorgenommen. Die PBMCs wurden bis zu 7 Tagen nach der Infektion kultiviert. Da im ersten Versuch (ein Tag) keine Veränderung der Expression der meisten untersuchten Gene beobachtet wurde, wurde am ersten Tag keine Messung vorgenommen.

IL-10

Im Versuch I konnte bis zum 3. Tag nach der Infektion mit HIV-1_{Ba-L} keine signifikante Veränderung der IL-10 Expression detektiert werden (Abbildung 3.17A). Erst nach 7 Tagen wurde die Expression um einen Faktor von 2,5 leicht hochreguliert.



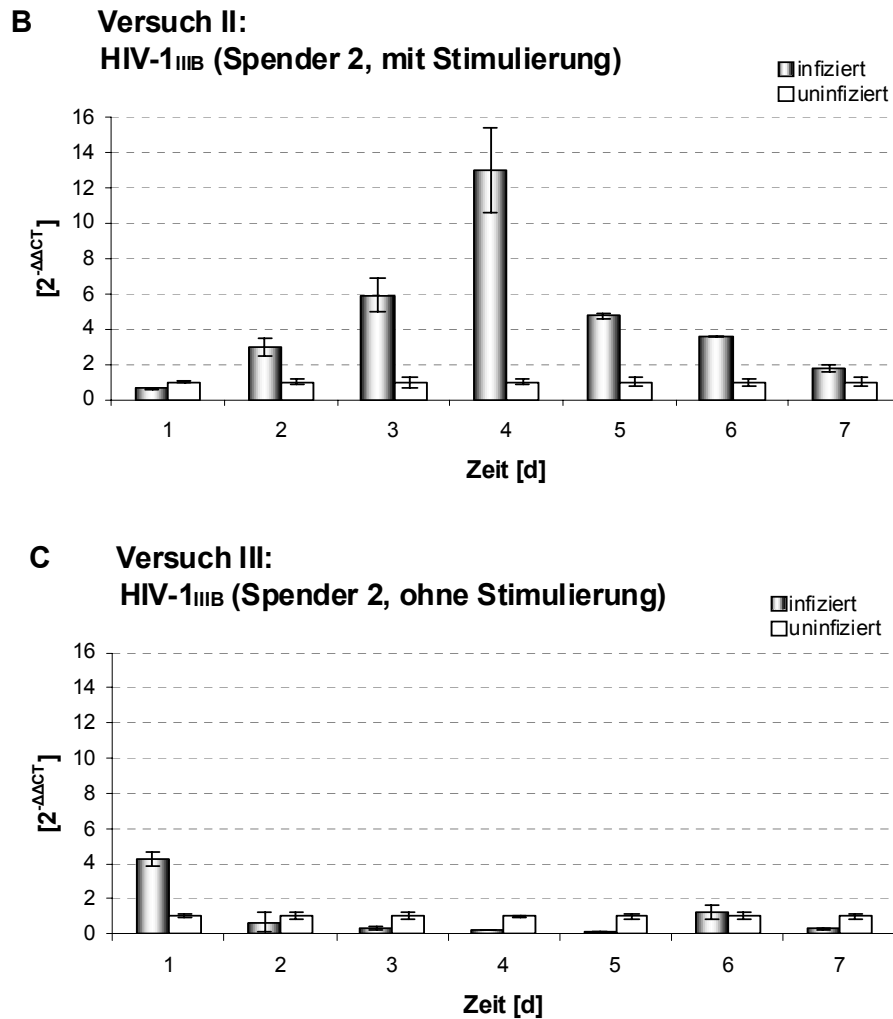


Abbildung 3.17: Analyse der IL-10 Expression bei HIV-1 infizierter PBMCs mittels real time RT-PCR

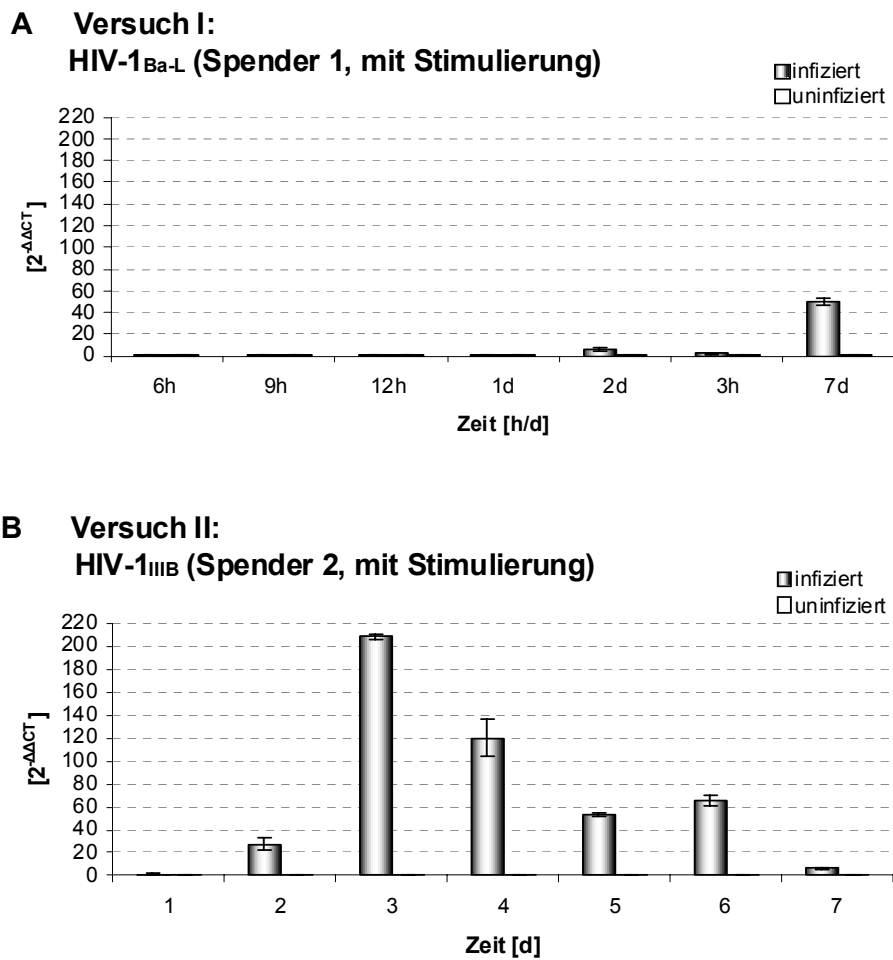
PBMCs aus Buffy Coats von HIV-negativen, gesunden Spendern wurden nach Vorstimulierung mit HIV-1_{Ba-L} (A) bzw. HIV-1_{III B} (B) infiziert. Parallel wurden sie ohne Stimulierung direkt nach der Isolierung mit HIV-1_{III B} infiziert (C). Die Zellen wurden für 7 Tage beobachtet. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte PBMCs. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

Im Vergleich dazu sind in den Versuchen II und III, in denen ca. die 50-fache Menge an Viren als im Versuch I eingesetzt wurde, deutlich signifikante Veränderungen der IL-10 Expression in infizierten PBMCs zu beobachten. Die IL-10 Expression in stimulierten PBMCs (Versuch II) stieg kontinuierlich an, erreichte nach 4 Tagen ein Maximum mit einer 13-fachen Hochregulation (Abbildung 3.17B). Dem folgte eine kontinuierliche Abnahme der IL-10 Expression bis zur 1,7-fachen Hochregulation nach 24 h. Im Vergleich dazu konnte bereits 1 Tag nach der Infektion eine etwa 4,4-fache Hochregulierung von IL-10 in unstimulierten PBMCs (Versuch III) detektiert werden (Abbildung 3.17C). Danach blieb die IL-10 Expression, ausgenommen am 6. Tag, unter dem Wert der uninfizierten Zellen.

Alle drei durchgeführten HIV-1 Infektionsversuche konnten belegen, dass die Expression von IL-10 hochreguliert wird, wenn auch unterschiedlich stark.

IL-6

Im Versuch I konnte eine signifikante Veränderung der IL-6 Expression nach der viralen Infektion ähnlich wie bei der IL-10 Expression erst nach 7 Tagen mit einer 50-fachen Hochregulierung beobachtet werden (Abbildung 3.18A).



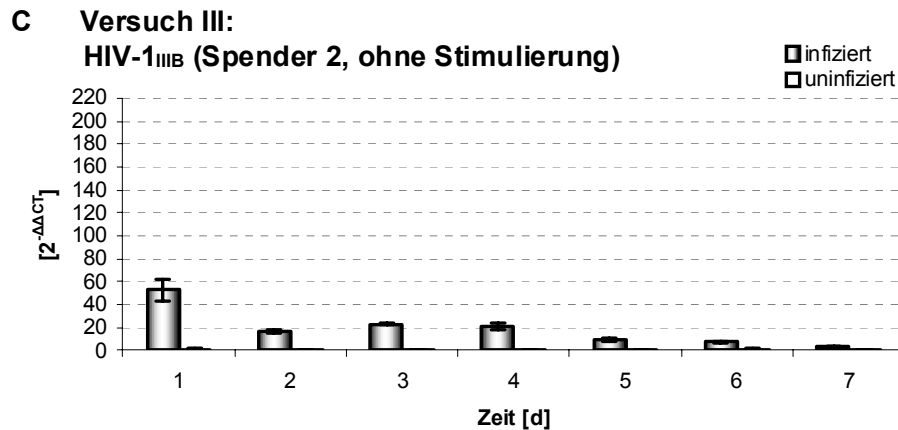


Abbildung 3.18: Analyse der IL-6 Expression bei HIV-1 infizierten PBMCs mittels real time RT-PCR

PBMCs aus Buffy Coats von HIV-negativen, gesunden Spendern wurden nach Vorstimulierung mit HIV-1_{Ba-L} (A) bzw. HIV-1_{III B} (B) infiziert. Parallel wurden sie ohne Stimulierung direkt nach der Isolierung mit HIV-1_{III B} infiziert (C). Die Zellen wurden für 7 Tage beobachtet. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte PBMCs. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

Die mit HIV-1_{III B} infizierten, vorstimulierten PBMCs im Versuch II zeigten nach 3 Tagen eine maximale Hochregulation der IL-6 Expression um den Faktor 210 (Abbildung 3.18B). Danach nahm die Expression wieder ab. Die unstimulierten PBMCs im Versuch III zeigten bereits 1 Tag nach der Infektion eine 53-fache Hochregulierung der IL-6 Expression, die folglich stetig abnahm (Abbildung 3.18C).

Ein Vergleich des IL-6- mit dem IL-10-Genexpressionsmuster (siehe Abbildung 3.17) zeigt, dass beide Zytokine in den unstimulierten Zellen eher exprimiert werden als in Zellen, die vorab stimuliert worden sind, jedoch unterscheidet sich die Expressionsstärke. So war das Expressionsniveau stets deutlich in den stimulierten Zellen erhöht.

CXCL-9

Die Expression von CXCL-9 wurde nur im Versuch I untersucht, wobei die mit HIV-1_{Ba-L} infizierten PBMCs von Spender 1 nach Stimulierung über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet wurden (Abbildung 3.19). Bis zum 3. Tag blieb die relative CXCL-9 Expression auf einem konstanten Niveau von 0,8 bis 1,2. Erst nach 7 Tagen konnte eine leichte Erhöhung der Expression um den Faktor von 2 beobachtet werden. Diese Veränderung der Genexpression von CXCL-9 nach 7 Tagen korreliert mit der von IL-10 sowie IL-6 im Versuch I (siehe Abbildung 3.17A und 3.18A).

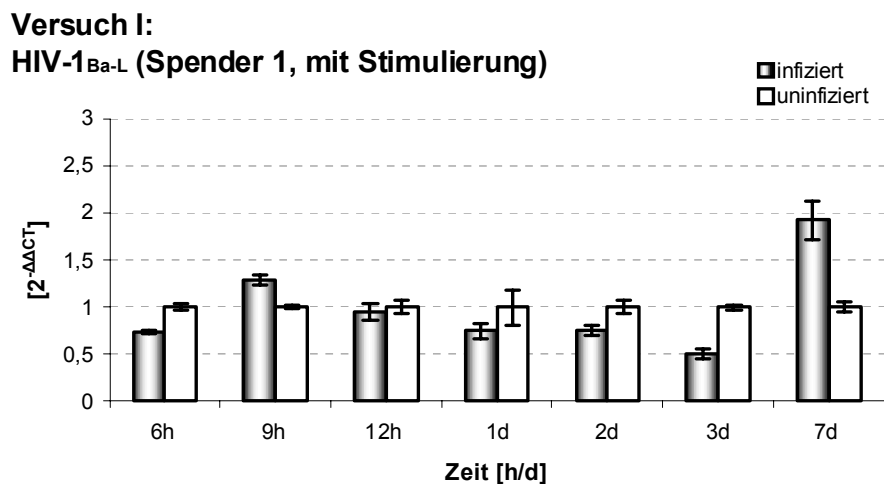


Abbildung 3.19: Analyse der CXCL-9 Expression bei HIV-1 infizierten PBMCs mittels real time RT-PCR

PBMCs aus Buffy Coats von HIV-negativen, gesunden Spendern wurden nach Vorstimulierung mit HIV-1_{Ba-L} infiziert. Die Zellen wurden für 7 Tage beobachtet. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte PBMCs. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

FCN1

Im Rahmen des Versuchs I wurde auch die FCN1 Expression der stimulierten PBMCs von Spender 1 nach Infektion mit HIV-1_{Ba-L} untersucht (Abbildung 3.20). Dabei zeigte die FCN1 Expression bis zum 3. Tag ein konstantes Niveau von 0,7 bis 1,5. Erst nach 7 Tagen wurde sie im Vergleich zu der Expression der uninfizierten Zellen auf 6 % herunterreguliert, was einer 17-fachen Herunterregulation entspricht.

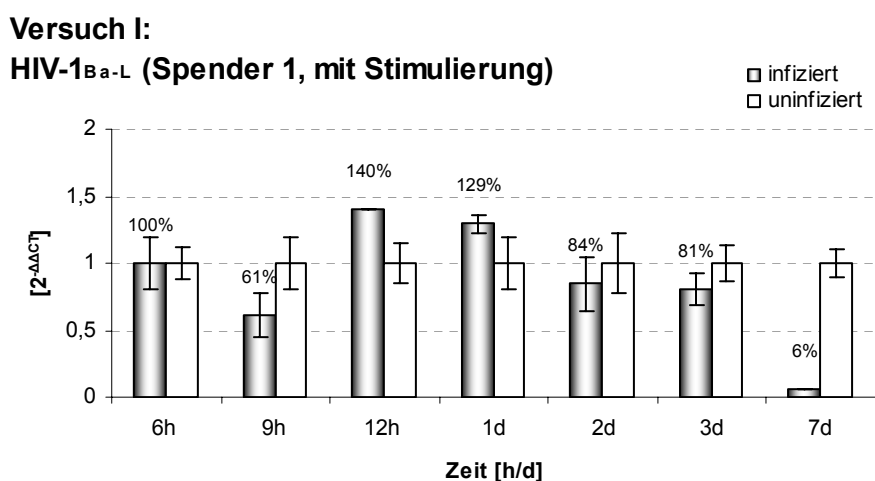
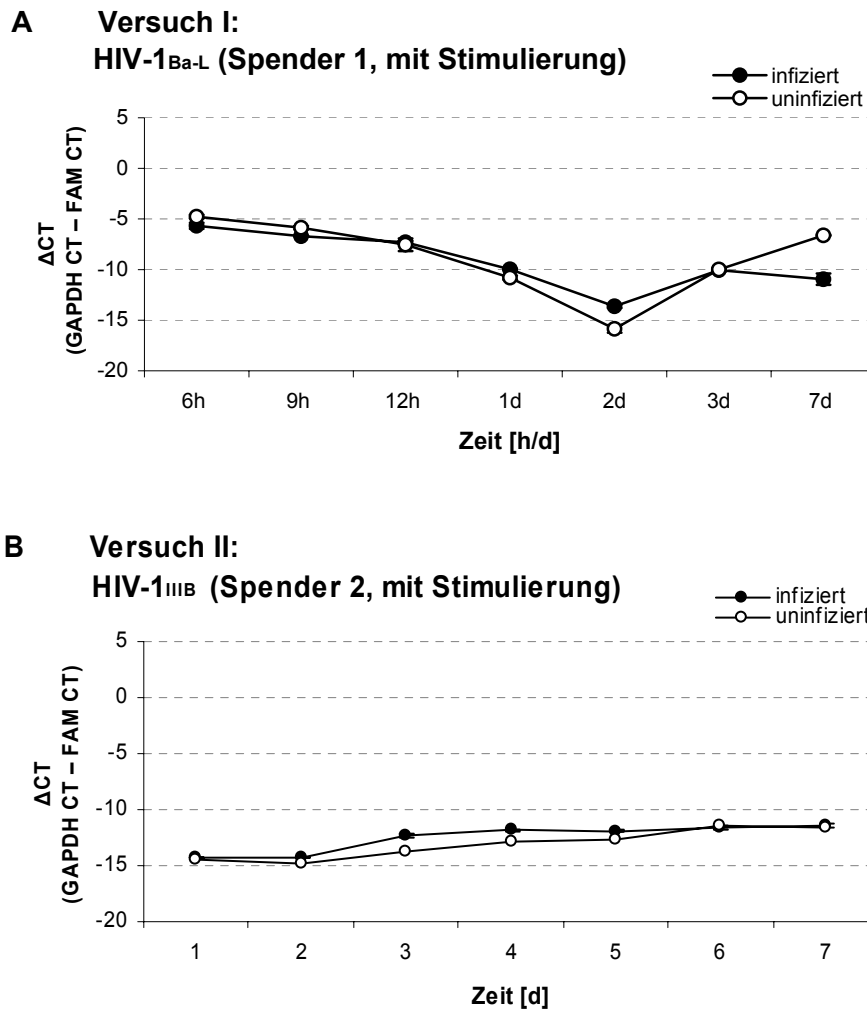


Abbildung 3.20: Analyse der FCN1 Expression bei HIV-1 infizierten PBMCs mittels real time RT-PCR

PBMCs aus Buffy Coats von HIV-negativen, gesunden Spendern wurden nach Vorstimulierung mit HIV-1_{Ba-L} infiziert. Die Zellen wurden für 7 Tage beobachtet. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte PBMCs. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

TREM-1/-2

Um die Genexpression von TREM-1/-2 der HIV-1 infizierten PBMCs mit denen bei den mit HIV-ISU-Homopolymer behandelten PBMCs zu vergleichen, wurde in allen drei Versuchen auch die Expression von TREM-1 und TREM-2 gemessen (siehe 3.4.1).



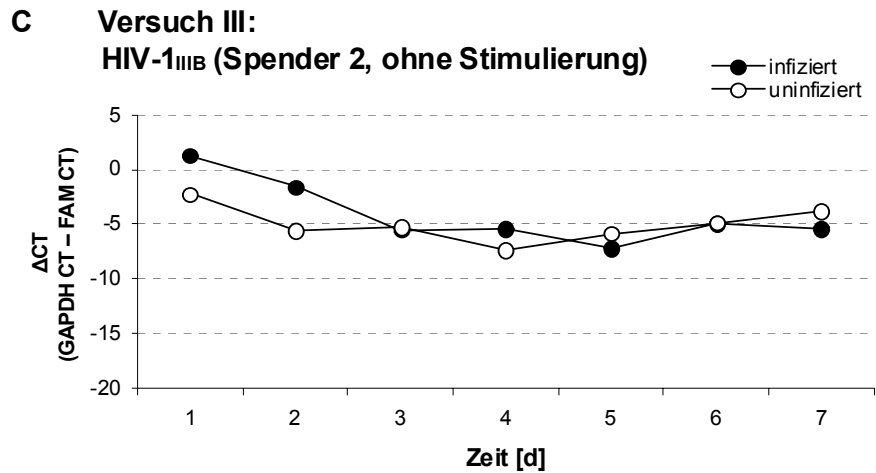
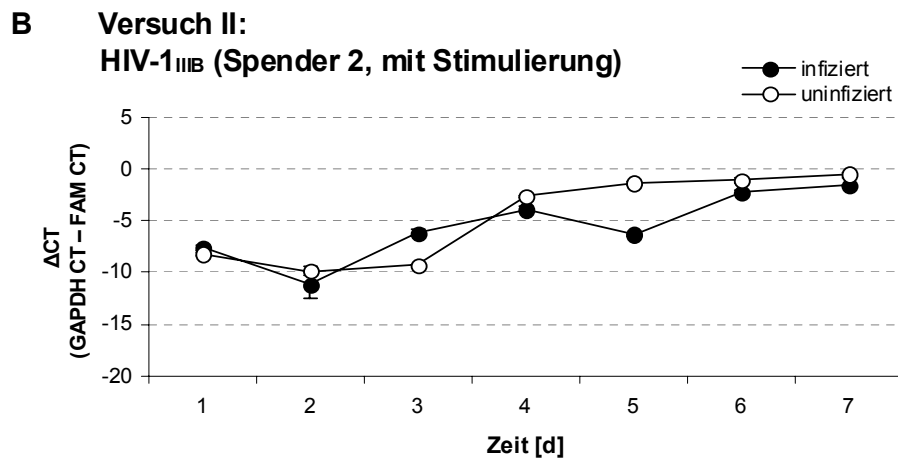
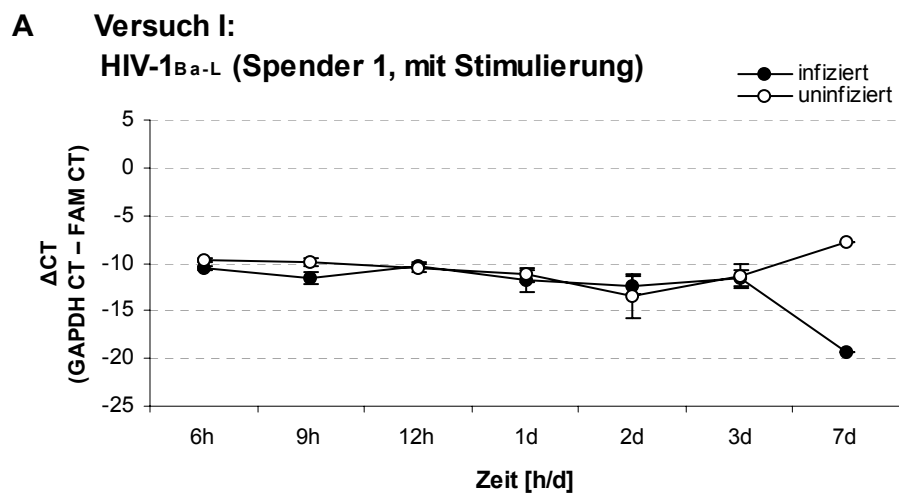


Abbildung 3.21: Analyse der TREM-1 Expression bei HIV-1 infizierten PBMCs mittels real time RT-PCR

PBMCs aus Buffy Coats von HIV-negativen, gesunden Spendern wurden nach Vorstimulierung mit HIV-1_{Ba-L} (A) bzw. HIV-1_{III B} (B) infiziert. Parallel wurden sie ohne Stimulierung direkt nach der Isolierung mit HIV-1_{III B} infiziert (C). Die Zellen wurden für 7 Tage beobachtet. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte PBMCs. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.



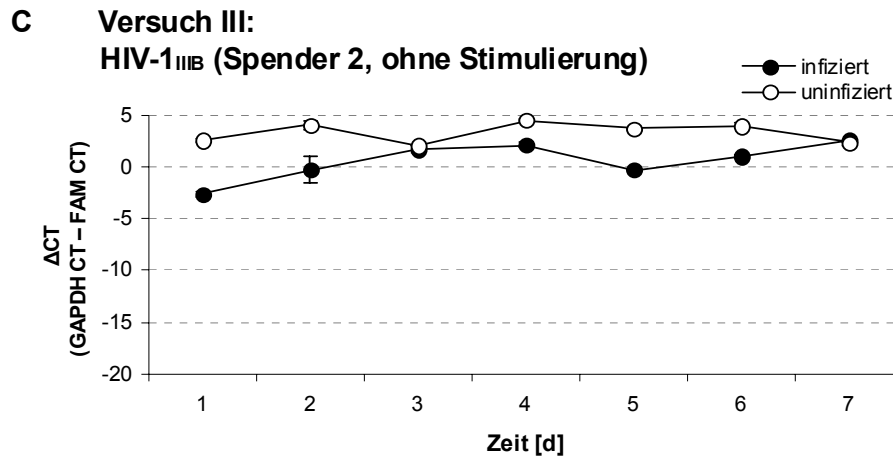


Abbildung 3.22: Analyse der TREM-2 Expression bei HIV-1 infizierten PBMCs mittels real time RT-PCR

PBMCs aus Buffy Coats von HIV-negativen, gesunden Spendern wurden nach Vorstimulierung mit HIV-1_{Ba-L} (A) bzw. HIV-1_{III B} (B) infiziert. Parallel wurden sie ohne Stimulierung direkt nach der Isolierung mit HIV-1_{III B} infiziert (C). Die Zellen wurden für 7 Tage beobachtet. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte PBMCs. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

Im Versuch I konnte sowohl bei der TREM-1- als auch bei der TREM-2-Expression bis zum 3. Tag kein Unterschied zwischen den infizierten und uninfizierten PBMCs beobachtet werden (Abbildung 3.21A und 3.22A). Erst nach 7 Tagen zeigte sich eine Herunterregulation von sowohl TREM-1 als auch TREM-2 in den infizierten Zellen, in den nicht infizierten Zellen blieb das Expressionsniveau unverändert. Des Weiteren konnte im Versuch II kein Unterschied der TREM-1 Genexpression zwischen den infizierten und uninfizierten Zellen festgestellt werden (Abbildung 3.21B). Währenddessen wurde TREM-2 nach 4 Tagen in den infizierten Zellen im Vergleich zu den uninfizierten Zellen herunterreguliert (Abbildung 3.22B). Versuch III zeigte jedoch nach 2 Tagen eine Hochregulation der TREM-1 Expression und entgegengesetzt dazu eine niedrige Expression von TREM-2, im Vergleich zu den uninfizierten Zellen (Abbildung 3.21C und 3.22C). Signifikant war, dass an diesem Messpunkt eine relativ hohe Anzahl an Proviren quantifiziert werden konnte (siehe Abbildung 3.16). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TREM-1/-2 bei den stimulierten PBMCs generell mehr exprimiert als bei den unstimulierten PBMCs, bezogen auf GAPDH. Hierbei betragen die Δ CT-Werte von TREM-1 bei stimulierten zwischen -15 und -12, und bei unstimulierten zwischen -2 und -7, sowie die Δ CT-Werte von TREM-2 bei unstimulierten zwischen -2 und -11 und bei unstimulierten zwischen -2 und 3.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression von TREM-2 in den infizierten PBMCs im Vergleich zu den uninfizierten PBMCs herunterreguliert wurde.

MMP-1

Eine MMP-1 Expression konnte weder in den HIV-1_{Ba-L} bzw. HIV-1_{IIIb} infizierten PBMCs noch in den uninfizierten PBMCs detektiert werden.

Zu erwähnen ist, dass alle anderen real time RT-PCRs mit RNAs, welche aus den mit HIV-ISU-Homopolymer behandelten PBMCs isoliert wurden und mit denen bereits mittels real time RT-PCR eine MMP-1 Expression detektiert werden konnte, als positive Kontrolle parallel durchgeführt wurden.

3.6 Analyse der Bindung von HIV ISU-Peptid und TGF- β 1 an Nerzlungenepithelzellen

TGF- β 1 zeigt eine Sequenzhomologie zu der ISU-Domäne (siehe Abbildung 1.10) und Huang und Huang hatten gezeigt, dass das Peptid CKS-25, das die Sequenz des Peptids CKS-17 enthält, die Bindung vom TGF- β 1 an den TGF- β Rezeptor blockiert (Huang und Huang, 1998). Um diese Daten zu überprüfen, wurde dieselbe Nerzlungenepithel-Zelllinie Mv1Lu, die von Huang und Huang verwendet wurde, mit humanem TGF- β 1 (5 μ g bzw. 10 μ g) und biotinyliertem HIV-ISU- sowie HIV-RAN-Peptid (10 μ g) inkubiert und mit Hilfe der Immunfluoreszenz analysiert (siehe 2.2.3.2). Dabei dienten die mit HIV-RAN-Peptid inkubierten und unbehandelten Zellen als negative Kontrolle. Es konnte keine Bindung von TGF- β 1 sowie ISU- bzw. RAN-Peptid auf der Oberfläche der Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der ISU- und RAN-Homopolymere

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die immunsuppressive Eigenschaft der immunsuppressiven (ISU-) Domäne des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1 im Bezug auf den Einfluss auf die Expression verschiedener zellulärer Gene untersucht. Es ist bereits bekannt, dass das synthetisch hergestellte HIV-ISU-Peptid eine immunsuppressive Wirkung, wie z.B. eine Hemmung der T-Zellproliferation, hat, jedoch in der monomeren Form nur, wenn es an größere Trägermoleküle wie BSA oder Dextran gekoppelt worden ist (Cianciolo *et al.*, 1985; Denner *et al.*, 1994). Um dabei eventuell auftretende Einflüsse des Trägermoleküls auszuschließen, wurde dazu übergegangen, die ISU-Peptide untereinander mittels EDC zu Homopolymeren zu koppeln (Behrendt, 2005) (2.2.2.1).

Während einer EDC-Kopplung wird die Bildung einer Amidbindung zwischen Amino- und Carboxylgruppe induziert. Dabei kann die Kopplung der Peptide nicht nur über die Amino- und Carboxytermini stattfinden, sondern die funktionellen Amino- und Carboxylgruppen der Peptid-Sequenz können auch ungerichtet sowohl intra- als auch intermolekular verknüpft werden. Die Abbildung 4.1 zeigt die Aminosäuresequenz von ISU bzw. der randomisierten Sequenz auf und verdeutlicht, welche Aminosäuren während der Kopplung jeweils miteinander reagieren könnten.

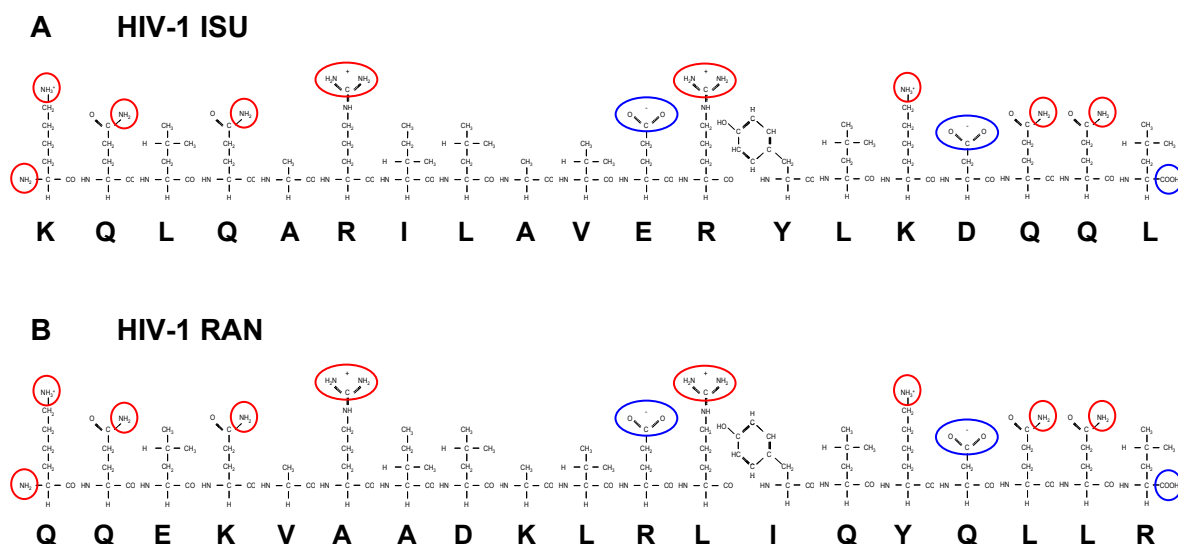


Abbildung 4.1: HIV-1 ISU- bzw. RAN-Aminosäuresequenz

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der ISU-Domäne von HIV-1 gp41 (A) und die davon abgeleitete randomisierte Sequenz (B). Entscheidend für die Kopplung mit Hilfe von EDC sind die Amino- bzw. Carboxylgruppen der jeweiligen Aminosäure, die rot (Aminogruppe) bzw. blau (Carboxylgruppe) eingekreist sind.

Die monomeren ISU- und RAN-Peptide besitzen jeweils neun freie Amino- und drei freie Carboxylgruppen, die potentiell an der Polymerisierung beteiligt sein können. So wird deutlich, dass es zu zahlreichen oligomeren Formen bzw. Kopplungen und Konformationen der Polypeptide kommen kann und eine gerichtete definierte Kopplung nicht erfolgen kann. Daher sollte diese Methode kritisch betrachtet werden, da die Konformation der polymerisierten Peptide einen großen Einfluss auf die biologische Aktivität hat.

Chemisch synthetisierte Standard-Peptide tragen freie Amino- und Carboxytermini und sind dadurch elektrisch geladen. Die Enden der Peptide können durch N-terminale Acetylierung und/oder C-terminale Amidierung modifiziert werden. Die in der Arbeit verwendeten HIV-ISU-Peptide waren nicht modifiziert. Ihre elektrische Beladung durch freie Amino- und Carboxytermini könnte hydrophobe Interaktionen der Peptide miteinander energetisch ungünstiger machen. Im Vergleich dazu wurden die RAN-Peptide gezielt einmal wie ISU-Peptide nicht modifiziert und einmal am C-Terminus durch Amidierung blockiert, um den Einfluss der Konformation der polymerisierten Peptide auf die biologische Aktivität näher zu untersuchen.

Die erfolgreiche Kopplung der hergestellten ISU- bzw. randomisierten (RAN)-Homopolymere wurde mittels SDS-PAGE und mit Hilfe der Western Blot Analyse charakterisiert (Abbildung 3.4). So zeigte sich durch Anfärbung des SDS-Gels mittels Coomassie Blue, dass neben niedermolekularen vernetzten Strukturen auch hochmolekulare Oligomerisierungsstufen entstanden, jedoch in sehr geringem Ausmaß (Abbildung 3.4A). Aufgrund der zahlreichen Oligomerisierungsformen können keine distinkten Banden detektiert werden. So konnten die hochmolekularen Strukturen der ISU-Peptide aufgrund der geringen Menge erst durch die Western Blot Analyse detektiert werden (Abbildung 3.4A und 3.4B). Hierfür wurden zwei Antikörper eingesetzt, einerseits das ZS1, das mit dem ISU-Peptid, gebunden an KLH immunisiert worden war und andererseits der monoklonale Antikörper B3, ebenfalls gerichtet gegen ISU, gekoppelt an BSA. Das ZS1 erkannte sowohl die ISU- als auch die RAN-Homopolymere, vor allem überwiegend hochvernetzte Moleküle. Das weist darauf hin, dass es an eine Struktur bindet, die wohl in beiden Polymeren vorkommt. Im Vergleich dazu konnte der Antikörper B3 nur die hochmolekularen ISU-Homopolymere erkennen, aber nicht die RAN-Homopolymere.

Eine Überexpression des immunsuppressiven Zytokins IL-10 wurde in HIV-1 infizierten Personen beobachtet (Denner, 1998; Navikas *et al.*, 1995). Daher wurde die IL-10 Sekretion als wichtiger Indikator genutzt, um die Funktionalität der hergestellten HIV-ISU-Homopolymere in Bezug auf ihre immunsuppressiven Eigenschaften zu bestätigen. In den

durchgeführten Zytokinarrays nach einer 24-stündigen Inkubation von humanen PBMCs von gesunden Spendern mit den ISU-Peptiden wurde eine deutliche Hochregulation von IL-10 gezeigt (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde eine Spender-abhängige IL-10 Sekretion beobachtet, d.h. die Intensität der Hochregulation bei Einsatz derselben Charge von ISU-Peptid variierte von Spender zu Spender (Lauck, 2008). Auf der anderen Seite war die Qualität der ISU-Peptide im Bezug auf die Stärke der Induktion von IL-10 je nach Kopplungsansatz unterschiedlich.

Wie erwähnt gibt es keine praktikablen Verfahren, um eine direkte Aussage über die Struktur der gekoppelten Peptide zu treffen. Jedoch wurde eine Erhöhung der Sekretion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 durch PBMCs, induziert durch eine Inkubation mit dem ISU-Peptid, abgeleitet aus der Ektodomäne des HIV-1 gp41 Proteins (Denner, 1998), ebenfalls nach Inkubation von PBMCs mit rekombinanten gp41 Proteinen beobachtet (Takeshita *et al.*, 1995; Koutsonikolis *et al.*, 1997; Barcova *et al.*, 1998). Des Weiteren wurde ebenfalls bei HIV-Infizierten eine Überexpression des IL-10 beobachtet (Denis und Ghadirian, 1994; Masood *et al.*, 1994; Navikas *et al.*, 1995). Daher wurde in dieser Arbeit neben der Western Blot Analyse die Induktion von IL-10 als Marker für die Funktionalität der gekoppelten Peptid-Homopolymere im Bezug auf die immunsuppressiven Eigenschaften verwendet. Allerdings besteht bei bakteriell exprimiertem rekombinatem gp41 die Gefahr der Kontamination mit Lipopolysaccharid (LPS). Auch bei chronisch HIV-1 Infizierten wurde ein erhöhter Plasma-LPS Spiegel nachgewiesen, der aufgrund der Immunsuppression aus subklinischen opportunistischen bakteriellen Infektionen resultiert (Brenchley *et al.*, 2006). Da dieses LPS ebenfalls die IL-10 Produktion induzieren kann, muss die vom HIV-ISU-Peptid ausgelöste IL-10 Antwort kritisch betrachtet werden.

Die frühere Arbeit zeigte, dass bei der Gewinnung von Homopolymeren niedermolekulare Strukturen, z.B. Di- oder Trimere keinen immunsuppressiven Effekt, gemessen an einer gesteigerten IL-10 Expression humaner PBMCs, ausüben (Behrendt, 2005). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass für die biologische Aktivität der ISU-Peptide eine spezifische Konformation notwendig ist, welche allerdings noch nicht nachvollzogen werden kann. In diesem Zusammenhang zeigten Monell und Strand, dass bei dem HIV-ISU-Peptid durch intramolekulare Kopplungen zwischen freien Amino- und Carboxylgruppen mittels EDC eine ähnliche Loop-Struktur wie die bei Defensinen erzeugt werden kann (Monell und Strand, 1994). Bei Defensinen handelt es sich um zyklische Oligopeptide, die positiv geladen und antimikrobiell sind, und von Neutrophilen und Granulozyten produziert werden. Einige Defensine, wie z.B. *human neutrophile defensin-2* (HNP-2) bilden in ihren

aktiven Formen eine Loop-Struktur aus und haben ein PKC-inhibierendes Potential. PKC vermittelt die intrazelluläre T-Zell-Aktivierung (Weiss *et al.*, 1986). Das HIV-ISU-Peptid weist ebenfalls eine Sequenzhomologie zu PKC-bindenden Substraten und Defensinen auf und hemmt die PKC (Ruegg und Strand, 1990a und 1991). Deshalb wurde eine Loop-Struktur des ISU-Peptids als Ursache für immunsuppressive Wirkungen durch HIV-ISU-Peptide postuliert (Monell und Strand, 1994).

Durch die Faltung können die polymerisierten ISU-Peptide eine polare Eigenschaft erhalten, wodurch ermöglicht werden könnte, dass sie, ähnlich wie die *in vivo* als Teil von gp41 trimerisiert vorliegende ISU-Domäne, ein aktives Trimer bilden, an einem putativen Membranrezeptor binden und eine Signalkaskade auslösen. Diese Konformation ist zwar für die Fusion des Virus von Bedeutung, aber ob sie auch eine Bedeutung für die immunsuppressive Eigenschaft hat, ist allerdings unklar. Jedoch würde diese Beobachtung erklären, warum die monomeren ISU-Peptide keine biologische Aktivität zeigten. Sie deutet darauf hin, dass durch eine intramolekulare Kopplung des Peptids eine Sekundärstruktur bzw. Tertiärstruktur entsteht, die der ISU-Domäne des nativen gp41 ähnelt.

Erstaunlicherweise übten die HIV-RAN-Peptide, die als negative Kontrolle dienen sollte, je nach der Modifikation am C-Terminus eine unterschiedliche Auswirkung auf die IL-10 Sekretion aus. Hierbei induzierten die RAN-Peptide mit einer C-terminalen COOH-Gruppe (z.B. K212 und K222) nach der Polymerisierung eine dem ISU-Homopolymer vergleichbare signifikante IL-10 Produktion, während dieses bei dem RAN-Homopolymer mit einer NH₂-Gruppe (z.B. Pool aus K46+K49) nicht der Fall war (Abbildung 3.5).

Des Weiteren konnte hier gezeigt werden, dass das freie COOH-Ende der ISU- und RAN-Peptide während der Polymerisierung eine wesentliche Rolle spielt, wodurch möglicherweise die RAN-Homopolymere eine den ISU-Homopolymeren ähnliche Konformation, wie z.B. die postulierte Loop-Struktur, einnehmen könnten. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht die Sequenzhomologie, sondern eher eine Homologie in der räumlichen Verteilung von Ladungen oder polaren Seitenketten für die immunsuppressive Eigenschaft des HIV-ISU-Peptids verantwortlich ist. Hier sollte jedoch auch kritisch diskutiert werden, dass ein randomisiertes Peptid, von dem der ISU-Effekte hervorgehen könnte, in der Natur nicht vorkommt und dass nur der immunsuppressive Effekt der ISU-Domäne von Relevanz ist.

Um festzustellen, ob die beobachteten biologischen bzw. immunsuppressiven Auswirkungen des HIV-ISU-Peptids sequenzspezifisch sind, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, z.B. mit den amidierten HIV-ISU-Peptiden. Zusätzlich zu dem randomisierten ISU-Peptid können als Negativkontrolle weitere, nicht verwandte Peptide, z.B. mit einer gänzlich anderen

Aminosäuresequenz, jedoch der gleichen Ladung ausgewählt und im Bezug auf die Immunsuppression mit dem ISU-Peptid verglichen werden. Nebenbei kann durch eine chemische Blockierung von sekundären sowie tertiären funktionellen Gruppen eine Kopplungsmethode gewählt werden, bei der nur die primären Amino- und Carboxylgruppen an der Polymerisierung beteiligt sind. Dadurch kann die Vernetzungsmöglichkeit wesentlich eingeschränkt werden und so die dabei beobachtbaren biologischen Effekte auf die Sequenzspezifität des HIV-ISU-Peptids zurückgeführt werden.

4.2 Einfluss der HIV-ISU- und HIV-RAN-Homopolymere auf die Genexpression humaner PBMCs *in vitro*

4.2.1 IL-10 Produktion humaner PBMCs nach Behandlung mit HIV-1 ISU-Homopolymeren

Ein wichtiges Indiz für eine Immunsuppression ist unter anderem die Modulation der Zytokinproduktion. Der Ablauf der HIV-Infektion begleitet ebenfalls eine Dysregulation des Zytokinmusters, ganz besonders eine Verschiebung der Produktion von Typ-1- zu Typ-2-Zytokinen (Clerici *et al.*, 2000).

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Typ-2-Zytokin (Mosser und Zhang, 2008). Es wird hauptsächlich von CD4⁺ T_H2-Zellen und Subpopulationen der regulatorischen T-Zellen produziert (O'Garra *et al.*, 2007) sowie von B-Zellen, Monozyten, stimulierten Makrophagen sowie einigen Subpopulationen der dendritischen Zellen. Nicht-Immunzellen, wie z.B. Keratinozyten, Epithelzellen und sogar Tumorzellen, sind eine weitere wichtige Quelle von IL-10 (Moore *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2004). IL-10 tritt als Hauptimmunregulator während einer Infektion auf (Couper *et al.*, 2008). Eine wichtige biologische Funktion von IL-10 ist die Inhibition der Antigen-Präsentation, hervorgerufen durch die Hemmung der Expression von MHC II-Molekül sowie die Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Des Weiteren wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-1, IL-6 und IL-12 und TNF durch IL-10 dramatisch unterdrückt. Inflammatorische CC- und CXC-Chemokine, wie z.B. CXCL-9, werden ebenfalls durch IL-10 supprimiert (Mosser und Zhang, 2008).

Es wurden drei Kinetiken über einem Zeitraum von 24 h durchgeführt. Die durch das HIV-ISU-Homopolymer induzierte IL-10 Expression im Zellkulturüberstand humaner PBMCs wurde mittels ELISA gemessen. Vor der jeweiligen Kinetik wurde ein Vorversuch durchgeführt, um die Funktionalität der Peptid-Polymere im Hinblick auf die IL-10 Induktion

in PBMCs zu bestimmen (Abbildung 3.5). Dabei wurden die PBMCs mit unterschiedlichen Chargen der Polymere inkubiert. Es konnte eine Korrelation zwischen der eingesetzten Peptid-Charge dem Ausmaß der IL-10 Induktion bestätigt werden (Behrendt, 2005).

Die durchgeführten Kinetiken konnten einen kontinuierlichen Anstieg der IL-10 Sekretion in PBMCs bis zu 24 h zeigen. Bei der Kinetik mit PBMCs vom Spender C.K. (Blutentnahme 1) wurde ein maximaler IL-10 Gehalt von 310 pg/ml (Abbildung 3.6A) und bei der mit PBMCs vom Spender M.E. einen deutlich höheren Maximalwert von 990 pg/ml (Abbildung 3.6C) erreicht. Allerdings zeigte die Kinetik mit PBMCs von Spender C.K. (Blutentnahme 2) eine schwache IL-10 Sekretion, ein Maximum bei 15 h mit einem Wert von 220 pg/ml (Abbildung 3.6B). Eine 72-stündige Inkubation mit den ISU-Homopolymeren zeigte, dass die IL-10 Produktion weiter bis zu 36 h stets zunahm und danach wieder absank (Akyüz, 2008). Kinetische Studien mit LPS-stimulierten Monozyten zeigten ähnliche Werte (de Waal Malefyt *et al.*, 1991a). Dabei wurde gezeigt, dass IL-10 relativ spät, nach ca. 24 - 36 h die höchste Expression aufweist, während die anderen Zytokine wie IL-6, IL-1 α , IL-1 β und TNF- α bereits nach 8 - 12 h das Expressionsmaximum erreichten (de Waal Malefyt *et al.*, 1991a und 1991b).

Das Ausmaß der IL-10 Sekretion ist spender-abhängig, wenn die PBMCs von gesunden Spendern mit der gleichen Charge des ISU-Homopolymers behandelt wurden. So wurde in dieser Arbeit eine hohe IL-10 Sekretion bei Spender M.E gezeigt, die bereits in früheren Arbeiten beobachtet werden konnte (Lauck, 2008). Wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, könnten die HIV-ISU-Homopolymere während der jeweiligen Polymerisierungsreaktion unterschiedlich biologisch aktive Konformationen einnehmen, da viele Vernetzungsmöglichkeiten der monomeren Peptide zu Polymeren wahrscheinlich sind.

Schwankungen bei der IL-10 Induktion traten auf, wenn die Vorversuche mit den kinetischen Versuchen verglichen wurden, obwohl die PBMCs von denselben Spendern mit der gleichen Charge von denselben ISU-Polymeren behandelt wurden. Die PBMCs von C.K. induzierten beim Vorversuch 350 pg/ml (Abbildung 3.5) und bei der Kinetik 310 pg/ml (Abbildung 3.6A), die PBMCs von M.E. beim Vorversuch 750 pg/ml (Abbildung 3.5) und in der Kinetik 480 pg/ml (Abbildung 3.6C). Der Spender war zwar in einem gesunden Zustand, jedoch könnte der Immunstatus des Spenders an den jeweiligen Zeitpunkten der Blutabnahme unterschiedlich gewesen sein. Es könnte zu einem Zeitpunkt der Blutabnahme ein vorhandener Infekt, der im Spender nicht gleich zu einem Symptom geführt hat, nicht ausgeschlossen werden. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses des HIV-ISU-Peptids auf die IL-10 Produktion humaner PBMCs ist daher eine Standardisierung des Immunstatus

von Spendern nötig, wie z.B. durch die Überprüfung der Zusammensetzung der isolierten PBMC-Population mittels Durchflusszytometrie. Statt PBMCs kann dafür eine monozytäre Zelllinie, wie z.B. MONO-MAC-1 (Steube *et al.*, 1997) oder MV4-11 (Lange *et al.*, 1987) etabliert werden, wodurch spender-abhängige Schwankungen umgangen werden können.

Obwohl die Hochregulation der IL-10 Sekretion auf Proteinebene in den mit HIV-ISU-Homopolymeren inkubierten PBMCs durch die Zytokinarrays und die durchgeführten Kinetiken festgestellt werden konnte, konnte IL-10 auf RNA-Ebene im Microarray jedoch unter den 385 hochregulierten Genen nicht detektiert werden. Um diese Beobachtung und darüber hinaus den Zusammenhang zwischen der Genexpression von IL-10 und den anderen im Microarray herunter- (TREM-2, CXCL-9 und FCN1) sowie hochregulierten (IL-6, TREM-1 und MMP-1) Genen bzw. Zytokinen hinsichtlich Immunsuppression und Signaltransduktion zu analysieren, wurde der zeitliche Verlauf der Genexpressionsmuster von IL-10 mittels real time RT-PCR Analyse weiter untersucht.

So konnte die höchste IL-10 Expression in einem Zeitraum zwischen 6 h und 8 h detektiert werden (Abbildung 3.7A und 3.7C). Die geringe zeitliche Verschiebung könnte auf den unterschiedlichen Immunstatus der Spender oder auf den unterschiedlichen Kopplungsansatz zurückgeführt werden. Dabei ist es auffällig, dass der Höchstwert (9,6-fach) der Expression von IL-10 mRNA bei der Kinetik mit den PBMCs von C.K. (Blutentnahme 1) noch höher ist als der in Kinetik mit den PBMCs von M.E. (4,2-fach), obwohl die maximale IL-10 Konzentration im Zellkulturüberstand in der Kinetik mit Spender M.E. (480 pg/ml) höher als die in der Kinetik mit Spender C.K. (220 pg/ml) ist. Dieser Befund bedarf weiterer Untersuchungen.

Des Weiteren konnte durch die beiden Kinetiken festgestellt werden, dass die Expression von IL-10 mRNA nach 24 h wieder das Ausgangsniveau erreichte, sodass kein signifikanter Unterschied der IL-10 Expression mit der in unbehandelten PBMCs detektiert werden konnte. Deshalb wurde IL-10 im Microarray nicht als hochreguliertes Gen detektiert, obwohl dessen erhöhte Sekretion in den Zytokinarrays beobachtet wurde.

4.2.2 Expression verschiedener zellulärer Gene in humanen PBMCs nach Behandlung mit HIV-1 ISU-Homopolymeren

Die in der Arbeitsgruppe durchgeführten Zytokinarrays zeigten, dass das ISU-Peptid von HIV-1, die Produktion von einer Vielzahl von Zytokinen in PBMCs modulieren kann. Um den Einfluss des ISU-Peptids auf die Expression von zellulären Genen zu untersuchen, wurde das Genexpressionsmuster von 29098 humanen Genen im Microarray mit den RNAs von

PBMCs, die für 24 h mit HIV-1 ISU-Polymeren behandelt worden waren, analysiert (1.2.3). Dadurch konnte die Herunterregulation von 361 Genen sowie die Hochregulation von 385 Genen detektiert werden. Das Genexpressionsmuster der herunterregulierten Gene TREM-2, CXCL-9 und FCN1, sowie der hochregulierten IL-6, TREM-1 und MMP-1 wurde in Kinetiken auf mRNA-Ebene mittels real time RT-PCR genauer untersucht.

4.2.2.1 IL-6

Für das Zytokin IL-6 wurde sowohl in den Zytokinarrays als auch im Microarray eine Hochregulation gezeigt, im Microarray als das am stärksten hochregulierte Gen (Lauck, 2008).

IL-6 ist ein multifunktionell und pathobiologisch wirkendes proinflammatorisches Zytokin (Heinrich *et al.*, 1990, Nishimoto *et al.*, 2006). Es wird vor allem von Monozyten/Makrophagen, aber auch von Endothel- und Epithelzellen freigesetzt (Van Snick, 1990). IL-6 wird bei akuten inflammatorischen Reaktionen durch Infektionen, wie z.B. HIV-1, Gewebhypoxie und Trauma schnell und massiv freigesetzt (Song und Kellum, 2006). So sezernieren Monozyten/Makrophagen bereit innerhalb von 6 h nach Bakterienkontakt IL-6 (Ng *et al.*, 2006). Die Halbwertszeit im Serum liegt im Minutenbereich (Ng *et al.*, 2006). Bedingt durch diese Eigenschaft wird IL-6 als Prognosemarker bei akuten septischen Krankheitsbildern genutzt (Engelmann, 2006; Ng *et al.*, 2006). Die IL-6 Produktion wird durch IL-1, TNF- α , LPS, INF- β , PKC und virale Nukleinsäure induziert, während sie durch IL-10, IL-4 und IL-13 inhibiert wird (Song und Kellum, 2006; Mosser und Zhang, 2008).

Die schnelle Veränderung der Expression von IL-6 (Jones, 2005) konnte auch bei den Kinetiken nach der Inkubation mit verschiedenen HIV-ISU-Homopolymeren auf mRNA-Ebene beobachtet werden (Abbildung 3.11). Bei den PBMCs von Spender C.K. (Blutentnahme 1) wurde die Expression von IL-6 innerhalb von 3 h 50-fach hochreguliert sowie bei Spender C.K. (Blutentnahme 2) nach 4 h 130-fach, und bei den PBMCs von Spender M.E. nach 4 h 25-fach im Vergleich zu den unbehandelten PBMCs. Weiterhin wurde dabei eine signifikant hohe Expression von IL-6 mRNA im Vergleich zu der Expression von IL-10 (Abbildung 3.7) gezeigt, die zu einer massiven IL-6 Sekretion führen kann. Die maximale Hochregulation bei den PBMCs von Spender C.K. (Blutentnahme 1) ist 980-fach, die bei Spender C.K. (Blutentnahme 2) 560-fach, und bei den PBMCs von Spender M.E. 52-fach.

Wie in Kapitel 4.2.1 erwähnt, kann die IL-6 Produktion durch IL-10 gehemmt werden (Moore *et al.*, 1993; Mosser und Zhang, 2008). Das lässt sich auch bei den Analysen der IL-6

Expression in PBMCs von Spender M.E. beobachten (Abbildung 3.11C). Beim Expressionsmuster von IL-6 fällt auf, dass zwei Peaks (erster nach 8 h und zweiter 18 h) und dazwischen ein schneller An- und Abstieg zu beobachten waren.

Bei der Analyse der Expressionsmuster von IL-10 bei derselben Kinetik (Abbildung 3.7C) konnte beobachtet werden, dass der erste Peak von IL-6 nach der maximalen IL-10 Expression (8 h) schnell verschwindet und der zweite Peak wieder auftritt, sobald die IL-10 Expression auf das Ausgangsniveau zurückgeht (18 h). Darüber hinaus korreliert die wesentlich schwächere Hochregulation der Expression von IL-6 im Vergleich zu den beiden anderen Kinetiken (Abbildung 3.11A und 3.11B), mit der hohen IL-10 Konzentration im Kulturüberstand (Abbildung 3.6C). Diese Beobachtungen ließen eine hemmende Auswirkung des Zytokins IL-10 auf IL-6 vermuten.

Takeshita *et al.* konnten bereits die Verbindung zwischen der IL-10 Hochregulation und der IL-6 Herunterregulation nach der Inkubation mit dem rekombinanten HIV-1 gp41 in Monozyten mittels ELISA beobachten (Takeshita *et al.*, 1995). Bei dem Experiment wurde die IL-6 Sekretion im Kulturüberstand herabgesetzt, als die IL-10 Produktion nach 5 Tagen eine signifikante Erhöhung zeigte. Bei einer mit felinem Immundefizienzvirus (FIV) und *Toxoplasma gondii* infizierten Katzen konnte ähnliche Beobachtungen gemacht werden (Levy *et al.*, 2004).

4.2.2.2 CXCL-9

Die Expression von CXCL-9 war in den Zytokinarrays durch HIV-ISU-Polymere reduziert (1.2.2). Da die Genexpression von CXCL-9 ebenfalls im Microarray eine Herunterregulation zeigte (1.2.3), wurde das Genexpressionsmuster im Rahmen einer 24-Stunden Kinetik genauer untersucht.

CXCL-9 bildet mit CXCL-10 und CXCL-11 eine Gruppe homologer Chemokine, die nach einer Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin INF- γ im Rahmen von T_h1-Typ Immunantworten produziert werden. Unter anderem ist CXCL-9 ein potenter Chemoattraktant für T_h1-Lymphozyten und spielt eine wichtige Rolle für ihre Rekrutierung und Aktivierung (Farber, 1990 und 1997; Colvin *et al.*, 2004). Dieses inflammatorische Chemokin CXCL-9 wird von Makrophagen, auch in geringem Umfang durch neutrophile Granulozyten produziert und die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-4 wirken dabei als negative Modulatoren (Gasperini *et al.*, 1999).

Die Analyse der CXCL-9 Expression in PBMCs nach Behandlung mit dem HIV-ISU-Homopolymer, in Form einer Kinetik über einen Zeitraum von 24 h, zeigte keine

Herunterregulation, sondern eher eine Hochregulation zu einem Zeitpunkt nach 6 h um einen Faktor von 11,5 (Abbildung 3.9). Eine kurze Halbwertszeit von CXCL-9 (24 min; Lambeir *et al.*, 2001) könnte eine Erklärung für die in den Zytokinarrays beobachtete Herunterregulation sein. In dem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass CXCL-9 auf mRNA-Ebene nach einer maximalen Hochregulation bei 6 h weiterhin eine signifikant hohe Expression zeigte (Abbildung 3.9). Des Weiteren wurde eine Induktion von CXCL-9 durch IFN- γ allein in Monozyten (Farber, 1997; Cole *et al.*, 1998) sowie in Kombination mit LPS in Neutrophilen festgestellt (Gasperini *et al.*, 1999). Um weitere Aussagen über diese Diskrepanz treffen zu können, ist es allerdings notwendig, das Genexpressionsmuster sowie die Sekretion von CXCL-9 durch weitere Kinetiken bzw. real time RT-PCR Analysen, und ELISA zu bestätigen.

Es ist bekannt, dass die CXCL-9 Produktion durch das Zytokin IL-10 unterdrückt wird (Gasperini *et al.*, 1999; Mosser und Zhang, 2008). In dieser Arbeit konnte eine Verbindung zwischen dem Genexpressionsmuster von CXCL-9 und dem von IL-10 beobachtet werden, ähnlich zu dem antagonistischen Verhältnis zwischen IL-6 und IL-10 (4.2.2.1). Die Expression von CXCL-9 zeigte erst eine Hochregulation nach 6-stündiger Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer, dann wurde eine Herunterregulierung und nach 24h wiederum eine leichte Hochregulation beobachtet (Abbildung 3.9). Allerdings sind weitere kinetische Untersuchungen, vor allem mit einem anderen Zeitfenster, notwendig, um eine sichere Aussage treffen zu können.

4.2.2.3 FCN1

Für die Expression von FCN1 (*collagen/fibrinogen domain-containing protein 1*) konnte im Microarray die stärkste Herunterregulation gezeigt werden (Abbildung 1.9).

FCN1 gehört zu den Ficolins, das sind animale Lektine mit Kollagen/Fibrinogen-ähnlichen Domänen. FCN1 ist ein sekretorisches Protein (Liu *et al.*, 2005) und wird überwiegend auf der Oberfläche humaner PBMCs exprimiert (Endo *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996; Cortez *et al.*, 2006). Es fungiert als ein phagozytotischer Rezeptor oder Adaptor für Pathogenerkennung, wobei es den Kohlenhydrat-Rest auf Pathogene erkennt (Matsushita *et al.*, 1996; Kenjo *et al.*, 2001; Endo *et al.*, 2007) sowie als ein Opsonin und fördert so die Phagozytose (Teh *et al.*, 2000).

Die im Microarray detektierte Herunterregulation konnte im Rahmen einer Kinetik über einen Zeitraum von 9 h verifiziert werden. Nach 9 h wurde die Expression von FCN1 in mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K176) behandelten PBMCs, im Vergleich zu den unbehandelten,

10-fach herunterreguliert (Abbildung 3.10). Die im Microarray beobachtete massive Abnahme der FCN1 Expression mit einem FC von -200 könnte aus der kontinuierlichen Herunterregulation bis zu 24 h resultieren.

Cortez *et al.* untersuchten mittels Microarray kinetische Genexpressionsmuster über einen Zeitraum von 6 h bei mit *Aspergillus fumigatus* infizierten humanen Monozyten *in vitro* und konnte zeigen, dass *A. fumigatus* wichtige Gene für die Wirtsabwehr und Immunmodulation koordiniert induzierte (Cortez *et al.*, 2006). Sie konnten ebenfalls eine signifikante Herunterregulation der FCN1 Expression nach 6 h beobachten. Des Weiteren konnte eine Hochregulation der Expression von IL-10 sowie MMP-1 beobachtet werden, ähnlich wie bei den mit dem HIV-ISU-Homopolymer inkubierten PBMCs zu sehen war.

Hinsichtlich der Funktion von FCN1 kann es nicht ausgeschlossen werden, dass das HIV-ISU-Homopolymer durch die Herunterregulation von FCN1 zu einen *escape mechanismus* von HIV-1 beiträgt. Darüber wird in Kapitel 4.3.4 weiter diskutiert.

4.2.2.4 TREM-1/-2

Im Microarray wurde TREM-1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 1*) durch das HIV-1 ISU-Polymer hochreguliert, während TREM-2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) dabei herunterreguliert wurde. Vor allem konnte in einem von der Arbeitsgruppe durchgeführten *yeast two-hybrid* screening TREM-1 als putativer Interaktionspartner für die auf HIV-1 gp41 basierenden Konstrukte Δ NHR und Δ rgp identifiziert werden (Scharf, 2008). Das Konstrukt Δ NHR umfasst die NHR-Region mit der ISU-Domäne und Δ rgp zusätzlich den Cystein-Loop sowie die CHR-Region.

TREM-1 ist ein Oberflächenrezeptor, der überwiegend auf der Oberfläche von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen exprimiert wird (Dower *et al.*, 2008). Es gibt zwei Formen von TREM-1, ein membranständiges und ein lösliches (sTREM-1; GeneBank Accession No. AY074783). TREM-1 spielt eine Rolle sowohl bei der angeborenen als auch erworbenen Immunantwort (Bleharski *et al.*, 2003), wobei der Ligand auf der Zelloberfläche noch nicht charakterisiert werden konnte (Colonna und Facchetti, 2003). Hierbei kann TREM-1 die durch Toll-like-Rezeptoren (TLRs) initiierten inflammatorischen Antworten amplifizieren sowie die Sekretion proinflammatorischer Chemokine (IL-8, CCL2 und CCL3), die in die Rekrutierung von proinflammatorischen T_h1-Zellen involviert sind, auslösen (Bleharski *et al.*, 2003; Colonna und Facchetti, 2003). Somit wird TREM-1 als Verstärker der inflammatorischen Immunantwort betrachtet. Auf transkriptioneller Ebene wird TREM-1

durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und PU.1 reguliert (erhöht wird, was zur Verstärkung der proinflammatorischen Immunantwort führen kann (Tessarz und Cerwenka, 2008).

TREM-2 ist ein Oberflächenrezeptor, der auf Makrophagen, dendritischen Zellen, Mikroglia und Präosteoklasten (Colonna *et al.*, 2007) exprimiert wird. Eine Spleiß-Variante (TREM-2V; GeneBank Accession No. AB062787) wurde von Begum *et al.* als putative lösliche Form von TREM-2 beschrieben (Begum *et al.*, 2004). Die Funktion von TREM-2 wurde bei der Aktivierung der von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen und bei der Regulierung von Osteoklast-Entwicklung beschrieben (Colonna und Facchetti, 2003). Vor allem wirkt TREM-2 im Gegensatz zu TREM-1 antiinflammatorisch und Phagozytose-fördernd (Takahashi *et al.*, 2005). Hierbei haben Turnbull *et al.* in einem *knock-out* Experiment mit Mäusen gezeigt, dass TREM-2 die Produktion von TLR-induzierten Zytokinen in Makrophagen inhibiert (Turnbull *et al.*, 2006). Eine antiinflammatorische Rolle für TREM-2 wurde auch während neurodegenerativen Prozessen postuliert, wodurch die apoptotischen Neuronen ohne Inflammation eliminiert werden konnten (Takahashi *et al.*, 2005; Piccio *et al.*, 2007). Hamerman *et al.* konnten zeigen, dass ein TREM-2 Fc Fusionsprotein an Makrophagen bindet, was darauf hindeutet, dass Makrophagen einen Liganden für TREM-2 exprimieren könnten, der ebenso wie für TREM-1 noch nicht weiter charakterisiert werden konnte. Somit kann die Interaktion von TREM-2 und seinem Liganden ein inhibitorisches Signal, welches die inflammatorischen Antworten reduzieren kann, zur Folge haben (Hamerman *et al.*, 2006).

Wie bereits erwähnt konnte die Auswertung der Duplex real time RT-PCR von TREM-1 sowie TREM-2 mit GAPDH nicht nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Livak und Schmittgen durchgeführt werden (2001). Anhand dieser Methode erfolgte die Quantifizierung der Expression des zu untersuchenden Gens durch Normalisierung mit den CT-Werten des „house-keeping“ Gens GAPDH. Es hatte sich im Laufe der Arbeit gezeigt, dass die Expression von TREM-2 bei den unbehandelten PBMCs (Kontrolle) im Verlauf der 24-stündigen Kinetik stets zunahm, während die TREM-2 Expression bei den mit dem ISU-Peptid behandelten auf einem Level blieb (Abbildung 3.8). Im Gegensatz dazu zeigte die Expression von TREM-1 nach 24 h in der Kontrolle eine Abnahme, die TREM-1 Expression der ISU-behandelten Zellen blieb ebenfalls auch hier auf einem Niveau (Abbildung 3.12). Da in dem Fall die Genexpressionen beider TREMs in den behandelten Zellen nicht auf die Expression in den unbehandelten Zellen bezogen werden konnte, wurden deren Genexpressionen mit ΔCT -Werten (GAPDH CT - TREMs CT) dargestellt.

So konnte gezeigt werden, dass die Expression von TREM-1 sowie TREM-2 in mit HIV-ISU-Homopolymeren behandelten PBMCs bis zu 24 h relativ konstant blieben. Allerdings lagen die Δ CT-Werte von TREM-2 im negativen Bereich und die von TREM-1 im positiven Bereich, was eine geringere Expression von TREM-2 sowie eine stärkere Expression von TREM-1 im Vergleich zu der von GAPDH demonstriert. Währenddessen nahm die Expression von TREM-2 in unbehandelten PBMCs ständig zu.

Durch die kinetische Analyse konnte gezeigt werden, dass das HIV-ISU-Homopolymer in der Lage ist, die Hochregulation von TREM-2 sowie die Herunterregulation von TREM-1 in PBMCs zu verhindern. Daher wurden im Microarray TREM-2 als herunterreguliertes sowie TREM-1 als hochreguliertes Gen detektiert, da die Werte auf die von unbehandelten PBMCs bezogen waren.

Eine antagonistische Genexpression von TREM-1/-2 konnte auch nach Stimulation mit LPS in Monozyten beobachtet werden (Bouchon *et al.*, 2001; Turnbull *et al.*, 2006). Weiterhin wurde gezeigt, dass TREM-1 bei einer Stimulation mit immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 oder TGF- β schnell herunterreguliert wird, während die proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-18 eine Hochregulation von TREM-1 induzieren (Bouchon, 2002). Des Weiteren wurde berichtet, dass durch die Aktivierung von TREM-1 in Monozyten die Produktion von IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 und TNF- α erhöht wird, was zur Verstärkung der proinflammatorischen Immunantwort führen kann (Tessarz und Cerwenka, 2008).

4.2.2.5 MMP-1

MMP-1 gehört zur Familie der Matrix-Metalloprotease, die an der Degradation von extrazellulärer Matrix (ECM) beteiligt sind (Huang *et al.*, 2008). Es wird von vielen verschiedenen Zelltypen, unter anderem von Monozyten/Makrophagen, Endothel-/Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert (Woessner und Nagase, 2000). MMP-1 spielt eine wichtige Rolle beim Abbau von ECM-Bestandteilen wie Kollagen (Saffarian *et al.*, 2004), aber baut auch viele Nicht-Matrix-Substrate und Zelloberflächenmoleküle ab, wie z.B. das proinflammatorisch wirkende IL-1 β sowie MCP (*monocyte chemoattractant protein*)-1/-2/-4, was auf eine Rolle in der Regulation von entzündlichen Reaktionen hindeutet (McCawley *et al.*, 2001; Pardo und Selman, 2005). Vor allem induzieren eine Vielzahl von Zytokinen (z.B. IL-4/-5/-6/-8/-10) sowie Wachstumsfaktoren die Expression von MMP-1 (Pardo and Selman, 2005).

Die im Microarray beobachtete Hochregulation von MMP-1 konnte in der vorangegangenen Arbeit bestätigt werden (Lauck, 2008). Vor allem wurde eine Hochregulation von MMP-1 in

MDMs (*monocyte derived macrophages*) nach der HIV-1 Infektion *in vitro* mit zellfreiem, viralem Inokkulum (Ghorpade *et al.*, 2001) und ebenfalls nach der Infektion mit HIV-1_{Ba-L} Isolate (Webster und Crowe, 2006) beobachtet. Die Induktion von MMP-1 könnte neben IL-10 als zusätzlicher Marker für die Bestimmung der Funktionalität der HIV-ISU-Polymere genutzt werden, da diese auf der Präsenz von IL-10 beruht. Der Einsatz einer IL-10 spezifischen siRNA zeigte, dass dann auch kein MMP-1 mehr produziert wird (Lauck, 2008). Durch die kinetische Analyse konnte bestätigt werden, dass die MMP-1 Expression durch das HIV-RAN-Homopolymer induziert, aber nicht in unbehandelten PBMCs detektiert wird (Abbildung 3.13). Das Fehlen der MMP-1 Expression in unbehandelten PBMCs stimmt mit der Beschreibung von Pardo und Selman überein, dass MMP-1 nicht in ruhendem, normalem Gewebe detektiert werden kann, da es wegen seiner degradativen Eigenschaft nicht konstitutiv exprimiert und dessen Transkript nicht gelagert wird (Pardo and Selman, 2005).

4.3 Expression von IL-10, IL-6, CXCL-9, FCN1, TREM-1/-2 und MMP-1 bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs *in vitro*

Im Rahmen der durchgeführten Kinetiken konnte nachgewiesen werden, dass das HIV-1 ISU-Peptid in der Lage ist, einzelne Genexpressionsmuster nach Inkubation von PBMCs zu verändern. In einem zweiten großen Teil der Arbeit sollte nun der direkte Einfluss von HIV-1 auf die Modulation dieser Genexpression (IL-10, IL-6, TREM-1/-2, CXCL-9, FCN1 und MMP-1) nach Infektion von PBMCs gesunder Spender mittels real time RT-PCR Analyse untersucht werden. Da die CT-Werte vom Referenz-Gen, GAPDH, relativ konstant blieben, konnten die CT-Werte von untersuchten Genen weiter durch die von GAPDH normalisiert werden.

Mit den folgenden Vorkenntnissen kann rechnerisch ermittelt werden, dass die in den jeweiligen Kinetiken eingesetzte Charge der HIV-1 ISU-Peptide (25 µg/ml) der Menge der HIV-1 ISU-Domäne von ca. $2200000 \times 10^{7,9}$ Viren entspricht.

- 14 ± 7 Spikes pro Virus (Burton, 2006)
- trimere Bildung von gp41 pro Spike
- berechnete Größe einer ISU-Domäne bzw. -Peptid 2,3 kDa

Vergleicht man die in den jeweiligen Infektionsversuchen eingesetzte Zahl an Viren, entspricht die Menge des Peptids etwa 2200000-fach mehr Viren im Vergleich zu der im Versuch I ($1 \times 10^{7,9}$ Viren) und 160000-fach in den Versuchen II sowie III ($14 \times 10^{7,9}$ Viren).

Daher kann die Stärke der Effekte des HIV-1 ISU-Peptids auf die zellulären Genexpression nicht direkt mit der von der Virusinfektion verglichen werden. Vor allem können die veränderte Genexpressionsmuster in den mit HIV-infizierten PBMCs auf verschiedenen anderen Faktoren, wie z.B. gp120, zurückgeführt werden.

4.3.1 Analyse der IL-10 Expression bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs

Nach der Infektion von humanen PBMCs gesunder Spender mit einem HIV-1_{Ba-L} sowie einem HIV-1_{III B} Stamm konnte eine Hochregulation der IL-10 Expression mittels real time RT-PCR bestätigt werden: eine 2,5-fache Hochregulation im Versuch I nach 7 Tagen, eine 13-fache im Versuch II nach 4 Tagen und eine 4,4-fache im Versuch III nach einem Tag (Abbildung 3.17).

Wie mehrfach erwähnt, ist eine erhöhte Sekretion von IL-10 bei HIV-1 Infizierten bekannt (Navikas *et al.*, 1995). Chehimi *et al.* zeigten bei HIV-1 infizierten PBMCs *in vitro* eine schnelle, transiente Induktion der IL-10 Produktion (Chehimi *et al.*, 1996). Dabei konnten sie beobachten, dass die IL-10 Produktion von den produzierenden Zellen und den viralen Stämmen abhängig ist. Ji *et al.* konnten bestätigen, dass verschiedene HIV-1 Isolate, wie z.B. HIV-1₂₁₃, HIV-1_{Ba-L}, HIV-1_C und HIV-1_{AC-1}, ein unterschiedliches Ausmaß der IL-10 Sekretion induzieren konnten (Ji *et al.*, 2005). Diese Stamm-abhängige IL-10 Expression wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Weiterhin zeigten Akridge *et al.*, dass die Expression der IL-10 mRNA innerhalb von 3 h bis 12 h nach Infektion mit HIV-1_{Ba-L} in Makrophagen und die Sekretion von IL-10 im Kulturüberständen nach 12 h detektiert werden konnten (Akridge *et al.*, 1994).

Dennoch konnte gezeigt werden, dass sowohl zeitlich als auch im Ausmaß unterschiedliche IL-10 Induktionen mit den Provirusintegrationen in das Genom der PBMCs in allen Versuchen korrelierten. Hierbei konnte im Versuch I die Provirusintegration mittels PCR Analyse nach 12 h nachgewiesen werden, aber die Bandenintensität nahm bis zu 7 Tagen ständig zu, was auf weitere neue Infektionen zurückzuführen ist (Abbildung 3.14). Dieser Zusammenhang konnte in den Versuchen II sowie III noch deutlicher beobachtet werden. Hierbei wurde generell im Versuch II eine wesentlich höhere Anzahl an Proviren als im Versuch III festgestellt (Abbildung 3.16) und dementsprechend konnte im Versuch II eine signifikant stärkere IL-10 Expression als im Versuch III beobachtet werden (Abbildung 3.17B und 3.17C).

4.3.2 Analyse der IL-6 Expression bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs

Eine Hochregulation der IL-6 Expression konnte in HIV-1_{Ba-L} sowie HIV-1_{III B} infizierten PBMCs beobachtet werden. Es zeigte sich eine stärkere Induktion von IL-6 als von IL-10, was bereits in mit HIV-ISU-Peptiden behandelten PBMCs zu beobachten war. Allerdings konnte hier nur ein Peak detektiert werden. So zeigt das Genexpressionsmuster von IL-6 und IL-10 im Versuch II (Abbildung 3.18B und 3.17B) eine Hochexpression von IL-6 nach 3 Tagen. Die Expression verringerte sich nach 4 Tagen, während die IL-10 Expression am 4. Tag einen Peak mit einem maximalen Wert zeigte. Diese Herunterregulation der IL-6 Expression könnte auf die Hemmung durch das immunregulatorisch wirkende IL-10 zurückgeführt werden.

Eine Hochregulation von IL-6 Expression sowohl nach einer HIV-1 Infektion von Leukozyten *in vitro* (Merill und Martinez-Maza, 1995) als auch bei HIV-1 Infizierten (Stacey *et al.*, 2009) wurde beschrieben. Die verzögerte Induktion vom IL-10 im Vergleich zu dem proinflammatorischen Zytokin IL-6 wurde ebenfalls in einer akuten Infektion mit HIV-1 beobachtet (Stacey *et al.*, 2009). Vor allem konnte Takeshita *et al.* nach Inkubation von Monozyten mit rekombinantem HIV-1 gp41 nachweisen, dass die IL-10 Hochregulierung die Expression von IL-6 hemmt (Takeshita *et al.*, 1995).

4.3.3 Analyse der CXCL-9 Expression bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs

Die Analyse der CXCL-9 Expression in einer 24-Stunden Kinetik nach der Behandlung der PBMCs mit HIV-ISU-Homopolymer zeigte eine leichte Hochregulation von CXCL-9 (4.2.2.2). Ebenfalls konnte bei PBMCs nach der HIV-1_{Ba-L} Infektion eine leichte Hochregulation von CXCL-9 mit einem Faktor von 2 nach 7 Tagen beobachtet werden (Abbildung 3.19). Aufgrund der verzögerten Durchinfektion der PBMCs und dementsprechend schwacher sowie verzögerter Induktion (erst nach 7 Tagen) von CXCL-9- und IL-10-Expression konnte allerdings keine unterdrückende Wirkung von IL-10 auf CXCL-9 beobachtet werden.

Für die HIV und SIV Infektion konnte bereits eine Hochregulation der INF- γ -induzierbaren Chemokine CXCL-9 und CXCL-10 gezeigt werden (Reinhart *et al.*, 2002; Roe *et al.*, 2007). Bei fortgeschrittener HIV-1 Infektion wurde ebenfalls ein hoher Level von CXCL-9 und

CXCL-10 im Plasma beobachtet, währenddessen nur ein niedriger Level in Lymphknoten detektiert werden konnte (Brainard *et al.*, 2007).

4.3.4 Analyse der FCN1 Expression bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs

Die nach der Behandlung mit dem HIV-ISU-Homopolymer beobachtete Herunterregulation der FCN1 Expression in PBMCs (4.2.2.3) konnte ebenfalls bei mit HIV-1_{Ba-L} infizierten PBMCs beobachtet werden (Abbildung 3.20). Diese Korrelation könnte eine Möglichkeit hinweisen, dass bei der Herunterregulation von FCN1 in HIV-1 infizierten PBMCs die ISU-Domäne von HIV-1 gp41 aktiv mitwirkt.

Bis jetzt wurde allerdings noch kein Zusammenhang zwischen diesem neuen Lektin, FCN1, und der HIV-1 Pathogenese berichtet. Dennoch initiiert FCN1, assoziiert mit Mannose-bindendem Lektin (MBL) und mit der MBL-assozierten Serinprotease (MASP) den Lektin-Komplement-Signalweg (Matsushita *et al.*, 2000). Das MBL kann das stark glykosylierte gp120 binden und HIV opsonieren, wodurch während der HIV-1 Infektion die virale Antigenpräsentation verändert werden kann (Ezekowitz *et al.*, 1989). MBL-Defizienz führt zu einer 3- bis 8-fach höheren Akquisition von HIV Infektionen (Dommett *et al.*, 2006).

Da FCN1 mit MBL (genannt auch Mannose-bindendem Protein = MBP) strukturelle sowie funktionelle Ähnlichkeit aufweist, kann es nicht ausgeschlossen werden, dass FCN1 bei der HIV Infektion sich ähnlich wie MBL verhält.

4.3.5 Analyse der TREM-1/-2 Expression bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs

Die Expression von TREM-1/-2 nach der Infektion mit HIV-1_{Ba-L} bzw. HIV-1_{III_B} zeigte keine Veränderungen der Genexpressionsmuster, wie sie nach der Behandlung mit ISU-Peptiden beobachtet werden konnten. Wie in Kapitel 4.3 beschrieben, sind die Menge der ISU-Domäne von gp41 der eingesetzten Viren extrem wenig im Vergleich zu der Menge der eingesetzten Peptide und die Messzeiträume sowie -abstände waren bei den Versuchen anders. Allerdings konnte in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Expression von TREM-2 in den infizierten PBMCs im Vergleich zu den uninfizierten PBMCs gering ist.

4.3.6 Analyse der MMP-1 Expression bei HIV-1 infizierten humanen PBMCs

Während gezeigt werden konnte, dass das HIV-ISU-Homopolymer in der Lage ist, die Expression von MMP-1 zu induzieren (4.2.2.5), konnte aber weder nach Infektion mit HIV-1_{Ba-L} noch mit HIV-1_{III B} von PBMCs eine Expression von MMP-1 detektiert werden, obwohl eine Hochregulation der IL-10 sowie IL-6 Expression beobachtet wurde (Abbildung 3.17 und 3.18), wodurch wiederum eine MMP-1 Expression induziert werden könnte (Pardo and Selman, 2005).

In diesem Zusammenhang konnten Webster und Crowe zwar eine erhöhte MMP-1 Expression in HIV-1_{Ba-L} infizierten MDMs (*monocyte derived macrophages*) zeigen, aber erwähnten dabei, dass die Produktion von MMP nach der HIV-1 Infektion eine komplizierte Veränderung zeigte und daher bei den anderen kinetischen Studiendesigns seiner Arbeitsgruppe keine MMP Produktion detektiert werden konnte (Webster und Crowe, 2006). Der Grund dafür könnte sein, dass die MMP-1 Expression stringent reguliert wird, wie z.B. bei Transkription und posttranskriptioneller Modifikation, und durch exogene Inhibitoren. Vor allem kann die Halbwertszeit der mRNAs reguliert werden (Hijova, 2005). Die Beschreibung von Webster und Crowe könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass im Rahmen dieser Infektionskinetiken keine MMP-1 Expression detektiert werden konnte.

4.4 Einfluss der HIV-1 Proviruslast in humanen PBMCs auf die Genexpression

Mittels real time PCR mit *gp41* spezifischen Primern und Sonden wurde die Kopienzahl der Proviren in mit HIV-1_{III B} infizierten PBMCs über einen Zeitraum von 1 Tag bis 7 Tagen im Rahmen der Versuche II und III quantifiziert (Abbildung 3.16).

Die vorher 3 Tage lang mit den T-Zell-Proliferations-stimulierend wirkenden PHA und IL-2 (Potter und Moore, 1975; Kinter *et al.*, 1995) behandelten PBMCs in Versuch II zeigten eine signifikant höhere Anzahl an Proviren als die unstimulierten PBMCs in Versuch III (Abbildung 3.16). Eine durchschnittliche Kopienzahl von HIV-1 proviraler DNA pro 10⁶ PBMCs betrug mit Stimulierung 400×10^4 (entspricht 4 Proviren pro Zelle), ohne Stimulierung 1×10^4 . Eine Mehrfach-Infektion (d.h. in anderen Chromosomen) in stimulierten PBMCs ist häufig zu beobachten (Katz *et al.*, 2003; Gelderblom *et al.*, 2008). So konnte eine positive Auswirkung der Stimulation mit PHA und IL-2 auf die Produktivität der HIV-1 Infektion bzw. Integration viraler DNA in das zelluläre Genom gezeigt werden. Diese

Beobachtung stimmt mit der Eigenschaft von HIV überein, dass das HIV ruhende T-Zellen zwar infizieren, aber virale DNA in diese Zellen nicht integrieren kann (Stevenson *et al.*, 1990). Daher ist bei Experimenten mit HIV eine Stimulation der Zellen mit PHA sowie IL-2 für 3 Tage üblich. Mascola *et al.* berichteten aber, dass sich die Suszeptibilität von PBMCs für HIV-1 Infektion durch eine eintägige PHA-Stimulation, im Vergleich zu der dreitägigen, erhöht werden kann (Mascola *et al.*, 1999). Weiterhin zeigten Vatakis *et al.*, dass die vor der viralen Infektion für einen Tag mit anti-CD3 und anti-CD28 stimulierten T-Zellen im Vergleich zu den für zwei Tage stimulierten Zellen eine verzögerte Integration des viralen Genoms demonstrieren (Vatakis *et al.*, 2009). Diese unterschiedliche Produktivität der HIV-1 Infektion kann aus dem unterschiedlichen Aktivationsstatus der T-Zellen nach den jeweiligen Stimulationsbedingungen resultiert sein. In den unterschiedlich stimulierten Zellen zeigten antiretrovirale Inhibitoren auch eine unterschiedliche Effizienz (Vatakis *et al.*, 2009).

Wie bei der Diskussion über IL-10 und IL-6 (4.3.1 und 4.3.2) beschrieben, konnte durch diese kinetischen HIV-1 Infektionsversuche ein Zusammenhang zwischen der Proviruslast und dem Ausmaß der veränderten Genexpressionsmuster beobachtet werden, was mit der Korrelation zwischen der Viruslast und der Progression zu AIDS übereinstimmt (Pantaleo *et al.*, 1993; Kundu und Merigan, 1994; Denner, 2000).

4.5 Das ISU-Peptid von HIV-1 und TGF- β 1

Huang und Huang konnten zeigen, dass eine verlängerte Version des immunsuppressiven Peptids, CKS-25, die Bindung von TGF- β 1 an die TGF- β -Rezeptoren auf der Nerzlungenepithelzell-Oberfläche hemmt (Huang und Huang, 1998). Da das ISU-Peptid von HIV-1 gp41 auch eine Sequenzhomologie zu TGF- β 1 aufweist (Huang und Huang, 1998) (Abbildung 1.10), wurde mittels Immunfluoreszenz-Analyse untersucht, ob das ISU-Peptid des HIV-1 gp41 mit TGF- β 1 um den Rezeptor konkurrieren und so mit der TGF- β -induzierten Signaltransduktion interferieren kann. Es konnte keine Bindung von TGF- β 1 sowie HIV-ISU- festgestellt werden.

5 Zusammenfassung

Wie die meisten Retroviren, ruft auch HIV-1 eine Immunsuppression in Infizierten hervor. Es gibt Hinweise darauf, dass das transmembrane Hüllprotein gp41 und dessen hoch konservierte immunsuppressive (ISU-) Domäne an der Immunpathogenese beteiligt sind. Mittels Zytokinarrays und Microarrays konnte gezeigt werden, dass das von der ISU-Domäne abgeleitete ISU-Peptid die Expression von Zytokinen sowie anderen zellulären Genen modulieren kann. Auf Grund dieser Daten wurde der Einfluss des ISU-Peptids auf die Expression verschiedener Gene bei humanen PBMCs in Kinetiken detailliert untersucht. Mittels real time RT-PCR und ELISA konnte festgestellt werden, dass die Expression der mRNA von IL-10 zwischen 6 h und 8 h das höchste Niveau erreichte, die Sekretion von IL-10 Protein im Laufe von 24 h jedoch stetig zunahm. Die mittels Microarray detektierte Hochregulation der Expression von IL-6 konnte mit Hilfe einer real time RT-PCR Analyse bestätigt werden, wobei zwei Peaks der mRNA Expression gezeigt wurden. Die sowohl im Zytokinarray, als auch im Microarray beobachtete Herunterregulation von CXCL-9 bedarf weiterer Untersuchungen. Die mittels Microarray gefundene Herunterregulation der Expression von FCN1 konnte bestätigt werden. Die mittels Microarray gezeigte Herunterregulation der Expression von TREM-2 und Hochregulation der Expression von TREM-1 konnte ebenfalls bestätigt werden. Allerdings hat sich gezeigt, dass es sich dabei um eine Verhinderung der Hochregulation von TREM-2 bzw. die Verhinderung der Herunterregulation von TREM-1 im Vergleich zu unbehandelten PBMCs handelt. Weiterhin konnte die Hochregulation von MMP-1 bestätigt werden. Eine Hochregulation der Expression von IL-10 und IL-6, sowie eine Herunterregulation der Expression von FCN1 konnte ebenfalls in HIV-1 infizierten PBMCs beobachtet werden. Allerdings ist unklar, ob die ISU-Domäne von gp41 die Expression dieser Gene in den infizierten PBMCs direkt beeinflusst.

Im weiteren Teil der Arbeit wurde untersucht, ob das ISU-Peptid an den TGF- β Rezeptor bindet und dabei die Bindung von TGF- β 1 an seinen Rezeptor verdrängt. Da allerdings keine Bindung des ISU-Peptids an die Oberfläche der verwendeten Nerzlungenepithelzellen gezeigt werden konnte, ist die Frage der Bindung der ISU-Domäne an einen putativen Rezeptor immer noch offen. Mit diesen Daten wurde ein Beitrag zum Verständnis des Einflusses der ISU-Domäne von HIV-1 auf die Zytokin- und Genexpression humaner PBMCs erbracht.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Paper

Akridge RE, Oyafuso LK, Reed SG., IL-10 is induced during HIV-1 infection and is capable of decreasing viral replication in human macrophages.
J Immunol. 1994 Dec 15;153(12):5782-9.

Akyüz L., Untersuchungen zur Induktion regulatorischer T-Zellen durch die transmembranen Hüllproteine von HIV-1 und anderer Retroviren.
Diplomarbeit, Freie Universität Berlin 2008

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.

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.

Balanovsky O, Pocheshkhova E, Pshenichnov A, Solovieva D, Kuznetsova M, Voronko O, Churnosov M, Tegako O, Atramentova L, Lavryashina M, Evseeva I, Borinska S, Boldyreva M, Dubova N, Balanovska E., Is spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5Delta32 allele formed by ecological factors?
J Physiol Anthropol Appl Human Sci. 2005 Jul;24(4):375-82.

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, Vézinet-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.

Begum NA, Ishii K, Kurita-Taniguchi M, Tanabe M, Kobayashi M, Moriwaki Y, Matsumoto M, Fukumori Y, Azuma I, Toyoshima K, Seya T., Mycobacterium bovis BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages.
Infect Immun. 2004 Feb;72(2):937-48.

Behrendt R, Immunsuppressive Eigenschaften transmembraner Hüllproteine von Retroviren.
Diplomarbeit, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald 2005

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.

Berkowitz RD, Goff SP., Analysis of binding elements in the human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA and nucleocapsid protein.
Virology. 1994 Jul;202(1):233-46.

Bess JW Jr, Powell PJ, Issaq HJ, Schumack LJ, Grimes MK, Henderson LE, Arthur LO., Tightly bound zinc in human immunodeficiency virus type 1, human T-cell leukemia virus type I, and other retroviruses.
J Virol. 1992 Feb;66(2):840-7.

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.

Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M., TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock.

Nature. 2001 Apr 26;410(6832):1103-7

Bouchon A., Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung von neuen DAP12-assoziierten Rezeptoren exprimiert von myeloiden Zellen.

Eberhard Karls Universität Tübingen 2002

Brainard DM, Tager AM, Misdraji J, Frahm N, Lichterfeld M, Draenert R, Brander C, Walker BD, Luster AD., Decreased CXCR3+ CD8 T cells in advanced human immunodeficiency virus infection suggest that a homing defect contributes to cytotoxic T-lymphocyte dysfunction.

J Virol. 2007 Aug;81(16):8439-50. Epub 2007 Jun 6.

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC, Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection.

Nat Med. 2006;12(12):1365-1371.

Broder S, Gallo RC. , A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS.

N Engl J Med. 1984 Nov 15;311(20):1292-7.

Brody BA, Kimball MG, Hunter E., Mutations within the transmembrane glycoprotein of Mason-Pfizer monkey virus: loss of SU-TM association and effects on infectivity.

Virology. 1994 Aug 1;202(2):673-83.

Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM., Correct integration of retroviral DNA in vitro.

Cell. 1987 May 8;49(3):347-56.

Bryant M, Ratner L., Myristoylation-dependent replication and assembly immunodeficiency virus 1.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jan;87(2):523-7.

Burton DR., Structural biology: images from the surface of HIV.

Nature. 2006 Jun 15;441(7095):817-8.

Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R., Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro.

Science. 1990 Sep 28;249(4976):1555-8.

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.

Chan DC, Kim PS., HIV entry and its inhibition.

Cell. 1998 May 29;93(5):681-4.

Chehimi J, Ma X, Chouaib S., Differential production of interleukin 10 during human immunodeficiency virus infection.

AIDS Res Hum Retroviruses. 1996 Aug 10;12(12):1141-9.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM., Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3.

J Exp Med. 2003, 198(12): 1875-1886.

Chen Y, Ali T, Todorovic V, O'leary JM, Kristina Downing A, Rifkin DB., Amino acid requirements for formation of the TGF-beta-latent TGF-beta binding protein complexes.

J Mol Biol. 2005 Jan 7;345(1):175-86.

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.

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.

Cicala C, Arthos J, Selig SM, Dennis G Jr, Hosack DA, Van Ryk D, Spangler ML, Steenbeke TD, Khazanie P, Gupta N, Yang J, Daucher M, Lempicki RA, Fauci AS., HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jul 9;99(14):9380-5. Epub 2002 Jun 27.

Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, *et al.*, Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science. 1986 Jul 18;233(4761):343-6.

Clerici M, Galli M, Bosis S, Gervasoni C, Moroni M, Norbiato G., Immunoendocrinologic abnormalities in human immunodeficiency virus infection. Ann N Y Acad Sci. 2000;917:956-61.

Coffin JM, Huges SH, Varmus HE., Retroviruses. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y. 1997

Coffin JM., Structure and classification of retroviruses. In: The retroviridae (Ed. JA Levy). Plenum Press, New York. 1992;pp 19-49.

Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K., Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. J Exp Med. 1998 Jun 15;187(12):2009-21.

Colonna M, Fachetti 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.

Colonna M, Turnbull I, Klesney-Tait J., The enigmatic function of TREM-2 in osteoclastogenesis. Adv Exp Med Biol. 2007;602:97-105.

Colvin RA, Campanella GS, Sun J, Luster AD., Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. J Biol Chem. 2004 Jul 16;279(29):30219-27. Epub 2004 May 17.

Cortez KJ, Lyman CA, Kottlil S, Kim HS, Roilides E, Yang J, Fullmer B, Lempicki R, Walsh TJ., Functional genomics of innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun. 2006 Apr;74(4):2353-65.

Couper KN, Blount DG, Riley EM., IL-10: the master regulator of immunity to infection. J Immunol. 2008 May 1;180(9):5771-7.

Cox DA, Maurer T., Transforming growth factor-beta. Clin Immunol Immunopathol. 1997 Apr;83(1):25-30.

Craven RC, Bennett RP, Wills JW., Role of the avian retroviral protease in the activation of reverse transcriptase during virion assembly. J Virol. 1991 Nov;65(11):6205-17.

Daecke J., Untersuchungen zur Rolle von Dynamamin beim Eintritt von HIV-1 in humane Zellen. Universität Hamburg 2002

Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA., The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. Nature. 1984 Dec 20-1985 Jan 2;312(5996):763-7.

- 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. 1991b 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. 1991a Oct 1;174(4):915-24.
- Denis M, Ghadirian E., Dysregulation of interleukin 8, interleukin 10, and interleukin 12 release by alveolar macrophages from HIV type 1-infected subjects.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1994 Dec;10(12):1619-27.
- Denner J, Kurth R., Infektionen bei Immunschwächen. In: Medizinische Mikrobiologie, ed. Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G.
Verlag Urban & Fischer 2001;793-811.
- 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, 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., How does HIV induce AIDS? The virus protein hypothesis.
J Hum Virol. 2000 Mar-Apr;3(2):81-2.
- Denner J., Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation.
Ann N Y Acad Sci. 1998 Dec 30;862:75-86.
- Denner J., Porcine endogenous retroviruses (PERVs) and xenotransplantation: screening for transmission in several clinical trials and in experimental models using non-human primates.
Ann Transplant. 2003;8(3):39-48.
- Dommett RM, Klein N, Turner MW., Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future.
Tissue Antigens. 2006 Sep;68(3):193-209.
- 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.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA., HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5.
Nature. 1996 Jun 20;381(6584):667-73.
- Dubay JW, Roberts SJ, Hahn BH, Hunter E., Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity.
J Virol. 1992 Nov;66(11):6616-25.
- 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.
- Ellis R, Langford D, Masliah E., HIV and antiretroviral therapy in the brain: neuronal injury and repair.
Nat Rev Neurosci. 2007 Jan;8(1):33-44.
- Endo Y, Matsushita M, Fujita T., Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis.
Immunobiology. 2007;212(4-5):371-9. Epub 2007 Jan 25.

- Endo Y, Sato Y, Matsushita M, Fujita T., Cloning and characterization of the human lectin P35 gene and its related gene.
Genomics. 1996 Sep 15;36(3):515-21.
- Engelmann L., Die Diagnose der Sepsis.
Intensivmed. 2006;43, 607.
- Evans DT, Desrosiers RC., Immune evasion strategies of the primate lentiviruses.
Immunol Rev. 2001 Oct;183:141-58.
- Ezekowitz RA, Kuhlman M, Groopman JE, Byrn RA., A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus.
J Exp Med. 1989 Jan 1;169(1):185-96.
- Fahlen L, Read S, Gorelik L, Hurst SD, Coffman RL, Flavell RA, Powrie F., T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells.
J. Exp. Med. 2005, 201 pp. 737-746.
- Farber JM., A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jul;87(14):5238-42.
- Farber JM., Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes.
J Leukoc Biol. 1997 Mar;61(3):246-57.
- Fauci AS., Immunopathogenesis of HIV infection.
J Acquir Immune Defic Syndr. 1993 Jun;6(6):655-62.
- Frankel AD, Young JA., HIV-1: fifteen proteins and an RNA.
Annu Rev Biochem. 1998;67:1-25.
- Freed EO, Myers DJ, Risser R., Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jun;87(12):4650-4.
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, *et al.*, Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS.
Science. 1984 May 4;224(4648):500-3.
- Gasperini S, Marchi M, Calzetti F, Laudanna C, Vicentini L, Olsen H, Murphy M, Liao F, Farber J, Cassatella MA., Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils.
J Immunol. 1999 Apr 15;162(8):4928-37.
- Gelderblom HC, Vatakis DN, Burke SA, Lawrie SD, Bristol GC, Levy DN., Viral complementation allows HIV-1 replication without integration.
Retrovirology. 2008 Jul 9;5:60.
- Gelderblom HR, Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function.
AIDS. 1991 Jun;5(6):617-37.
- 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.

- Gorelik L, Constant S, Flavell RA., Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation.
J Exp Med. 2002 Jun 3;195(11):1499-505.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A., Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency.
N Engl J Med. 1981 Dec 10;305(24):1425-31.
- Gottlieb RA, Kleinerman ES, O'Brian CA, Tsujimoto S, Cianciolo GJ, Lennarz WJ., Inhibition of protein kinase C by a peptide conjugate homologous to a domain of the retroviral protein p15E.
J Immunol. 1990 Oct 15;145(8):2566-70.
- Govinden R, Bhoola KD., Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta.
Pharmacol Ther. 2003 May;98(2):257-65.
- Hamerman JA, Jarjoura JR, Humphrey MB, Nakamura MC, Seaman WE, Lanier LL., Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12.
J Immunol. 2006 Aug 15;177(4):2051-5.
- Haraguchi S, Good RA, Day NK., Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns.
Immunol Today. 1995a Dec;16(12):595-603.
- Haraguchi S, Good RA, James-Yarish M, Cianciolo GJ, Day NK., Induction of intracellular cAMP by a synthetic retroviral envelope peptide: a possible mechanism of immunopathogenesis in retroviral infections.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995b Jun 6;92(12):5568-71.
- Harrell RA, Cianciolo GJ, Copeland TD, Oroszlan S, Snyderman R., Suppression of the respiratory burst of human monocytes by a synthetic peptide homologous to envelope proteins of human and animal retroviruses.
J Immunol. 1986 May 15;136(10):3517-20.
- Harris DT, Cianciolo GJ, Snyderman R, Argov S, Koren HS., Inhibition of human natural killer cell activity by a synthetic peptide homologous to a conserved region in the retroviral protein, p15E.
J Immunol. 1987 Feb 1;138(3):889-94.
- Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP., V3: HIV's switch hitter.
AIDS Res Hum Retroviruses. 2005 Feb;21(2):171-89.
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T., Interleukin-6 and the acute phase response.
Biochem J. 1990 Feb 1;265(3):621-36.
- 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.
- Henderson LE, Bowers MA, Sowder RC 2nd, Serabyn SA, Johnson DG, Bess JW Jr, Arthur LO, Bryant DK, Fenselau C., Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences.
J Virol. 1992 Apr;66(4):1856-65.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R., Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions.
Biotechnology (N Y). 1993 Sep;11(9):1026-30.
- Hijova E., Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications.
Bratisl Lek Listy. 2005;106(3):127-32.
- Honore C, Rørvig S, Munthe-Fog L, Hummelshøj T, Madsen HO, Borregaard N, Garred P., The innate pattern recognition molecule Ficolin-1 is secreted by monocytes/macrophages and is circulating in human plasma.
Mol Immunol. 2008 May;45(10):2782-9. Epub 2008 Mar 17.
- Hostomsky Z, Hostomska Z, Fu TB, Taylor J., Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1:

functionality of subunits of the heterodimer in DNA synthesis.
J Virol. 1992 May;66(5):3179-82.

Hu R, Oyaizu N, Than S, Kalyanaraman VS, Wang XP, Pahwa S., HIV-1 gp160 induces transforming growth factor-beta production in human PBMC.
Clin Immunol Immunopathol. 1996 Sep;80(3 Pt 1):283-9

Huang SF, Li YH, Ren YJ, Cao ZG, Long X., The effect of a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter on force-induced MMP-1 expression in human periodontal ligament cells.
Eur J Oral Sci. 2008 Aug;116(4):319-23.

Huang SS, Huang JS., A pentacosapeptide (CKS-25) homologous to retroviral envelope proteins possesses a transforming growth factor-beta activity.
J Biol Chem. 1998 Feb 27;273(9):4815-8.

Huseby D, Barklis RL, Alfadhli A, Barklis E.. Assembly of human immunodeficiency virus precursor gag proteins.
J Biol Chem. 2005 May 6;280(18):17664-70. Epub 2005 Feb 25.

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.

Ji J, Sahu GK, Braciale VL, Cloyd MW., HIV-1 induces IL-10 production in human monocytes via a CD4-independent pathway.
Int Immunol. 2005 Jun;17(6):729-36. Epub 2005 Jun 3.

Jones SA., Directing transition from innate to asquired immunity defining a role for IL-6.
J Immunol. 2005 Sep 15;175(6):3463-8.

Kadota J, Cianciolo GJ, Snyderman R., A synthetic peptide homologous to retroviral transmembrane envelope proteins depresses protein kinase C mediated lymphocyte proliferation and directly inactivated protein kinase C: a potential mechanism for immunosuppression.
Microbiol Immunol. 1991;35(6):443-59.

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.

Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT., The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus.
Nat Rev Microbiol. 2008 Feb;6(2):143-55.

Katz RA, Greger JG, Boimel P, Skalka AM., Human immunodeficiency virus type 1 DNA nuclear import and integration are mitosis independent in cycling cells.
J Virol. 2003 Dec;77(24):13412-7.

Katz RA, Skalka AM., The retroviral enzymes.
Annu Rev Biochem. 1994; 63: 133-173.

Keller C, Keller P, Marshal S, Pedersen BK., IL-6 gene expression in human adipose tissue in response to exercise - effect of carbohydrate ingestion.
J Physiol. 2003 Aug 1;550(Pt 3):927-31. Epub 2003 Jun 6.

Kenjo A, Takahashi M, Matsushita M, Endo Y, Nakata M, Mizuochi T, Fujita T., Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*.
J Biol Chem. 2001 Jun 8;276(23):19959-65. Epub 2001 Mar 20.

Kinter AL, Poli G, Fox L, Hardy E, Fauci AS., HIV replication in IL-2-stimulated peripheral blood mononuclear

cells is driven in an autocrine/paracrine manner by endogenous cytokines.
J Immunol. 1995 Mar 1;154(5):2448-59.

Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L., T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV.
Nature. 1984 Dec 20-1985 Jan 2;312(5996):767-8.

Kleinerman ES, Lachman LB, Knowles RD, Snyderman R, Cianciolo GJ., A synthetic peptide homologous to the envelope proteins of retroviruses inhibits monocyte-mediated killing by inactivating interleukin 1.
J Immunol. 1987 Oct 1;139(7):2329-37.

Koutsonikolis A, Haraguchi S, Brigino EN, Owens UE, Good RA, Day NK., HIV-1 recombinant gp41 induces IL-10 expression and production in peripheral blood monocytes but not in T-lymphocytes.
Immunol Lett. 1997 Feb;55(2):109-13.

Kundu SK, Merigan TC., Relationship of HIV-1 provirus load, CD8+ CD11+ T cells and HIV-1 envelope-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected asymptomatic offients.
Immunology. 1994 Sep;83(1):81-5.

Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA., Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.
Nature. 1998 Jun 18;393(6686):648-59.

Lambeir AM, Proost P, Durinx C, Bal G, Senten K, Augustyns K, Scharpé S, Van Damme J, De Meester I., Kinetic investigation of chemokine truncation by CD26/dipeptidyl peptidase IV reveals a striking selectivity within the chemokine family.
J Biol Chem. 2001 Aug 10;276(32):29839-45. Epub 2001 Jun 4.

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.

Lapatto R, Blundell T, Hemmings A, Overington J, Wilderspin A, Wood S, Merson JR, Whittle PJ, Danley DE, Geoghegan KF, *et al.*, X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes.
Nature. 1989 Nov 16;342(6247):299-302.

Lasky LA, Nakamura G, Smith DH, Fennie C, Shimasaki C, Patzer E, Berman P, Gregory T, Capon DJ., Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor.
Cell. 1987 Sep 11;50(6):975-85.

Lauck M., Interaktion des transmembranen Hüllproteins von HIV-1 mit humanen Immunzellen.
Diplomarbeit, Eberhard Karls Universität Tübingen 2008

Le Grice SF, Naas T, Wohlgensinger B, Schatz O., Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase.
EMBO J. 1991 Dec;10(12):3905-11.

Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, Smith SM, Derynck R., TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA.
EMBO J. 2007 Sep 5;26(17):3957-67. Epub 2007 Aug 2.

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.

Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ., Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells.
J Biol Chem. 1990 Jun 25;265(18):10373-82.

- Levy JK, Liang Y, Ritchey JW, Davidson MG, Tompkins WA, Tompkins MB., Failure of FIV-infected cats to control *Toxoplasma gondii* correlates with reduced IL2, IL6, and IL12 and elevated IL10 expression by lymph node T cells.
Vet Immunol Immunopathol. 2004 Mar;98(1-2):101-11.
- Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, Collins F, Shinn P, Leipzig J, Hannenhalli S, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD., Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection.
PLoS Pathog. 2006 Jun;2(6):e60. Epub 2006 Jun 23.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR., Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.
Cell. 1996 Aug 9;86(3):367-77.
- Liu Y, Endo Y, Iwaki D, Nakata M, Matsushita M, Wada I, Inoue K, Munakata M, Fujita T., Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway.
J Immunol. 2005 Sep 1;175(5):3150-6.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K., Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.
PCR Methods Appl. 1995 Jun;4(6):357-62.
- 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
- Lotz M, Seth P., TGF beta and HIV infection.
Ann N Y Acad Sci. 1993 Jun 23;685:501-11.
- Lu J, Tay PN, Kon OL, Reid KB., Human ficolin: cDNA cloning, demonstration of peripheral blood leucocytes as the major site of synthesis and assignment of the gene to chromosome 9.
Biochem J. 1996 Jan 15;313 (Pt 2):473-8.
- Mallet F, Prudhomme S., Retroviral inheritance in man.
J Soc Biol. 2004;198(4):399-412.
- Marx JL, New disease baffles medical community.
Science. 1982;217:618-21.
- Mascola JR, Lewis MG, Stiegler G, Harris D, VanCott TC, Hayes D, Louder MK, Brown CR, Sapan CV, Frankel SS, Lu Y, Robb ML, Katinger H, Birx DL., Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies.
J Virol. 1999 May;73(5):4009-18.
- 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.
- Massague J, Attisano L, Wrana JL., The TGF-beta family and its composite receptors.
Trends Cell Biol. 1994 May;4(5):172-8.
- Matsushita M, Endo Y, Fujita T., Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease.
J Immunol. 2000 Mar 1;164(5):2281-4.
- Matsushita M, Endo Y, Taira S, Sato Y, Fujita T, Ichikawa N, Nakata M, Mizuochi T., A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin.
J Biol Chem. 1996 Feb 2;271(5):2448-54.

- McCawley LJ, Matrisian LM., Tumor progression: defining the soil round the tumor seed.
Curr Biol. 2001 Jan 9;11(1):R25-7.
- McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR, Weissman IL., Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus.
Cell. 1988 Apr 8;53(1):55-67.
- Merill JE, Martinez-Maza O., Cytokines in AIDS-associated neurons and immune system dysfunction.
Neurobiology of Cytokines Part B. Methods in Neuroscience. 1995;243-266.
- Miller MA, Mietzner TA, Cloyd MW, Robey WG, Montelaro RC., Identification of a calmodulin-binding and inhibitory peptide domain in the HIV-1 transmembrane glycoprotein.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1993 Nov;9(11):1057-66.
- 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.
- Monell CR, Strand M., Structural and functional similarities between synthetic HIV gp41 peptides and defensins.
Clin Immunol Immunopathol. 1994 Jun;71(3):315-24.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.
Annu Rev Immunol. 2001;19:683-765.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR., Interleukin-10.
Annu Rev Immunol. 1993;11:165-90.
- Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA., Transforming growth factor production by chemically transformed cells.
Cancer Res. 1981 Jul;41(7):2842-8.
- Mosser DM, Zhang X., Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine.
Immunol Rev. 2008 Dec;226:205-18.
- 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.
- Navikas V, Link J, Persson C, Olsson T, Höjeberg B, Ljungdahl A, Link H, Wahren B., Increased mRNA expression of IL-6, IL-10, TNF-alpha, and perforin in blood mononuclear cells in human HIV infection.
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1995, 9(5):484-9.
- Nermut MV, Hockley DJ, Jowett JB, Jones IM, Garreau M, Thomas D., Fullerene-like organization of HIV gag-protein shell in virus-like particles produced by recombinant baculovirus.
Virology. 1994 Jan;198(1):288-96.
- Ng PC., Diagnostic markers for neonatal sepsis.
Curr Opin Pediatr. 2006;18, 125.
- Nishimoto N, Kishimoto T., Interleukin 6: from bench to bedside.
Nature Clin. Pract. Rheumatol. 2006 Nov;2(11):619-26.
- O'Garra A, Vieira P., T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10.
Nat Rev Immunol. 2007 Jun;7(6):425-8.
- Ogasawara M, Haraguchi S, Cianciolo GJ, Mitani M, Good RA, Day NK., Inhibition of murine cytotoxic T lymphocyte activity by a synthetic retroviral peptide and abrogation of this activity by IL.
J Immunol. 1990 Jul 15;145(2):456-62.

- Ossege LM, Sindern E, Voss B, Malin JP., Expression of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1 in cerebrospinal fluid cells in meningitis.
J Neurol Sci. 1996 Dec;144(1-2):1-13.
- Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS., HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease.
Nature. 1993 Mar 25;362(6418):355-8.
- Pardo A, Selman M., MMP-1: the elder of the family.
Int J Biochem Cell Biol. 2005 Feb;37(2):283-8.
- Parren PW, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ., The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity.
AIDS. 1999;13 Suppl A:S137-62.
- Pereira FB, Goñi FM, Muga A, Nieva JL., Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects.
Biophys J. 1997 Oct;73(4):1977-86.
- Piccio L, Buonsanti C, Mariani M, Cella M, Gilfillan S, Cross AH, Colonna M, Panina-Bordignon P., Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis.
Eur J Immunol. 2007 May;37(5):1290-301.
- Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P., Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling.
FASEB J. 1999 Dec;13(15):2105-24.
- Pinter A, Honnen WJ, Tilley SA, Bona C, Zaghouani H, Gorny MK, Zolla-Pazner S., Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1.
J Virol. 1989 Jun;63(6):2674-9.
- Poli G, Biswas P, Fauci AS., Interferons in the pathogenesis and treatment of human immunodeficiency virus infection.
Antiviral Res. 1994 Jul;24(2-3):221-33.
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC., Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS.
Science. 1984 May 4;224(4648):497-500.
- Potter MR, Moore M., PHA stimulation of separated human lymphocyte populations.
Clin Exp Immunol. 1975 Sep;21(3):456-67.
- Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA., Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase.
Science. 1988 Nov 25;242(4882):1168-71.
- Pruss D, Reeves R, Bushman FD, Wolffe AP., The influence of DNA and nucleosome structure on integration events directed by HIV integrase.
J Biol Chem. 1994 Oct 7;269(40):25031-41.
- Pryciak PM, Varmus HE., Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection.
Cell. 1992 May 29;69(5):769-80.
- Ratner L, Gallo RC, Wong-Staal F., HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus.
Nature. 1985 Feb 21-27;313(6004):636-7.
- Raviv Y, Viard M, Bess J Jr, Blumenthal R., Quantitative measurement of fusion of HIV-1 and SIV with cultured cells using photosensitized labeling.
Virology. 2002 Feb 15;293(2):243-51.
- Reil H, Kollmus H, Weidle UH, Hauser H., A heptanucleotide sequence mediates ribosomal frameshifting in mammalian cells.
J Virol. 1993 Sep;67(9):5579-84.

- Reinhart TA, Fallert BA, Pfeifer ME, Sanghavi S, Capuano S 3rd, Rajakumar P, Murphey-Corb M, Day R, Fuller CL, Schaefer TM., Increased expression of the inflammatory chemokine CXCL9/monokine induced by interferon-gamma in lymphoid tissues of rhesus macaques during simian immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Blood*. 2002 May 1;99(9):3119-28.
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB., New class of Transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Sep;78(9):5339-43.
- Roberts AB, Sporn MB., The Transforming growth factor- β s. in: *Handbook of experimental pharmacology: Peptide growth factors and their receptors*. Verlag Springer, New York, 1990;S. 419-472
- Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA., The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. 1988 Nov 25;242(4882):1171-3.
- Robinson L., Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-an update. *NZ Nurs Forum*. 1985 Aug-Sep;13(2):7-14.
- Roe B, Coughlan S, Hassan J, Grogan A, Farrell G, Norris S, Bergin C, Hall WW., Elevated serum levels of interferon- gamma -inducible protein-10 in patients coinfectd with hepatitis C virus and HIV. *J Infect Dis*. 2007 Oct 1;196(7):1053-7. Epub 2007 Aug 21.
- Ruegg CL, Clements JE, Strand M., Inhibition of lymphoproliferation and protein kinase C by synthetic peptides with sequence identity to the transmembrane and Q proteins of visna virus. *J Virol*. 1990 May;64(5):2175-80.
- 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., 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.
- 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*. 1990b Dec;10(6):621-6.
- Ruegg CL, Strand M., Inhibition of protein kinase C and anti-CD3-induced Ca²⁺ influx in Jurkat T cells by a synthetic peptide with sequence identity to HIV-1 gp41. *J Immunol*. 1990a May 15;144(10):3928-35.
- Rumbaugh J, Turchan-Cholewo J, Galey D, St Hillaire C, Anderson C, Conant K, Nath A., Interaction of HIV Tat and matrix metalloproteinase in HIV neuropathogenesis: a new host defense mechanism. *FASEB J*. 2006 Aug;20(10):1736-8. Epub 2006 Jun 28.
- Saffarian S, Collier IE, Marmer BL, Elson EL, Goldberg G., Interstitial collagenase is a Brownian ratchet driven by proteolysis of collagen. *Science*. 2004 Oct 1;306(5693):108-11.
- Sakaguchi K, Zambrano N, Baldwin ET, Shapiro BA, Erickson JW, Omichinski JG, Clore GM, Gronenborn AM, Appella E., Identification of a binding site for the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 1;90(11):5219-23.
- Salzwedel K, Berger EA., Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 7;97(23):12794-9.

Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M., Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of CCR-5 chemokine receptor gene.
Nature. 1996 Aug 22;382(6593):722-5.

Schägger H, Aquila H, Von Jagow G., Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis.
Anal Biochem. 1988 Aug 15;173(1):201-5.

Schägger 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.

Scharf K., Analyse der Interaktion der N-terminalen Domäne des transmembranen Hüllproteins gp41 mit zellulären Proteinen.
Diplomarbeit, Friedrich Schiller Universität Jena 2008

Schröder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F., HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots.
Cell. 2002 Aug 23;110(4):521-9.

Schwartz GN, Kammula U, Warren MK, Park MK, Yan XY, Marincola FM, Gress RE., Thrombopoietin and chemokine mRNA expression in patient post-chemotherapy and in vitro cytokine-treated marrow stromal cell layers.
Stem Cells. 2000;18(5):331-42.

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.

Song M, Kellum JA., Interleukin-6.
Crit Care Med. 2006;33 Suppl., S463.

Sourvinos G, Tsatsanis C, Spandidos DA., Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis.
Folia Biol (Praha). 2000;46(6):226-32.

South TL, Blake PR, Sowder RC 3rd, Arthur LO, Henderson LE, Summers MF., The nucleocapsid protein isolated from HIV-1 particles binds zinc and forms retroviral-type zinc fingers.
Biochemistry. 1990 Aug 28;29(34):7786-9.

Specke V, Schuurman HJ, Plesker R, Coulibaly C, Ozel M, Langford G, Kurth R, Denner J., Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates.
Transpl Immunol. 2002 May;9(2-4):281-8.

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.

Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, Lebedeva M, DeCamp A, Li D, Grove D, Self SG, Borrow P., Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections.
J Virol. 2009 Apr;83(8):3719-33. Epub 2009 Jan 28.

Staros JV, Wright RW, Swingle DM., Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions.
Anal Biochem. 1986 Jul;156(1):220-2.

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.

Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, Lamonica CA., HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration.
EMBO J. 1990 May;9(5):1551-60.

Stevenson M., HIV-1 pathogenesis.
Nat Med. 2003 Jul;9(7):853-60.

Tacke SJ, Kurth R, Denner J., Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation?
Virology. 2000 Mar 1;268(1):87-93.

Tacke SJ, Specke V, Denner J., Differences in release and determination of subtype of porcine endogenous retroviruses produced by stimulated normal pig blood cells.
Intervirology. 2003;46(1):17-24.

Takahashi K, Prinz M, Stagi M, Chechneva O, Neumann H., TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis.
PLoS Med. 2007 Apr;4(4):e124.

Takahashi K, Rochford CD, Neumann H., Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2.
J Exp Med. 2005 Feb 21;201(4):647-57.

Takehita S, Breen EC, Ivashchenko M, Nishanian PG, Kishimoto T, Vredevoe DL, Martinez-Maza O., 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 Oct 15;165(2):234-42.

Teh C, Le Y, Lee SH, Lu J., M-ficolin is expressed on monocytes and is a lectin binding to N-acetyl-D-glucosamine and mediates monocyte adhesion and phagocytosis of Escherichia coli.
Immunology. 2000 Oct;101(2):225-32.

Tessarz AS, Cerwenka A., The TREM-1/DAP12 pathway.
Immunol Lett. 2008 Mar 15;116(2):111-6. Epub 2007 Dec 26.

Toh H, Kikuno R, Hayashida H, Miyata T, Kugimiya W, Inouye S, Yuki S, Saigo K., Close structural resemblance between putative polymerase of a Drosophila transposable genetic element 17.6 and pol gene product of Moloney murine leukaemia virus.
EMBO J. 1985 May;4(5):1267-72.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep;76(9):4350-4.

Turnbull IR, Gilfillan S, Cella M, Aoshi T, Miller M, Piccio L, Hernandez M, Colonna M., Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation.
J Immunol. 2006 Sep 15;177(6):3520-4.

UNAIDS/WHO, 2007. 2007 AIDS epidemic update. Stand: Februar 2008.
http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_en.pdf

Uze G, Di Marco S, Mouchel-Vielh E, Monneron D, Bandu MT, Horisberger MA, Dorques A, Lutfalla G, Mogensen KE., Domains of interaction between alpha interferon and its receptor components.
J Mol Biol. 1994 Oct 21;243(2):245-57.

Valentin A, Albert J, Fenyö EM, Asjö B., HIV-1 infection of normal human macrophage cultures: implication for silent infection.
Virology. 1990 Aug;177(2):790-4.

Van Heuverswyn F, Peeters M., The Origins of HIV and Implications for the Global Epidemic.

Curr Infect Dis Rep. 2007 Jul;9(4):338-346.

Van Snick J., Interleukin-6: an overview.
Annu Rev Immunol. 1990;8:253-78.

Vatakis DN, Nixon CC, Bristol G, Zack JA., Differentially stimulated CD4+ T cells display altered human immunodeficiency virus infection kinetics: implications for the efficacy of antiviral agents.
J Virol. 2009 Apr;83(7):3374-8. Epub 2009 Jan 7.

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.

Wan M, Takagi M, Loh BN, Xu XZ, Imanaka T., Autoprocessing: an essential step for the activation of HIV-1 protease.
Biochem J. 1996 Jun 1;316 (Pt 2):569-73.

Webster 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.

Weiss A, Imboden J, Hardy K, Manger B, Terhorst C, Stobo J., The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation.
Annu Rev Immunol. 1986;4:593-619.

Wieggers K, Rutter G, Kottler H, Tessmer U, Hohenberg H, Kräusslich HG., Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites.
J Virol. 1998 Apr;72(4):2846-54.

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.

Wild C, Oas T, McDanal C, Bolognesi D, Matthews T., A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 1;89(21):10537-41.

Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM., Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle.
Immunology. 2004 Nov;113(3):281-92.

Woelk CH, Ottonnes F, Plotkin CR, Du P, Royer CD, Rought SE, Lozach J, Sasik R, Kornbluth RS, Richman DD, Corbeil J., Interferon gene expression following HIV type 1 infection of monocyte-derived macrophages.
AIDS Res Hum Retroviruses. 2004 Nov;20(11):1210-22.

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

6.2 Lehrbücher

Jay A. Levy, HIV and the pathogenesis of AIDS, 3. edition 2007, Wiley-Blackwell, ISBN 1555813933

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

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

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Kurth und Herrn Dr. Joachim Denner für die Bereitstellung des interessanten Themas der Diplomarbeit und der freundlichen Aufnahme in die Arbeitsgruppe P13. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Denner für die exzellente Betreuung, die wertvollen Anregungen sowie die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Ich danke Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk für die Bereitschaft, als Gutachter dieser Arbeit tätig zu sein.

Bei Magdalena Eschricht möchte ich mich besonders bedanken für die hervorragende Betreuung, die fortwährende Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe P13 des Robert Koch-Instituts. Dabei geht besonderer Dank an Christa-Maria Schmidt, Martina Lau, Kerstin Petsch, Debora Mihica, Sven Stengel, Michael Lauck, Levent Akyüz und Daniel Ivanusic.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und allen, die mich während dieser Zeit in vielen Hinsichten unterstützt haben.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den