

# **Untersuchung einer HIV-1 Restriktion ausgelöst durch die Aktivierung von *Toll-like* Rezeptoren**

---

## **Bachelorarbeit**

---

Technische Universität Berlin | Institut für Biotechnologie  
Fachgebiet Medizinische Biotechnologie

Vorgelegt von: Katharina Tolubaev  
Matrikel-Nr.: 357582

Erstprüfer: Prof. Dr. Roland Lauster  
Technische Universität Berlin | Institut für Biotechnologie | Fachgebiet Medizinische Biotechnologie

Zweitprüfer: Prof. Dr. Norbert Bannert  
Robert Koch-Institut | Fachgebiet 18: HIV und andere Retroviren

Betreut durch: Dr. Henning Hofmann  
Robert Koch-Institut | Fachgebiet 18: HIV und andere Retroviren

Berlin, Juni 2017

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	IV
Abstract .....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das humane Immunschwächevirus .....	1
1.1.1 Morphologie und Genomaufbau.....	1
1.1.2 Replikationszyklus .....	3
1.2 Toll-like Rezeptoren.....	4
1.3 Restriktionsfaktoren .....	6
1.4 Zielsetzung .....	9
2 Material.....	10
2.1 Geräte .....	10
2.2 Software .....	11
2.3 Puffer.....	11
2.4 Lösungen.....	12
2.5 Chemikalien.....	12
2.6 Restriktionsenzyme .....	13
2.7 Antibiotika.....	13
2.8 Kits .....	14
2.9 Plasmide und Reporterviren .....	14
2.10 Größenstandards.....	14
2.11 Zellen.....	15
2.11.1 Zelllinien .....	15
2.11.2 Primärzellen.....	15
2.12 Wachstumsmedien .....	15
2.13 Antikörper .....	16
2.13.1 Primäre Antikörper.....	16
2.13.2 Sekundäre Antikörper .....	16
2.14 Toll-like Rezeptor-Agonisten.....	16
2.15 Toll-like Rezeptor-Antagonisten .....	17
3 Methoden.....	18
3.1 DNA-Analytik .....	18
3.1.1 Transformation von E. coli .....	18
3.1.2 Plasmidpräparation.....	18
3.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	18
3.1.4 Restriktionsverdau .....	18
3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	19

3.2	Zellkultur .....	19
3.2.1	Zellkultivierung.....	19
3.2.2	Primärzellen.....	20
3.2.3	Zellzahlbestimmung.....	21
3.3	Calciumphosphat-Transfektion von HEK 293T-Zellen.....	22
3.4	Behandlung und Infektion von Monozyten .....	23
3.5	Protein-Analytik .....	23
3.5.1	SDS-PAGE.....	23
3.5.2	Western Blot.....	24
3.5.3	Luciferase-Assay .....	25
4	Ergebnisse.....	26
4.1	Herstellung von pseudotypisierten Reporterviren.....	26
4.1.1	Expressionsnachweis .....	27
4.1.2	Virus-Titer-Bestimmung .....	28
4.2	Behandlung mit TLR-Agonisten und Infektion von Monozyten .....	31
4.2.1	Ablauf zur Behandlung und Infektion von Monozyten .....	31
4.2.2	Infektion mit VSVg-pseudotypisierten Reporterviren .....	31
4.2.3	Infektion mit TFenv-pseudotypisierten Reporterviren.....	33
4.3	Titration der TLR-Agonisten.....	34
4.4	Behandlung mit TLR-Antagonisten und Infektion von Monozyten .....	37
4.5	Behandlung mit TLR-Agonisten und Infektion von Zelllinien .....	40
5	Diskussion .....	41
6	Ausblick .....	45
	Literaturverzeichnis.....	i
	Anhang .....	v
	Danksagung .....	vi
	Eidesstattliche Erklärung .....	vii

## Zusammenfassung

*Toll-like* Rezeptoren (TLR) sind Mustererkennungsrezeptoren und dienen der Erkennung von pathogenen Mustern als Teil des angeborenen Immunsystems. Die Antwort des Immunsystems beinhaltet zum einen die Expression von zellulären antiviralen Proteinen (Restriktionsfaktoren) und zum anderen die Expression von proinflammatorischen Zytokinen. TLR7 und TLR8 sind in der Lage, einzelsträngige RNA zu erkennen. Dazu gehört auch das Genom von HIV-1, dem Erreger des erworbenen Immundefektsyndroms AIDS. Bislang war die Suche nach einem erfolgreichen Medikament, das die Infektion nicht nur eindämmen, sondern heilen kann, erfolglos. Ein wichtiges, bis jetzt teils untererforschtes Gebiet ist die Rolle der *Toll-like* Rezeptoren und Restriktionsfaktoren.

TLR7 und TLR8 lassen sich durch den Agonisten Resiquimod (R848) aktivieren. Die Aktivierung von TLR7/8 induziert bei der Verwendung von VSVg-pseudotypisierten Reporterviren in infizierten Monozyten eine HIV-1 Restriktion. Hofmann *et al.* [1] sind durch ihre Ergebnisse zu dem Schluss gekommen, dass durch die Aktivierung von TLR7/8 womöglich ein neuartiger Restriktionsfaktor exprimiert wird. SAMHD1 ist ein bereits bekannter Restriktionsfaktor, der in der Zelle vorliegt und in der Lage ist, den dNTP-Pool zu senken und die Replikation des HI-Virus Typ 1 zu inhibieren. Das akzessorische Protein vpx kann diesem antiviralen Effekt entgegenwirken. In dieser Arbeit wurde ein HIV-1 Reportervirus verwendet, das in der Lage ist, vpx zu verpacken. Das verwendete Reportervirus ist zudem mit dem Hüllmembran-Glykoprotein eines *transmitted founder* HI-Virus (TFenv) pseudotypisiert. Eine Infektion mit dem Reportervirus entspricht demnach einer *in vivo* HIV-1 Infektion. In den Experimenten konnten Monozyten erfolgreich mit dem Reportervirus infiziert werden. Die Aktivierung von TLR7 und TLR8 durch TLR7/8-spezifische Agonisten führte in infizierten Monozyten unabhängig von SAMHD1 oder eines bisher bekannten Restriktionsfaktors zu einer Restriktion. Die verwendeten TLR-Agonisten zeigten jedoch Unterschiede in ihrer Wirkungsweise: Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Aktivierung von *Toll-like* Rezeptor 8 ausschlaggebend für die HIV-1 Restriktion ist. Bislang sind weder der Reaktionsmechanismus noch die genaue Wirkung bekannt. Neben primären Zellen wurden zudem monozytäre Zelllinien getestet. Bisher hat die Aktivierung von TLR7 und TLR8 jedoch keinen Einfluss auf eine HIV-1 Infektion gezeigt.

Bis zur vollständigen Aufklärung sind weitere Untersuchungen nötig. Nur durch ein weitreichendes Verständnis des gesamten Replikationszyklus und den damit verbundenen Inhibierungen kann in Zukunft eine potente und wirksame Heilung einer HIV-1 Infektion realisiert werden.

## Abstract

Toll-like receptors (TLR) are pattern recognition receptors (PRRs). As part of the innate immune system, they can sense pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). In response to a pathogen, the expression of cellular antiviral proteins (restriction factors) and proinflammatory cytokines is triggered. TLR7 and TLR8 recognize single stranded RNA. This also includes the genome of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the main pathogen of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). So far, there is no drug which can not only halt, but cure an infection. Toll-like receptors and restriction factors are important as part of future research.

Resiquimod (R848) activates TLR7 and TLR8 *in vitro* and therefore causes a restriction in HIV-1 infected monocytes with a VSVg pseudo typed reporter virus. Hofmann et al [1] concluded that the activation of TLR7/8 leads to the expression of a novel restriction factor. SAMHD1 is an already well-known restriction factor which depletes the dNTP pool in non-dividing cells and brings a halt to a HIV-1 infection. The accessory protein vpx is capable of reversing the restriction which is caused by SAMHD1. A HIV-1 reporter virus which can package vpx was used to successfully infect monocytes. Instead of VSVg, the reporter virus is pseudo typed with the envelope of a transmitted founder HI-virus (TFenv). Therefore, an infection with the described reporter virus is equivalent to an *in vivo* HIV-1 infection. The activation of TLR7/8 by different TLR agonists led to a restriction in infected monocytes, independent of SAMHD1 or any other known restriction factor. Nevertheless, the applied TLR-agonists showed differences in their impact: The results suggest that the activation of toll-like receptor 8 is decisive for the restriction. However, neither the mechanism of this restriction nor its precise effect are characterized. In addition to primary cells, monocyte derived cell lines have been tested: So far, the activation of TLR7 and TLR8 showed no influence on the HIV-1 infection.

Further experiments are necessary to fully disclose the replication cycle of HIV-1 with all its possible inhibitions. This is the only way to find a throughout and potent cure for HIV-1 infections in the future.

## Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
APOBEC3	Apolipoprotein B editing complex 3
APS	Ammoniumpersulfat
CD	Cluster of differentiation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
env	Envelope
FD	Fast Digest
FKS	Fetales Kälberserum
gag	gruppenspezifisches Antigen
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HBS	HEPES buffered saline
HD	Histidine-Aspartic
HEK 293T	Human embryonic kidney; T = Tumor-Antigen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Polyhistidin
HIV	Human immunodeficiency virus
IFN	Interferon
LB	Lysogeny Broth
LTR	Long terminal repeats
Luc	Luciferase
mac	Rhesusmakak
nef	Negative factor
NP40	Nonoxinol 40
NVP	Nevirapin
ODN	Oligodeoxynucleotid
P/S	Penicillin/Streptomycin
p24	Protein24
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffer saline
PHS	Pooled human serum
PI	Protease inhibitor
PIC	Pre-integration complex
PLB	Passive lysis buffer
pol	Polymerase
PRR	Pattern recognition receptor
R837	Imiquimod
R848	Resiquimod
rev	Regulator of expression of virion proteins

---

RLU	Relative light units
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
SAM	Sterile alpha motif
SAMHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SIV	Simian immunodeficiency virus
SOB	Super optimal broth
SOC	SOB + 20 mM Glucose
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tat	Trans-activator of transcription
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transmitted founder
TLR	Toll-like Rezeptor
TNE	Tris-NaCl-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UZ	Ultrazentrifugation, Ultrazentrifuge
vif	Viral infectivity factor
vpr	Viral protein rapid
vpu	Viral protein out
vpx	Viral protein x
VSVg	Vesicular stomatitis virus glykoprotein

# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Immunschwächevirus

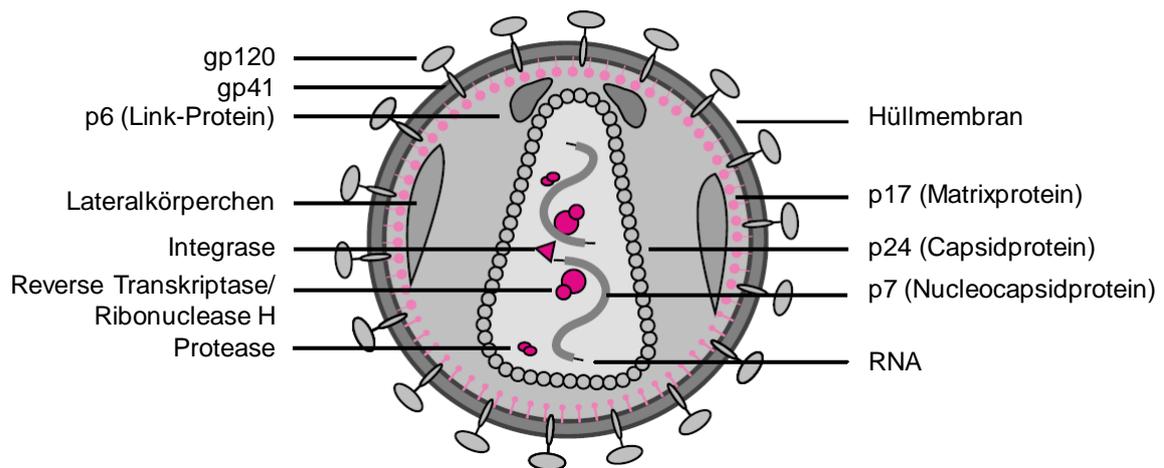
1981 wurde zunehmend eine unbekannte Immundefizienz diagnostiziert, die sich durch schwerwiegende opportunistische Infektionen äußerte. Ein Jahr später wurde die weiterhin unbekannte Immunschwäche als *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) beschrieben [2-5]. 1983 wurde erstmals ein Retrovirus aus der Probe eines an AIDS erkrankten Patienten isoliert [6], welches ein Jahr später als Erreger der Krankheit identifiziert werden konnte [7]. Zwei weitere Jahre vergingen, bis das Retrovirus den Namen *human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1) erhielt. [8]. Zeitgleich wurde in Westafrika ein weiterer Erreger des Immunschwächesyndroms entdeckt: HIV-2 [9].

HIV-1 ist in vier Gruppen (M, N, O, P) unterteilt und stammt von dem simianen Immundefizienzvirus (SIV) ab [10, 11].

Laut Schätzungen lebten 2015 weltweit 36,7 Mio. Menschen mit einer HIV-Infektion. Die Zahl der Todesfälle belief sich auf 1,1 Mio. [12]. Derzeit infizieren sich weltweit 2,1 Mio. Menschen jährlich mit HIV, davon 3200 deutschlandweit (Jahr: 2015) [12, 13]. Die Infektion kann durch eine antiretrovirale Therapie zwar eingedämmt werden, bis zum heutigen Zeitpunkt ist sie jedoch unheilbar.

### 1.1.1 Morphologie und Genomaufbau

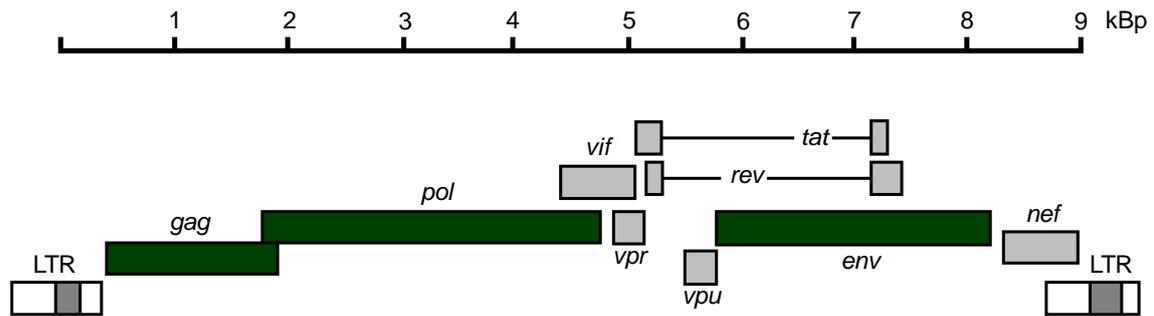
HIV-1-Partikel (Abbildung 1) sind von einer Lipidmembran zellulären Ursprungs umgeben (Hüllmembran), auf der sich extern das Glykoprotein 120 (gp120) und transmembran das Glykoprotein 41 (gp41) befinden. Das Matrixprotein (p17) ist an die Innenseite der Hüllmembran gekoppelt und verleiht dem Partikel seine Struktur. Im Inneren befindet sich das RNA-Genom, das aus zwei einzelsträngigen Kopien (ssRNA) besteht, von einem Capsid umhüllt ist und zusammen mit Nucleocapsidproteinen als Komplex vorliegt. Capsid und Hüllmembran werden durch das Link-Protein (p6) miteinander verbunden. Des Weiteren befinden sich reverse Transkriptase, Protease und Integrase im Inneren des Partikels [14, 15].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines HIV-1 Partikels**

Die Hüllmembran (mit gp120 und gp41) ist auf der Innenseite mit Matrixproteinen (p17) ausgekleidet. Das Capsid besteht aus Capsidproteinen (p24). Im Inneren befinden sich Link-Proteine (p6), Lateralkörperchen, Integrase, reverse Transkriptase bzw. Ribonuclease H und Protease. Das RNA-Genom (ssRNA) bildet mit Nucleocapsidproteinen (p7) einen Komplex. Abbildung aus [14].

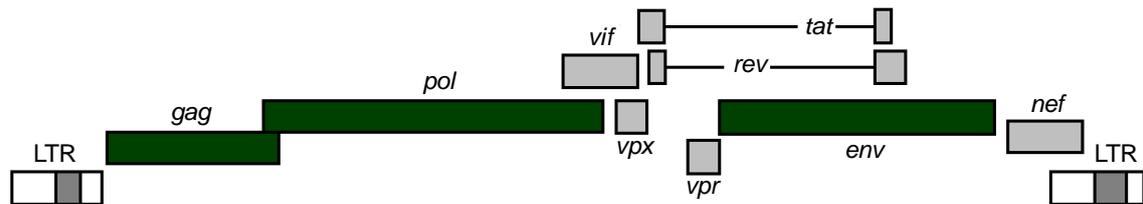
HIV-1 codiert, wie alle infektiösen Retroviren, für gag (gruppenspezifische Antigene), pol (Polymerase) und env (*Envelope*), die von *long terminal repeats* (LTR) flankiert werden. Das Genom ist in Abbildung 2 dargestellt. Es ist ca. 9,7 kBp groß [16] und enthält neben den Strukturgenen zusätzlich Gene für regulatorische Proteine (tat und rev) und Gene für akzessorische Proteine (vif, vpr, vpu, nef). Das gag-Gen codiert für die Capsid-, Nucleocapsid-, Matrix- und Link-Proteine, die in unreifen Viruspartikeln zunächst als ein Polyprotein von 55 kDa vorliegen und bei der späteren Reifung gespalten werden. Das pol-Gen enthält die genetischen Informationen für die Enzyme Integrase, reverse Transkriptase und Protease. Das env-Gen codiert für die externen und transmembranen Glycoproteine, die sich auf der äußeren Hüllmembran befinden. Gemeinsam bilden sie zunächst Polyproteine, die anschließend in gp120- und gp41-Proteine gespalten werden. Die regulatorischen Proteine sorgen dafür, dass die provirale DNA transkribiert und aus dem Nucleus ins Cytoplasma befördert wird. Das vif (*viral infectivity factor*)-, vpr (*viral protein rapid*)-, vpu (*viral protein out*)- und nef (*negative factor*)-Protein beeinflussen durch unterschiedliche Funktionen die virale Infektiosität, indem sie die Replikation schneller vorantreiben und antivirale Proteine des Wirts blockieren [15, 17].



**Abbildung 2: HIV-1 Genom**

Das Genom von HIV-1 codiert für Strukturproteine (*gag*, *pol*, *env*), regulatorische Proteine (*tat*, *rev*) und akzessorische Proteine (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) und wird von zwei LTRs flankiert. Modifiziert nach [14].

Das SIV<sub>mac</sub> bzw. HIV-2 Genom (Abbildung 3) und das HIV-1 Genom unterscheiden sich in einem akzessorischen Protein: Anstelle des Gens, das für *vpu* codiert, enthält das SIV<sub>mac</sub> Genom *vpx* (*viral protein x*), welches ebenfalls an der Verstärkung der Infektiosität des Virus beteiligt ist [18].



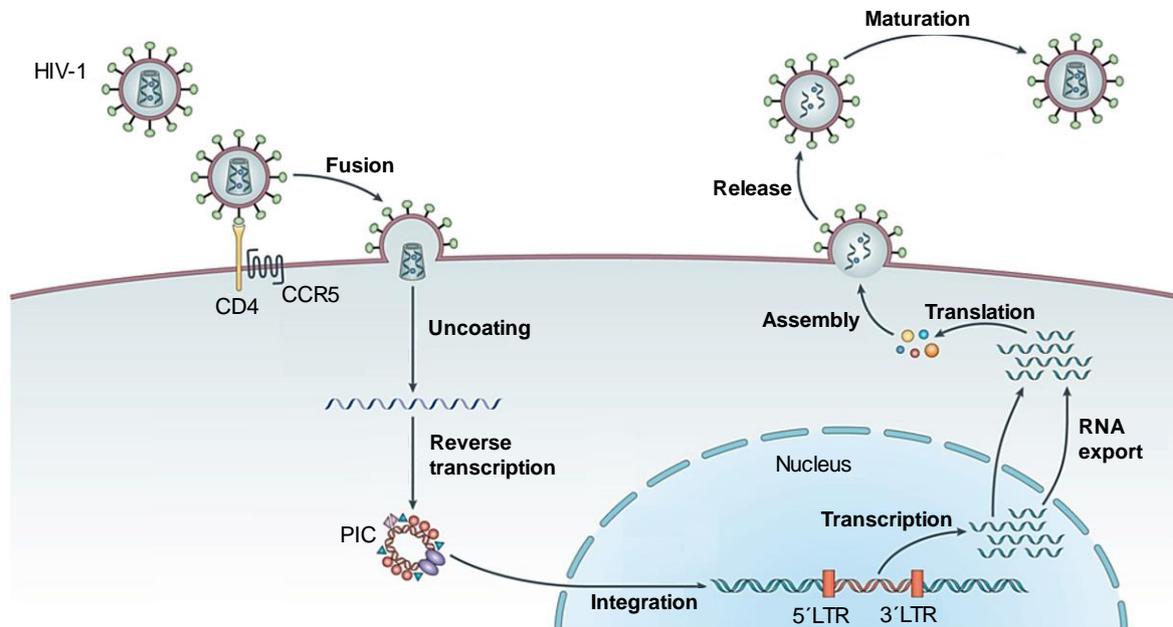
**Abbildung 3: SIV<sub>mac</sub>/HIV-2 Genom**

Das SIV<sub>mac</sub> bzw. HIV-2 Genom codiert anstelle von *vpu* für *vpx*. Strukturproteine, regulatorische Proteine und die restlichen akzessorischen Proteine stimmen mit dem Genom von HIV-1 überein. Dargestellt nach [19].

### 1.1.2 Replikationszyklus

Abbildung 4 stellt den Ablauf des Replikationszyklus von HIV-1 im Einzelnen dar. Zunächst bindet das gp120-Protein, das sich auf der Hüllmembran des viralen Partikels befindet, an den CD4-Rezeptor und anschließend an den CCR5- oder CXCR4-Corezeptor der Zielzelle. Durch diese Wechselwirkung kommt es zu einer Fusion, sodass das Capsid mit dem darin enthaltenen Genom in die Zielzelle eindringen kann. Die einzelsträngige RNA wird durch die reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Vor der Integration in das Genom der Zielzelle bildet sich ein Komplex aus der umgeschriebenen RNA, viralen Proteinen und Proteinen des Wirts. Das so entstehende Provirus wird bei Aktivierung der Wirtszelle in mRNA transkribiert und nach dem Transport ins Cytoplasma translatiert. Die

synthetisierten viralen Proteine und virale RNA fügen sich anschließend zu unreifen Partikeln an der Zellmembran zusammen, bevor sie durch Knospung freigesetzt werden. Nach der proteolytischen Spaltung der Proteine und der Ausbildung des Capsids entstehen reife Viruspartikel, die in der Lage sind, weitere Zellen zu infizieren [20-22].



**Abbildung 4: Replikationszyklus von HIV-1**

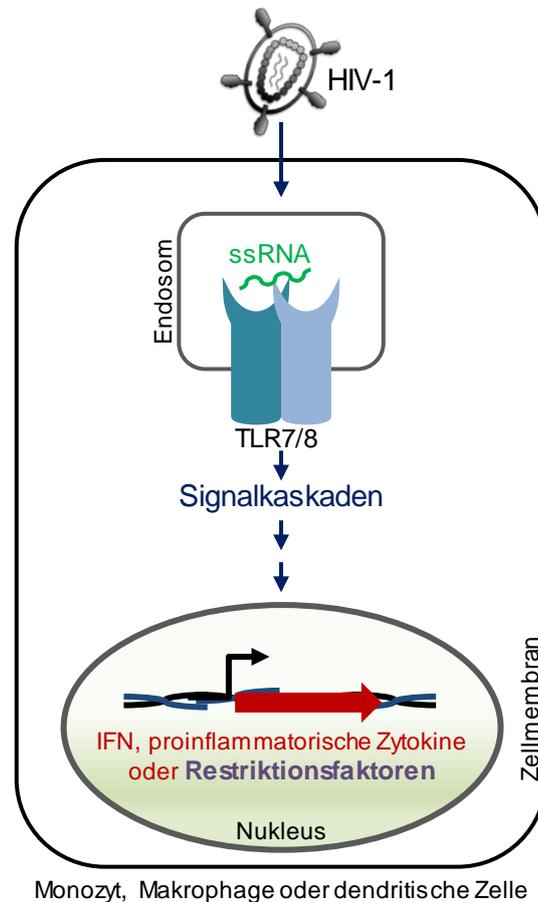
Der Replikationszyklus von HIV-1 setzt sich aus den nachfolgenden Schritten zusammen: Anheftung an die Zielzellmembran und Eindringen in die Zelle, Verlust des Capsids, reverse Transkription, Integration in die Wirts-DNA, Transkription und RNA-Export, Translation, Zusammenschluss von viralen Proteinen und RNA-Genom zu unreifen Viruspartikeln, Knospung, Freisetzung und anschließende Reifung des HIV-1 Partikels. Modifiziert nach [23].

## 1.2 Toll-like Rezeptoren

Neben der adaptiven Immunantwort spielt das angeborene Immunsystem bei der Erkennung und Eliminierung von Krankheitserregern eine wichtige Rolle. *Toll-like* Rezeptoren sind Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *pattern recognition receptors*) des angeborenen Immunsystems. Sie sind in der Lage, molekulare Muster von Pathogenen (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) zu erkennen [24]. Mögliche PAMPs können Lipide, Kohlenhydrate, Nucleinsäuren oder Proteine sein, die als Ligand an einen Rezeptor binden und ihn so aktivieren. Die Erkennung löst eine Reihe von Signalkaskaden aus, die zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und der Expression von antiviralen Proteinen führt [25, 26]. TLR sind entweder auf der Plasmamembran (TLR1, 2, 4-6) oder der Endosomenmembran (TLR3, 7-9) lokalisiert. Sie befinden sich überwiegend auf Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen, aber

auch auf T- und B-Zellen [27]. Monozyten zirkulieren nur wenige Tage im Blutkreislauf, bevor sie ins Gewebe wandern und zu Makrophagen ausdifferenzieren. Wird im Körper eine Infektion registriert, die eine Abwehr erfordert, wandern Monozyten vermehrt zu dem Infektionsherd. Dort eliminieren sie als Makrophagen Pathogene durch Phagozytose und senden außerdem Signale an das adaptive Immunsystem [28].

In dieser Arbeit wurden ausschließlich TLR7 und TLR8 untersucht. Beide Rezeptoren erkennen virale einzelsträngige RNA [29, 30]. Bei einer Immunreaktion werden antivirale Proteine, sogenannte Restriktionsfaktoren (siehe 1.3), in der Wirtszelle exprimiert, die in der Lage sind, einer Infektion entgegen zu wirken. Die Aktivierung der Rezeptoren löst zudem eine Signalkaskade aus, die in der Expression von proinflammatorischen Zytokinen und der Ausschüttung von Interferon resultiert (Abbildung 5). Die Aktivierung der Rezeptoren kann *in vitro* durch entsprechende Agonisten ausgelöst werden. TLR7 lässt sich unter anderem durch das Imidazoquinolin Imiquimod (R837) und TLR8 durch das Benzodiazepin TL8-506 aktivieren. Durch das Imidazoquinolin Resiquimod (R848) lassen sich beide Rezeptoren gleichzeitig stimulieren [31-33]. Entsprechende Antagonisten sind in der Lage, die Rezeptoren zu inhibieren. Das Oligodeoxynucleotid (ODN) 2087 inhibiert TLR7 und TLR8, ODN 20958 hemmt ausschließlich TLR7 [34, 35].



**Abbildung 5: Aktivierung von TLR7/8 durch HIV-1**

Vereinfachte Darstellung der Immunreaktion auf das Eindringen eines HI-Virus Typ 1. TLR7/8 erkennen das virale RNA-Genom. Durch die Aktivierung der Rezeptoren kommt es durch Signalkaskaden zur Interferon-Ausschüttung und der Expression von Restriktionsfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen. (Eigene Darstellung)

### 1.3 Restriktionsfaktoren

Restriktionsfaktoren sind Proteine, die eine antivirale Wirkung besitzen. Neben der Aktivierung von bestimmten *Toll-like* Rezeptoren wird ihre Expression durch Interferon induziert. Die Antagonisten zu den zellulären Restriktionsfaktoren sind virale akzessorische Proteine (siehe 1.1.1). Abbildung 6 zeigt eine Auswahl einiger Restriktionsfaktoren, die bereits bekannt sind. Soliman *et al.* [36] stellen in einer Übersicht weitere Restriktionsfaktoren dar.

Sobald eine Zelle infiziert ist, d.h. dass das virale Genom bereits im Wirtsgenom integriert ist, sind Tetherin und APOBEC3 (*apolipoprotein B editing complex 3*) dafür verantwortlich, die Vermehrung des Virus zu verhindern. Der antivirale Effekt von APOBEC3 zeigt sich erst, wenn es zusammen mit den viralen Proteinen und dem Genom in Viruspartikel verpackt wird und im darauffolgenden Replikationszyklus exprimiert wird. Der

Restriktionsfaktor sorgt für eine Desaminierung und damit zu auftretenden Cytosin → Uracil-Mutationen, die zum Abbau des entstehenden proviralen Komplexes führen. Demnach kann die transkribierte DNA nicht mehr in die Wirts-DNA eingebaut werden. Diesem antiviralen Effekt wirkt das akzessorische Protein vif entgegen. Vif bindet an APOBEC3 und verhindert so dessen Verpackung in Viruspartikel [37]. Tetherin verhindert die Freisetzung der Viruspartikel, sodass diese an der Zellmembran haften bleiben und sich nicht zu reifen Viren entwickeln können. Der virale Antagonist zu diesem Restriktionsfaktor ist das Protein vpu, welches Tetherin degradieren kann [38].

Vor der eigentlichen Infektion von sich nicht teilenden Zellen ist SAMHD1 (*sterile alpha motif histidine-aspartate-domain-containing protein 1*) hauptsächlich für eine Restriktion verantwortlich, indem es die reverse Transkription und den Einbau des viralen Genoms erst gar nicht ermöglicht. SAMHD1 ist eine Triphosphohydrolase, die nur in sich nicht teilenden Zellen aktiv ist und den dNTP-Pool in der Zelle kontrolliert. Die antivirale Wirkung zeigt sich in dem Absenken des dNTP-Pools, sodass die einzelsträngige RNA des HI-Virus Typ 1 nicht transkribiert werden kann [39]. Der Restriktionsfaktor liegt unter anderem in Monozyten vor, seine Expression wird jedoch auch durch Interferon induziert [36]. Das akzessorische Protein vpx von SIV<sub>mac</sub> bzw. HIV-2 ist in der Lage, diesen Restriktionsfaktor zu degradieren und die antivirale Wirkung zu inaktivieren [40, 41]. Diese Information wurde genutzt, um ein HI-Virus Typ 1 zu generieren, das in der Lage ist, vpx von SIV<sub>mac</sub> zu verpacken und somit SAMHD1 zu eliminieren [42].

Hofmann *et al.* [1] aktivierten in ihren Experimenten TLR7/8 in Monozyten durch den Agonisten Resiquimod (R848) und infizierten diese dann mit HIV-1, welches vpx verpacken konnte. Die Ergebnisse zeigten eine erfolgreiche Restriktion der Infektion, die nach dem Eintritt des Virus in die Zielzelle und vor der reversen Transkription erfolgte. Aus Abbildung 6 geht hervor, dass an dieser Stelle des Replikationszyklus zwei Restriktionsfaktoren aktiv sind: SAMHD1 und APOBEC3. Da SAMHD1 durch vpx eliminiert wurde, konnte dieser Restriktionsfaktor nicht für die Inhibierung der Replikation verantwortlich gemacht werden. APOBEC3 wurde durch eine fehlende Expression in den Zellen ebenfalls ausgeschlossen.



## 1.4 Zielsetzung

Bislang konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von TLR7 und TLR8 durch Resiquimod (R848) in infizierten Monozyten eine HIV-1 Restriktion hervorruft. Diese Restriktion erfolgt interferonunabhängig und wird sehr wahrscheinlich durch einen neuartigen Restriktionsfaktor ausgelöst, der in der Lage ist, das virale RNA-Genom zu degradieren.

Ziel der Arbeit ist es, die durch Aktivierung von TLR7/8 induzierte Restriktion weiter zu untersuchen. Die Verwendung von TLR-Agonisten und TLR-Antagonisten soll Aufschluss darüber geben, ob die Restriktion in infizierten Monozyten durch TLR7, TLR8 oder gleichermaßen durch beide *Toll-like* Rezeptoren ausgelöst wird. Neben R848 sollen zwei weitere TLR-Agonisten getestet werden: R837 (Aktivierung von TLR7) und TL8-506 (Aktivierung von TLR8). Zur weiteren Untersuchung dienen die TLR-Antagonisten ODN 2087 (Inhibierung von TLR7/8) und ODN 20958 (Inhibierung von TLR7). Aus anonymen Blutspenden isolierte Monozyten sollen mit den TLR-Agonisten und TLR-Antagonisten behandelt und anschließend infiziert werden.

Die Pseudotypisierung mit VSVg (*vesicular stomatitis virus glykoprotein*) zur Herstellung von Reporterviren ist ein gängiges Verfahren und wurde in den bisherigen Experimenten zur Virusproduktion genutzt, da das Reportervirus unabhängig von den HIV-spezifischen Rezeptoren in eine Vielzahl von Zellen eindringen kann. Dies entspricht jedoch nicht der *in vivo* Situation, in der HIV-1 durch eine Bindung des Glykoproteins 120 mit dem CD4-Rezeptor und CCR5- bzw. CXCR4-Corezeptor in Zellen eindringt.

Aus diesem Grund soll die Infektion von Monozyten in dieser Arbeit mit einem Reportervirus erfolgen, das mit dem Hüllprotein des HI-Virus Typ 1 einer Erstinfektion (*transmitted founder*) pseudotypisiert ist (TFenv).

Zudem soll geprüft werden, ob monozytäre Zelllinien eine Alternative zu den bisher verwendeten primären Zellen darstellen.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Eine Auflistung der Geräte und Materialien ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Geräte und Materialien

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugsystem	Vacusaft comfort	Integra, Schweiz
Analysewaage	PR803	Sartorius, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, USA
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, USA
Filterpapier	Extra thick blot paper	Bio-Rad, USA
Geldokumentation	Quantum 1000	Peqlab, Deutschland
Hämozytometer	Z359629	Sigma-Aldrich, USA
Inkubator	HeraCell 240	Thermo Scientific, USA
Membrandokumentation	Odyssey	LI-COR, USA
Mikroplattenluminometer	Centro LB 960	Berthold, Deutschland
Mikroskop	Eclipse TS100	Nikon, Japan
Mikrozentrifuge	Galaxy Mini	VWR, USA
Mikrozentrifuge	5415R	Eppendorf, Deutschland
Mikrozentrifuge	5424	Eppendorf, Deutschland
Nitrocellulose-Membran	0,45 µm	Bio-Rad, USA
Pipettierhilfe	Pipet Boy 2	Integra, Schweiz
PowerPac Basic		Bio-Rad, USA
PowerPac HC		Bio-Rad, USA
Rotor (UZ)	SW 32 Ti	Beckman Coulter, USA
Schüttelinkubator	Innova 4200	New Brunswick Scientific, USA
Schüttler	3016	GFL, Deutschland
Spektrophotometer	NanoDrop 1000	Thermo Scientific, USA
Sterilwerkbank	Safe 2020	Thermo Scientific, USA
Thermomixer	5436	Eppendorf, Deutschland
Tischkühlzentrifuge	4K15	Sigma, Deutschland
Tischkühlzentrifuge	Biofuge Primo R	Thermo Scientific, USA
Tischzentrifuge	Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, USA

Trans-Blot SD transfer cell		Bio-Rad, USA
Ultrazentrifuge	Optima L-100K	Beckman Coulter, USA
Vortex-Schüttler	444-1372	VWR, USA
Wasserbad	3043	Köttermann, Deutschland
Zentrifuge	5804R	Eppendorf, Deutschland

## 2.2 Software

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der verwendeten Software.

Tabelle 2: Software

Software	Version	Hersteller
CMU FireCam	V 2.03	PHASE, Deutschland
Image Studio	V5.2.5	LI-COR, USA
Microsoft Office	2016	Microsoft, USA
MikroWin2010	5.15	Mikrotek Laborsysteme, Deutschland
ND1000	V3.8.1	Thermo Scientific, USA

## 2.3 Puffer

In Tabelle 3 sind alle Puffer und deren Zusammensetzung bzw. Herstellerangaben aufgelistet.

Tabelle 3: Puffer

Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
10x Buffer Tango	Thermo Scientific, USA
10x FastDigest Green Buffer	Thermo Scientific, USA
10x Laufpuffer	0,25 M Tris + 1,9 M Glycin + 1 % SDS
10x PBS	Robert Koch-Institut, Deutschland
10x Transferpuffer	250 mM Tris + 1,9 M Glycin
1x PBS	Robert Koch-Institut, Deutschland
2x HBS	280 mM NaCl + 50 mM HEPES + 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
50x TAE	Carl Roth, Deutschland
5x PLB	Promega, USA
6x Ladepuffer	Bromphenolblau + Glycerin + DTT (1:20)
Blocking-Puffer	Waschpuffer + Milchpulver (5 %)

HEPES	Biochrom, Deutschland
Lysepuffer	NP40 (0,5 %) + EDTA (2 mM) + HEPES (50 mM) + KCl (150 mM) + PI (1 Tablette/25 ml)
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris-HCl, pH=6,8, Bio-Rad, USA
TE-Puffer	QIAGEN, Deutschland
TNE-Puffer	10 mM Tris + 100 mM NaCl + 1 mM EDTA
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl, pH=8,8, Bio-Rad, USA
Waschpuffer	4,5 l ddH <sub>2</sub> O + 0,5 l 10x PBS + 0,05 l Tween 20

## 2.4 Lösungen

Eine Übersicht der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Lösungen

Lösung	Hersteller
FKS	Biochrom, Deutschland
Histopaque	Sigma-Aldrich, USA
L-Glutamin	Biochrom, Deutschland
PHS	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	Biochrom, Deutschland

## 2.5 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth, Deutschland
Agarose	Peglab, Deutschland
APS	Carl Roth, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth, Deutschland
DTT	Carl Roth, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Carl Roth, Deutschland
Ethidiumbromid	Roche, Schweiz

Glycerin	Carl Roth, Deutschland
Imiquimod	InvivoGen, USA
Isopropanol	Carl Roth, Deutschland
Milchpulver, fettarm	Carl Roth, Deutschland
Nevirapin	Sigma-Aldrich, USA
ODN 2087	Miltenyi Biotec, Deutschland
ODN 20958	Miltenyi Biotec, Deutschland
Protease-Inhibitor (Tabletten)	Roche, Schweiz
Resiquimod	InvivoGen, USA
SDS (10 %)	Sigma-Aldrich, USA
TEMED	Carl Roth, Deutschland
TL8-506	InvivoGen, USA
Tween 20	Carl Roth, Deutschland

## 2.6 Restriktionsenzyme

Tabelle 6 enthält eine Liste der eingesetzten Restriktionsenzyme.

Tabelle 6: Restriktionsenzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
BcuI (Spel)	Thermo Scientific, USA
FastDigest Apal	Thermo Scientific, USA
FastDigest BamHI	Thermo Scientific, USA
FastDigest BshTI (Agel)	Thermo Scientific, USA
FastDigest Hind III	Thermo Scientific, USA
FastDigest XhoI	Thermo Scientific, USA

## 2.7 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Antibiotika

<b>Antibiotikum</b>	<b>Hersteller</b>
Ampicillin	Carl Roth, Deutschland
HyClone Penicillin/Streptomycin-Lösung	GE Healthcare, UK

## 2.8 Kits

Die eingesetzten Kits sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Kits

Kit	Hersteller
Luciferase-Assay	Promega, USA
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Deutschland
One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent E. coli	Thermo Scientific, USA

## 2.9 Plasmide und Reporterviren

Eine Übersicht der Plasmide und Reporterviren ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Plasmide und Reporterviren

Plasmid/Reportervirus	Beschreibung/Bezugsquelle
pcDNA6	Leerer Vektor
pNL.luc.chp6.e <sup>r</sup> -	NL 4-3 HIV-1 Provirus Luciferase-Reporter; Mutation in env-/vpr-Gen; p6-Domäne des gag-Gens von SIV <sub>mac</sub> (AS: 17-26)
pTF20env	Hüllprotein von <i>transmitted founder</i> HIV-1
pcVpx.mycHis	Expressionsplasmid vpx von SIV <sub>mac</sub> 239 mit mycHis-Tag
pNL.luc3.SIVp6.e <sup>r</sup> - + pcDNA + pVSVg	Dr. Henning Hofmann
pNL.luc3.SIVp6.e <sup>r</sup> - + pcVpx.mycHis + pVSVg	Dr. Henning Hofmann

## 2.10 Größenstandards

Eine Auflistung der verwendeten Größenstandards ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Größenstandards

Marker	Hersteller
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, USA

## 2.11 Zellen

Die in dieser Arbeit kultivierten Zellen und deren Ursprung sind in den Tabellen 11 und 12 dargestellt.

### 2.11.1 Zelllinien

Tabelle 11: Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Ursprung
C8166	Mensch	T-Zell-Leukämie
GHOST	Mensch	Osteosarkom
HEK 293T	Mensch	Niere
THP-1	Mensch	Akute monozytäre Leukämie
U937	Mensch	Histiozytäres Lymphom

### 2.11.2 Primärzellen

Tabelle 12: Primärzellen

Zellen	Ursprung
Primäre humane Monozyten	Anonyme Blutspenden des DRK

## 2.12 Wachstumsmedien

Die für die Kultivierung verwendeten Wachstumsmedien und deren jeweilige Zusätze sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Wachstumsmedien

Medium	Zusätze
DMEM	+ FKS (10 %) + L-Glutamin (1 %) + Penicillin/Streptomycin-Lösung (1 %)
LB-Medium	+ Ampicillin (50 µg/ml)
Monozyten-Medium	RPMI-1640 + HEPES (1 %) + PHS (5 %) + Penicillin/Streptomycin-Lösung (1 %)

---

RPMI-1640	+ FKS (10 %)
	+ L-Glutamin (1 %)
	+ Penicillin/Streptomycin-Lösung (1 %)

---

## 2.13 Antikörper

Tabellen 14 und 15 enthalten eine Übersicht der eingesetzten Antikörper.

### 2.13.1 Primäre Antikörper

Tabelle 14: Primäre Antikörper

Antigen	Organismus	Hersteller
myc	Maus	Sigma-Aldrich, USA
p24	Maus	Sanders-Beer <i>et al.</i> [44]
Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich, USA

### 2.13.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 15: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
Donkey anti-Mouse IRDye 680LT V1&2	LI-COR, USA

## 2.14 Toll-like Rezeptor-Agonisten

Verwendete TLR-Agonisten sind Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: TLR-Agonisten

Agonist	Aktivierung von	Hersteller
R848	TLR7/8	InvivoGen, USA
R837	TLR7	InvivoGen, USA
TL8-506	TLR8	InvivoGen, USA

## 2.15 Toll-like Rezeptor-Antagonisten

Eine Übersicht der TLR-Antagonisten ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: TLR-Antagonisten

<b>Antagonist</b>	<b>Inhibierung von</b>	<b>Hersteller</b>
ODN 2087	TLR7/8	Miltenyi Biotec, Deutschland
ODN 20958	TLR7	Miltenyi Biotec, Deutschland

## **3 Methoden**

### **3.1 DNA-Analytik**

#### **3.1.1 Transformation von E. coli**

Die Transformation von chemisch kompetenten E. coli-Zellen diente der Übertragung und Amplifizierung von Plasmid-DNA. Die chemisch kompetenten Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und dann mit 1-5 µl DNA versetzt. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert, im Anschluss für 45 s im Wasserbad (3043, Köttermann) bei 42°C erwärmt und dann für 2 min auf Eis inkubiert. Jedem Ansatz wurden 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugefügt und anschließend wurde für 1 h bei 225 rpm und 37°C geschüttelt. 25-100 µl der Suspension wurden auf Ampicillin-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C verkehrt herum inkubiert. Durch die Selektion konnten die Plasmidtragenden Klone am darauffolgenden Tag zur Plasmidpräparation genutzt werden.

#### **3.1.2 Plasmidpräparation**

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit verwendet. Die Arbeitsschritte wurden nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Das gereinigte DNA-Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

#### **3.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die DNA-Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) bestimmt. Die automatische Messung der DNA erfolgte bei 260 nm. Durch die Messung bei 280 nm (Proteine) und 230 nm (Alkohole) wurde die Reinheit der Probe geprüft. Bei der Messung wurde TE-Puffer als Referenz genutzt.

#### **3.1.4 Restriktionsverdau**

Nach der Plasmidpräparation (siehe 3.1.2) wurde ein Kontrollverdau durchgeführt. Hierbei wurde die Plasmid-DNA durch Restriktionsenzyme gespalten. Die verschiedenen Ansätze (Beispiel: Tabelle 18) wurden zusammengeführt und für 20 min bei 37°C inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf). In einer anschließenden Auftrennung der

Reaktionsansätze kann anhand der erhaltenen DNA-Fragmente eine Charakterisierung durchgeführt werden (siehe 3.1.5).

Tabelle 18: Beispielhafter Ansatz für einen Restriktionsverdau

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Menge</b>
10x FD Green Buffer	2 µl
Plasmid-DNA	1 µg
Enzym 1	1 µl
Enzym 2	1 µl
Enzym 3	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 µl auffüllen

### 3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um ein analytisches Trennverfahren, mit dem DNA-Fragmente durch das Anlegen einer elektrischen Spannung der Größe nach aufgetrennt werden. Um ein 1 % (w/v) Agarosegel herzustellen, wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer aufgeköcht. Das Gel wurde mit 3 µl Ethidiumbromid (DNA-bindender Farbstoff) versetzt und bis zur Aushärtung in eine Gelelektrophorese-Kammer gegossen. Anschließend wurden die Ansätze des Restriktionsverdau zusammen mit einem DNA-Größenstandard (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific) in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 80-100 V für ca. 30 min (Mini-Sub Cell GT/PowerPac Basic, Bio-Rad). Nach Anfertigung eines Fotos (Quantum 1000, Peqlab) erfolgte die Auswertung anhand des verwendeten Größenstandards. Die mit Ethidiumbromid angefärbten Banden wurden mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Zellkultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup> - 150 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit (bis 95 %) in einem Inkubator (HeraCell 240, Thermo Scientific) kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank (Safe 2020, Thermo Scientific) durchgeführt. Die Konfluenz der Zellen wurde vor dem Passagieren mikroskopisch (Eclipse TS100,

Nikon) überprüft. Das jeweilige Medium wurde vor dem Einsatz auf 37°C im Wasserbad (3043, Köttermann) erwärmt.

### 3.2.1.1 Adhärente Zellen

HEK 293T- und GHOST-Zellen wurden in *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) kultiviert (siehe 2.12). Die Zellen wurden alle zwei Tage je nach Zelldichte in einem Verhältnis von 1:5 - 1:20 passagiert. Hierfür wurde das Medium zunächst abgenommen. Anschließend wurde mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen durch eine Trypsin/EDTA-Lösung (3 ml) vom Flaschenboden gelöst. Je nach Verhältnis wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und weiter kultiviert.

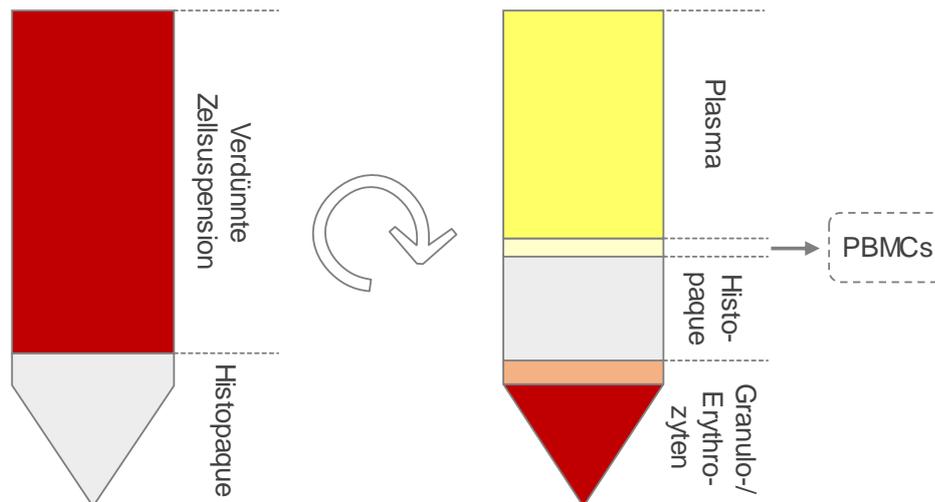
### 3.2.1.2 Suspensionszellen

C8166-, THP-1- und U937-Zellen wurden in *Roswell Park Memorial Institute Medium* 1640 (RPMI-1640) kultiviert (siehe 2.12). Je nach Zelldichte wurden die Zellsuspensionen in einem Verhältnis von 1:10 - 1:20 mit frischem Medium verdünnt und anschließend weiter kultiviert.

### 3.2.2 Primärzellen

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus anonymen Blutspenden gewonnen.

Das Vollblut wurde mit RPMI-1640 (ohne Zusätze) in 50 ml Zentrifugenröhrchen auf 35 ml aufgefüllt. Die Auftrennung des Blutes erfolgte durch Histopaque (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer). Das verdünnte Blut wurde vorsichtig über 12 ml Histopaque (gesondertes Zentrifugenröhrchen) geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation (4K15, Sigma) für 25 min bei Raumtemperatur und 2200 rpm (ohne Bremse und Beschleunigung). Nach der Zentrifugation setzte sich die oberste Schicht aus Plasma zusammen, gefolgt von PMBCs und Histopaque (Dichte = 1,077g/ml). In den unteren Schichten befanden sich Granulozyten und Erythrozyten (vgl. Abbildung 8). Die PBMCs wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit RPMI-1640 (ohne Zusätze) auf 50 ml aufgefüllt und für 8 min bei Raumtemperatur und 1600 rpm zentrifugiert (mit Bremse und Beschleunigung). Im Anschluss folgte ein weiterer Waschschrift. Zum Schluss wurde für 5 min bei Raumtemperatur und 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die PBMCs in 5 ml Monozyten-Medium resuspendiert.



**Abbildung 8: Histopaque-Dichtegradientenzentrifugation**

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus anonymen Blutspenden isoliert. Histopaque diente als Trennmittel. (Eigene Darstellung)

Die mononukleären Zellen wurden nach der Isolierung in 96-Well-Platten ausplattiert, um die adhärenenten Monozyten zu separieren. Damit nach der Isolierung eine Monozyten-Zahl von  $2 \times 10^5$  Zellen/Well vorlag, wurden insgesamt  $1 \times 10^6$  PBMCs/Well in 100  $\mu$ l Monozyten-Medium ausgesät (Tabelle 19). Es folgte eine zweistündige Inkubation. Anschließend wurden zwei Waschschrte durchgeführt, um die nicht-adhärenenten Zellen (T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen) zu entfernen. Hierfür wurden die Zellen mit 200  $\mu$ l RPMI-1640-Medium (ohne Zusätze) gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Monozyten in Monozyten-Medium (50  $\mu$ l/Well) kultiviert.

Tabelle 19: Monozyten-Zahl in Abhängigkeit von PBMCs

	Gewünschte Monozyten-Zahl	Zu plattierende PBMCs
6-Well-Platte	$2 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
12-Well-Platte	$1 \times 10^6$	$5 \times 10^6$
96-Well-Platte	$2 \times 10^5$	$1 \times 10^6$

### 3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer (Hämozytometer Z359629, Sigma-Aldrich) bestimmt. Die Zellsuspension wurde je nach Zelldichte sinnvoll verdünnt und anschließend mit Trypanblau (Verhältnis 1:2) versetzt. Die Verwendung von Trypanblau gab Aufschluss über die Vitalität der Zellen. Tote Zellen sind permeabel für den Farbstoff

und lassen sich beim Mikroskopieren gut von den lebenden Zellen abgrenzen. Die Zellzahl pro ml wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{\text{gezählte Großquadrate}}$$

### 3.3 Calciumphosphat-Transfektion von HEK 293T-Zellen

Die Calciumphosphat-Transfektion gehört zu den chemischen Verfahren der Transfektion, also der Einbringung von Fremd-DNA in Zellen. Das Calcium des Calciumchlorids und der Phosphat-Rest des verwendeten HBS-Puffers bilden ein Calciumphosphat-Präzipitat. Die zu transfizierende Plasmid-DNA bindet an diese Präzipitate und wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. HEK 293T-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausplattiert. 15 cm Kulturschalen wurden mit  $8 \times 10^6$  Zellen in 20 ml Medium pro Schale ausgesät. Um ein möglichst feines Präzipitat zu erhalten, wurden die Ansätze zunächst ohne 2x HBS zusammengegeben. 2x HBS wurde anschließend unter Luftblasenerzeugung mittels Pipettierhilfe tropfenweise hinzugefügt. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Der einfache Ansatz für die Herstellung von HIV-1 X<sup>-</sup> und HIV-1 X<sup>+</sup> Reporterviren ist Tabelle 20 zu entnehmen. Jeder Kulturschale wurden dann 3 ml des jeweiligen Ansatzes zugegeben. Im Anschluss folgte eine Inkubation bei 37°C und nach 6 - 8 h ein Mediumwechsel. Nach 48 h wurde der Virusüberstand abgenommen, durch einen 0,45 µm Filter filtriert und aliquotiert. Die Aliquots wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Alternativ wurden die Virusüberstände in einer Ultrazentrifuge (Optima L-100K, Beckman Coulter) konzentriert. Die Überstände wurden hierfür mit einem 20 %-Saccharose-Kissen für 2 - 3 h bei 4°C und 32.000 rpm im Vakuum ultrazentrifugiert. Das jeweilige Virus-Pellet wurde anschließend in Monozyten-Medium resuspendiert (zehnfache Konzentrierung) und aliquotiert. Die Aliquots wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 20: 1x Ansatz für Calciumphosphat-Transfektion von HEK 293T-Zellen

	HIV-1 X <sup>-</sup>	HIV-1 X <sup>+</sup>
pTF20env (1 µg/µl)	20 µg	20 µg
pNL.luc.chp6.e <sup>r</sup> (1 µg/µl)	30 µg	30 µg
pcDNA6 (1 µg/µl)	10 µg	5 µg
pcVpx.mycHis (1 µg/µl)	-	5 µg
CaCl <sub>2</sub>	150 µl	150 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 1500 µl auffüllen	auf 1500 µl auffüllen
2x HBS	1500 µl	1500 µl

### 3.4 Behandlung und Infektion von Monozyten

Aus PBMCs isolierte Monozyten (siehe 3.2.2) wurden am gleichen Tag der Isolierung mit TLR-Agonisten behandelt und am darauffolgenden Tag infiziert. Zur Behandlung der Zellen wurden die TLR-Agonisten R848, R837 und TL8-506 in einer finalen Konzentration von 0,3 µM - 10 µM in 50 µl zu den Zellen gegeben. 24 h nach der Behandlung erfolgte die Infektion. Hierfür wurden zunächst die Überstände abgenommen und 100 µl frisches Medium/Well hinzugegeben. Beide Reporterviren (10 µl Virus/Well) wurden in weiteren 100 µl zugefügt. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation für 2 h bei 30°C und 2400 rpm (4K15, Sigma). Die Überstände wurden danach abgenommen und durch 200 µl Medium ersetzt. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C kultiviert. Nach 72 h erfolgte eine quantitative Auswertung durch einen Luciferase-Assay. Die Durchführung der Experimente mit den TLR-Antagonisten verlief ähnlich. Hier fand lediglich 1 h vor der Behandlung mit den TLR-Agonisten (finale Konzentration: 0,3 µM) die Behandlung mit den TLR-Antagonisten (finale Konzentration: 0,9 µM) statt. Nevirapin (reverse Transkriptase-Inhibitor) wurde 2 h vor der Infektion und nach der Infektion in einer finalen Konzentration von 3 µM zugegeben.

### 3.5 Protein-Analytik

#### 3.5.1 SDS-PAGE

Durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine durch das Anlegen einer elektrischen Spannung ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Das in Trenn- und Sammelgel enthaltene SDS überlagert positive Ladungen, sodass alle Proteine nach dem Anlegen der Spannung zur Anode wandern. Die Virus-

Produzentenzellen wurden auf Eis aufgetaut und in 400 µl Lysepuffer resuspendiert. Es folgte eine zehnmünütige Inkubation auf Eis und eine anschließende Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 13.200 rpm (5415R, Eppendorf). Die Virusüberstände wurden für 3 h bei 4°C und 13.000 rpm (5424, Eppendorf) pelletiert und dreifach konzentriert in Lysepuffer aufgenommen. Die einzelnen Ansätze wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf). Das Polyacrylamidgel (Zusammensetzung: Tabelle 21) wurde dann mit den Proben und einem Protein-Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) beladen. Die anschließende Gelelektrophorese wurde für eine Anlaufzeit von 10 min bei 100 V und dann für ca. 30 min bei 180 V in 1x Laufpuffer durchgeführt (Mini-PROTEAN Tetra Cell/PowerPac HC, Bio-Rad).

Tabelle 21: Gelzusammensetzung für 2 Gele (1,5 mm)

	<b>Trenngel (12 %)</b>	<b>Sammelgel (5 %)</b>
ddH <sub>2</sub> O	6,8 ml	5,7 ml
30 % Acrylamid	8 ml	1,7 ml
Tris 1,5 M	5 ml	-
Tris 0,5 M	-	2,5 ml
10 % SDS	200 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

### 3.5.2 Western Blot

Das Western Blot-Verfahren beinhaltet zum einen den Proteintransfer vom Polyacrylamidgel auf eine Membran und zum anderen die Immundetektion von Proteinen. Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch das Anlegen einer Spannung über zwei Filterpapiere auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm) transferiert. Filterpapier und Membran wurden vorher in 1x Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurde für 40 min bei 20 V geblottet (Trans-Blot SD transfer cell, Bio-Rad). Die Membran wurde für 1 h oder über Nacht in Blocking-Puffer eingelegt und anschließend dreimal für je 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Zur Immundetektion wurden die drei primären Antikörper in Blocking-Puffer verdünnt (α-p24: 1:250, α-myc: 1:1000, α-Tubulin: 1:10.000). Die Membran wurde für 1 h mit den primären Antikörpern inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 30 min in Waschpuffer gewaschen. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der mit einem Fluorophor

gekoppelt war (1:10.000 in Blocking-Puffer verdünnt). Anschließend wurde die Membran wieder gewaschen. Die Auswertung erfolgte mit dem Odyssey Membrandokumentationssystem (LI-COR) anhand des verwendeten Protein-Markers.

### 3.5.3 Luciferase-Assay

Die Luciferase ist der Katalysator der oxidativen Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin (siehe Abbildung 9). Dabei wird Energie in Form von Licht frei. Bei einer erfolgreichen Infektion von Zellen mit einem Luciferase-Reportervirus wird das Enzym exprimiert. Je nachdem, wie viel Luciferase zur Verfügung steht, wird das im Substrat enthaltene Beetle Luciferin unter anderem zu Oxyluciferin und Licht umgesetzt. Die Infektiosität des Reportervirus ist also proportional zur gemessenen Biolumineszenz und gibt Aufschluss darüber, wie viele Zellen infiziert wurden. 72 h nach einer Infektion wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l 1x PBS gewaschen und anschließend mit 25  $\mu$ l 1x PLB lysiert. 20  $\mu$ l des Lysats wurden dann in 96-Well Luminometer-Platten transferiert. Die Messung der Lichtintensität (RLU) erfolgte mit einem Mikroplattenluminometer (Centro LB 960, Berthold Technologies). Das Messprogramm lief automatisiert wie folgt ab: Injektion von 50  $\mu$ l Luciferase-Substrat, Verzögerungszeit von 1 s, Messzeit von 1 s.

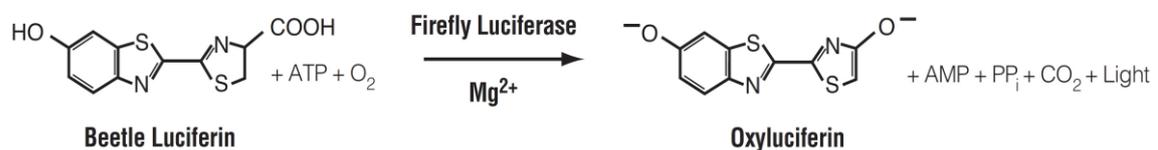


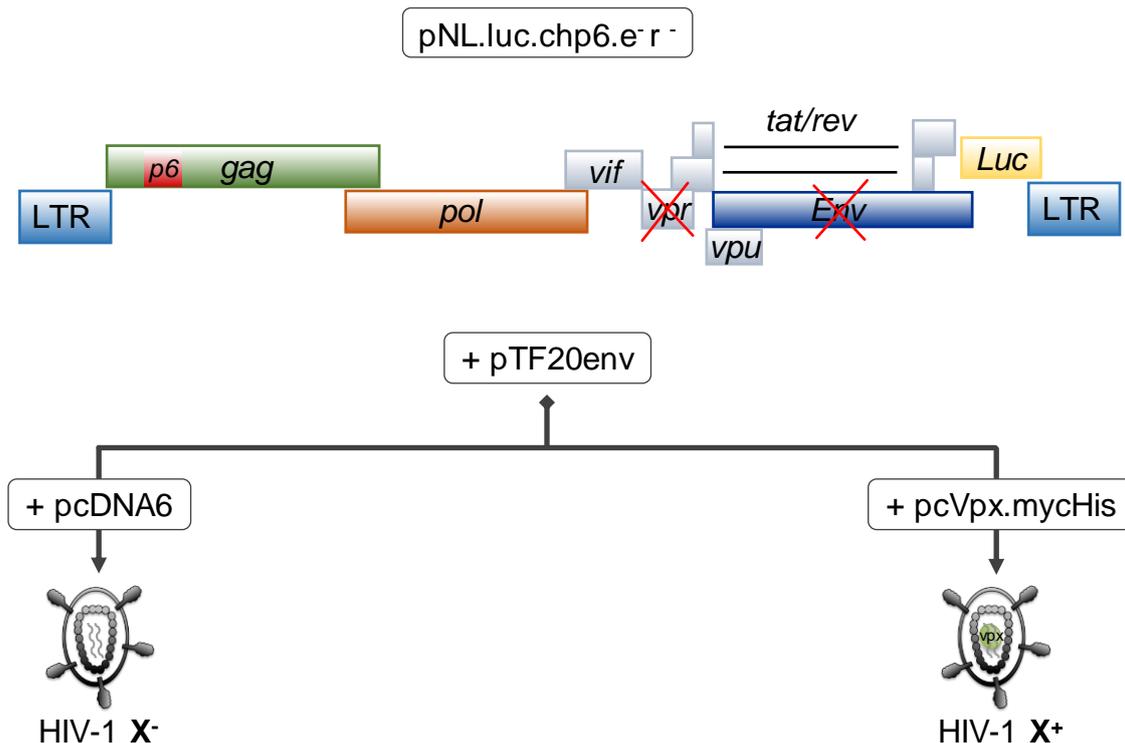
Abbildung 9: Oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin [45]

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Herstellung von pseudotypisierten Reporterviren

Für die erfolgreiche Infektion von Monozyten wird ein pseudotypisiertes Reportervirus benötigt, welches in der Lage ist, das virale Protein vpx zu verpacken. HIV-1 infiziert Monozyten ineffizient. Der Hauptgrund dafür ist der Restriktionsfaktor SAMHD1, der den dNTP-Pool in der Zelle senkt und damit die reverse Transkription von HIV-1 in diesen Zellen blockiert. Vpx ist der virale Antagonist zu SAMHD1 und degradiert diesen Restriktionsfaktor, sodass sich das Virus nach Anheftung und Eindringen in die Zelle replizieren kann.

Da HIV-1 weder ein vpx-Gen besitzt, noch das vpx-Protein von SIV<sub>mac</sub> oder HIV-2 verpacken kann, wurde für die nachfolgenden Experimente ein chimäres Virus hergestellt, das in der Lage ist, vpx zu verpacken. Dabei ersetzen die Aminosäuren 17-26 der p6-Domäne des gag-Gens von SIV<sub>mac</sub> die der p6-Domäne von HIV-1 [42]. Nach der in 3.3 beschriebenen Methode wurden die TFenv-pseudotypisierten Luciferase-Reporterviren HIV-1 X<sup>+</sup> und HIV-1 X<sup>-</sup> hergestellt (Abbildung 10). Die Reporterviren waren nur für einen Replikationszyklus infektiös, da die für die Infektion notwendigen Hüllproteine im viralen Hauptkonstrukt (pNL.luc.chp6.e<sup>r</sup>) durch eine Mutation im env-Gen nicht exprimiert werden konnten. Durch das Einbringen eines Luciferase-Reporter-Gens wurde eine spätere quantitative Auswertung mit einem Luciferase-Assay möglich.



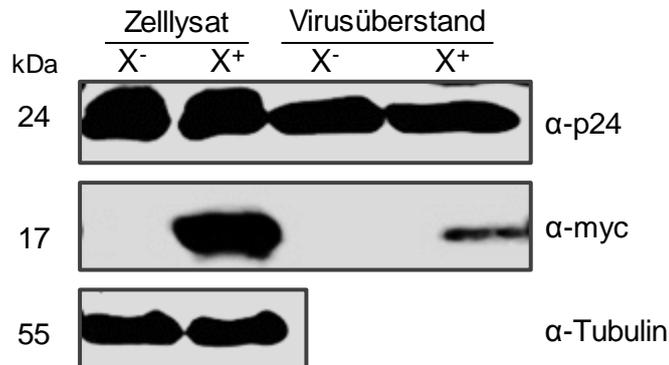
**Abbildung 10: Herstellung von pseudotypisierten Reporterviren**

HEK 293T-Zellen wurden mit Plasmid-DNA co-transfiziert, um pseudotypisierte Luciferase-Reporterviren herzustellen. Als virales Hauptkonstrukt (pNL.luc.chp6.e.r) diente ein HIV-1 Reportervirus, das weder für env noch für vpr codiert, dafür aber die p6-Domäne des SIV<sub>mac</sub> gag-Gens und ein Luciferase-Reporter-Gen besitzt. Dieses Hauptkonstrukt wurde dann mit einem Plasmid kombiniert, welches für ein TFenv-Gen codiert (pTF20env). Zur Herstellung von HIV-1 X<sup>-</sup> wurde außerdem ein Plasmid (pcVpx.mycHis) hinzugefügt, das für das akzessorische Protein vpx codiert. Bei dem HIV-1 X<sup>-</sup> Reportervirus diente ein leerer Vektor (pcDNA6) als Ausgleich. (Eigene Darstellung)

#### 4.1.1 Expressionsnachweis

Das Western Blot-Verfahren diente zur Überprüfung der hergestellten Reporterviren. Insgesamt wurden drei Proteine detektiert: p24, vpx und Tubulin. Das akzessorische Protein vpx konnte durch einen myc-Tag (zusammen mit Tag: 17 kDa) detektiert werden. Neben der Detektion des viralen Proteins war auch der Nachweis von p24 (24 kDa) wichtig, da diese Untereinheit des gag-Gens für die Synthese des Capsids zuständig ist. Tubulin (55 kDa) diente als Ladekontrolle. Dieses Protein ist Hauptbestandteil des Cytoskeletts und wird daher in jeder Zelle exprimiert. In Abbildung 11 ist die Western Blot-Analyse der beschriebenen Proteine dargestellt. Das Protein 24 wurde für HIV-1 X<sup>-</sup> und HIV-1 X<sup>+</sup> sowohl im Zelllysate als auch im Virusüberstand bei 24 kDa detektiert. Vpx konnte im Zelllysate und im Virusüberstand des HIV-1 X<sup>+</sup> Reportervirus bei 17 kDa nachgewiesen werden. Tubulin wurde für beide Reporterviren im Zelllysate bei 55 kDa detektiert.

Die Detektion der Proteine bestätigt die Herstellung reifer Reporterviren. HIV-1 X<sup>+</sup> ist zudem in der Lage, vpx zu verpacken. Beide Reporterviren können zur Infektion genutzt werden.



**Abbildung 11: Western Blot-Analyse**

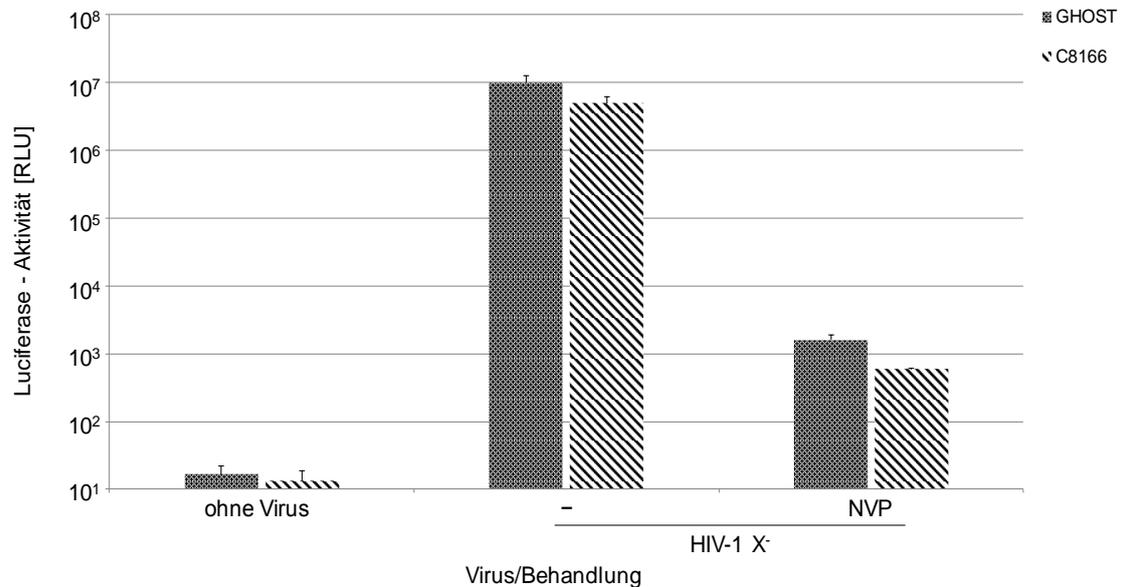
Für den Protein-Nachweis wurden sowohl Zellysat der transfizierten Zellen als auch Virusüberstände aufgetragen. Zur Detektion des akzessorischen Proteins vpx (17 kDa) diente ein myc-spezifischer Antikörper. Zum Nachweis reifer Reporterviren (24 kDa) diente ein p24-spezifischer Antikörper. Tubulin (55 kDa) wurde zusätzlich als Ladekontrolle im Zellysat detektiert.

#### 4.1.2 Virus-Titer-Bestimmung

Zur Bestimmung des Virus-Titers wurde zunächst nach einer Zelllinie gesucht, die für die Infektion mit den aus 4.1 generierten Reporterviren empfänglich ist. Dazu wurden GHOST-Zellen und C8166-Zellen mit HIV-1 X<sup>-</sup> infiziert. GHOST-Zellen exprimieren sowohl den CD4-Rezeptor als auch den CCR5-Corezeptor und stammen von einem humanen Osteosarkom ab. Es handelt sich dabei um modifizierte HOS-Zellen (G: GFP; T: T-Zell-Rezeptoren). Beide Rezeptoren sind für das Eindringen des HI-Virus in die Zelle notwendig. C8166, eine T-Zelllinie, stammt von einer T-Zell-Leukämie ab und exprimiert ebenfalls beide Rezeptoren. Da der Restriktionsfaktor SAMHD1 in sich teilenden Zellen nicht aktiv ist, muss das verwendete Reportervirus für eine erfolgreiche Infektion nicht in der Lage sein, vpx zu verpacken. Die Verwendung des HIV-1 X<sup>-</sup> Reportervirus war hierfür demnach ausreichend. Zellen der GHOST-Zelllinie wurden mit  $1 \times 10^4$  Zellen/Well und Zellen der C8166-Zelllinie mit  $5 \times 10^4$  Zellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät. Pro Versuchsansatz wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. 72 h nach der Infektion erfolgte die Auswertung durch einen Luciferase-Assay. Die Ergebnisse in Abbildung 12 zeigen die gemessenen Rohdaten in logarithmischer Skalierung. Der erste Ansatz ohne Zugabe eines Reportervirus diente dazu, mögliche Hintergrundsignale in Relation mit der gemessenen Aktivität zu setzen. Die gemessene Luciferase-Aktivität lag bei  $1 \times 10^7$  RLU

für die GHOST-Zellen und bei ca.  $5 \times 10^6$  RLU für die C8166-Zellen. Nevirapin bestätigt eine *bona fide* Infektion (bis zu  $10^4$ -fache Reduktion der Luciferase-Aktivität).

Beide Zelllinien sind für eine Infektion mit dem TFenv-pseudotypisierten Reportervirus empfänglich. Dies bestätigt, dass das hergestellte Reportervirus infektiös ist.

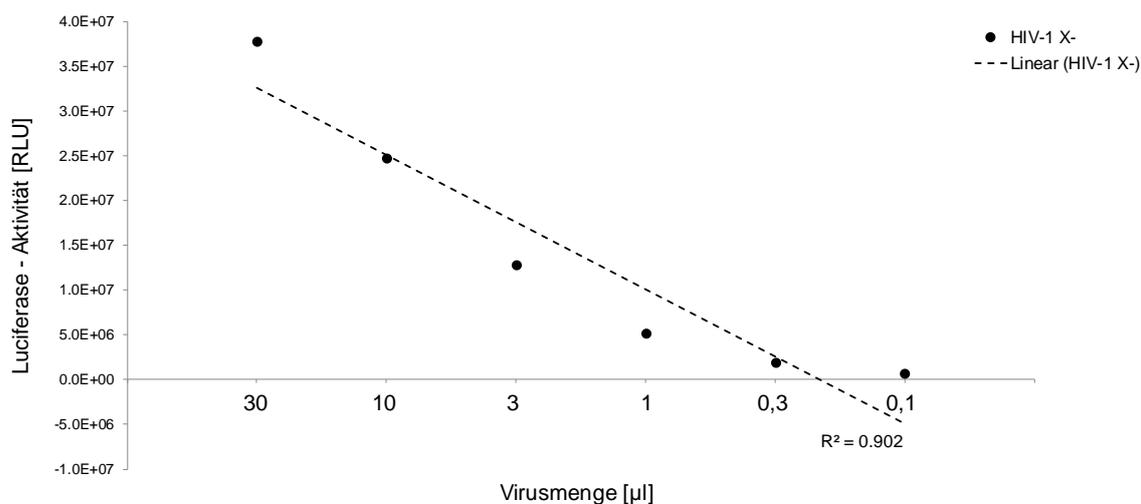


**Abbildung 12: Infektion von GHOST- und C8166-Zellen mit HIV-1 X<sup>-</sup>**

Die Zellen beider Zelllinien besitzen sowohl den CD4-Rezeptor als auch den CCR5-Corezeptor. Das hergestellte Reportervirus wurde auf beiden Zelllinien auf seine Infektiosität geprüft. Nevirapin (finale Konzentration: 3  $\mu$ M) diente als Kontrolle einer *bona fide* Infektion.

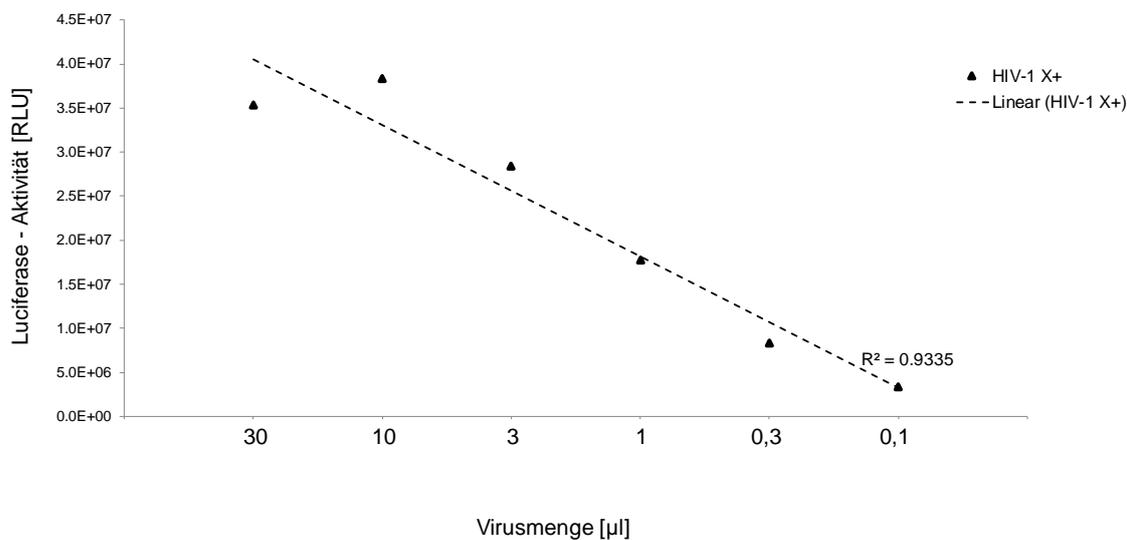
Nach der erfolgreichen Infektion von GHOST-Zellen wurde diese Zelllinie zur Bestimmung des Virus-Titers verwendet. Hierfür wurden pro Well 1x10<sup>4</sup> Zellen der GHOST-Zelllinie in einer 96-Well-Platte ausgesät und anschließend mit einer ansteigenden Menge Reportervirus (0,1-30  $\mu$ l) infiziert. Pro Versuchsansatz wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Eine quantitative Auswertung erfolgte mithilfe eines Luciferase-Assays. In den Abbildungen 13 und 14 sind die Standardkurven dargestellt, durch die sich die jeweiligen Titer bestimmen ließen: Für das HIV-1 X<sup>-</sup> Reportervirus hat sich ein Titer von  $3,3 \times 10^7$  RLU/ $\mu$ l und für das HIV-1 X<sup>+</sup> Reportervirus ein Wert von  $4,3 \times 10^7$  RLU/ $\mu$ l ergeben. Beide Standardreihen zeigen zudem gute Bestimmtheitsmaße (HIV-1 X<sup>-</sup>: 0,902; HIV-1 X<sup>+</sup>: 0,9335).

Die Titer der beiden Reporterviren sind vergleichbar.



**Abbildung 13: HIV-1 X-: Titer-Bestimmung**

Die Infektion von GHOST-Zellen mit ansteigender Menge an Reportervirus wurde mittels Luciferase-Assay ausgewertet. Die Daten dienen der Erstellung einer Standardkurve. Der daraus resultierende Titer beträgt  $3,3 \times 10^7$  RLU/ $\mu$ l.



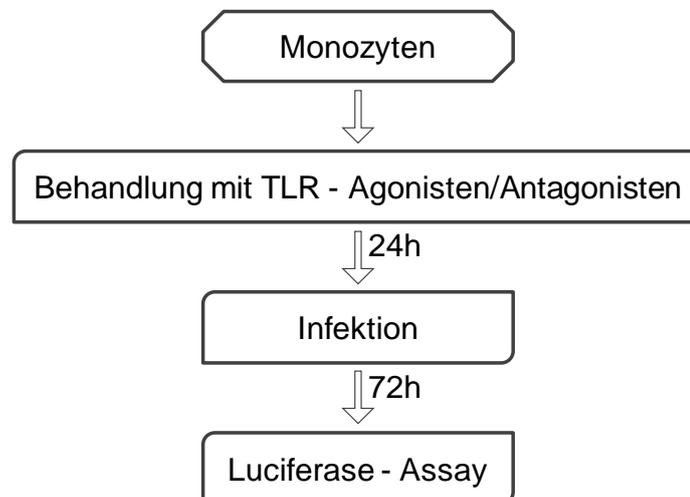
**Abbildung 14: HIV-1 X+: Titer-Bestimmung**

Die Infektion von GHOST-Zellen mit ansteigender Menge an Reportervirus wurde mittels Luciferase-Assay ausgewertet. Die Daten dienen der Erstellung einer Standardkurve. Der daraus resultierende Titer beträgt  $4,3 \times 10^7$  RLU/ $\mu$ l.

## 4.2 Behandlung mit TLR-Agonisten und Infektion von Monozyten

### 4.2.1 Ablauf zur Behandlung und Infektion von Monozyten

Abbildung 15 stellt eine vereinfachte Übersicht der Arbeitsabläufe dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente mit verschiedenen pseudotypisierten Reporterviren und TLR-Agonisten bzw. -Antagonisten durchgeführt. Zur quantitativen Auswertung wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt, bei dem die Luciferase-Aktivität in RLU gemessen wurde. Die Aktivität verhielt sich dabei proportional zur Infektiosität der Reporterviren. Die Werte gaben Aufschluss darüber, inwieweit die Aktivierung von TLR7/TLR8 die Infektion der Monozyten beeinflusst hat.



**Abbildung 15: Versuchsablauf zur Behandlung und Infektion von Monozyten**

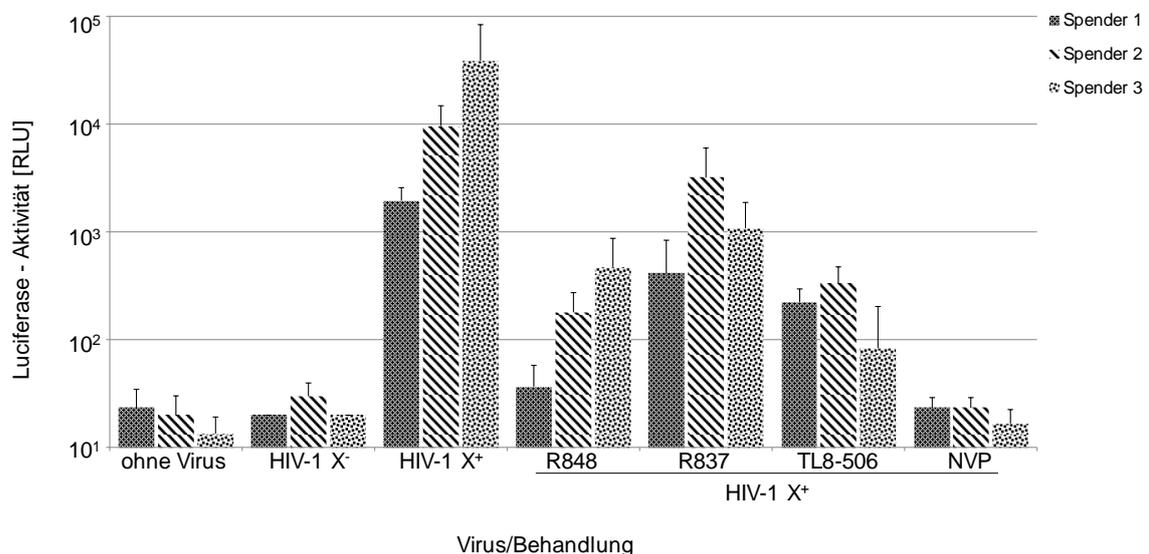
Aus PBMCs isolierte Monozyten von gesunden Spendern wurden zunächst mit TLR-Agonisten behandelt und nach 24 h mit pseudotypisierten Reporterviren infiziert. Nach 72 h wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt, der Aufschluss darüber gab, inwieweit die Aktivierung von TLR7/8 Einfluss auf die Infektion von Monozyten hat. (Eigene Darstellung)

### 4.2.2 Infektion mit VSVg-pseudotypisierten Reporterviren

Nach bisherigem Wissensstand ist bekannt, dass eine Aktivierung von TLR7/8 eine Restriktion in infizierten Monozyten hervorruft. Dazu wurden Monozyten mit dem TLR7/8-Agonisten R848 behandelt und anschließend mit VSVg-pseudotypisierten Reporterviren infiziert. Neben R848 existieren noch weitere TLR-Agonisten, deren Wirkung getestet werden sollte. Zunächst wurde überprüft, ob sich die Ergebnisse von Hofmann *et al.* [1] reproduzieren lassen. Im ersten Experiment wurden die Monozyten mit VSVg-pseudotypisierten Reporterviren (siehe 2.9) infiziert. Neben R848 (Aktivierung von TLR7/8) wurden zwei weitere Agonisten getestet: R837 (Aktivierung von TLR7) und TL8-506

(Aktivierung von TLR8). Hierfür wurden aus PBMCs isolierte Monozyten von drei gesunden Spendern mit den drei TLR-Agonisten behandelt und anschließend infiziert (HIV-1 X<sup>-</sup>:  $3,3 \times 10^7$  RLU; HIV-1 X<sup>+</sup>:  $1,4 \times 10^7$  RLU). Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse nach Durchführung eines Luciferase-Assays (jeweils in Dreifachbestimmung). Die Ergebnisse zeigen die gemessenen Rohdaten in logarithmischer Skalierung. Der Ansatz ohne Zugabe eines Reportervirus diente dazu, mögliche Hintergrundsignale in Relation mit der gemessenen Aktivität zu setzen. HIV-1 X<sup>-</sup> war durch das Fehlen von vpx nicht in der Lage, die Zellen zu infizieren (keine Zunahme der gemessenen Luciferase-Aktivität im Vergleich zu dem Hintergrundsignal). Die unbehandelten Monozyten konnten hingegen mit HIV-1 X<sup>+</sup> infiziert werden (Luciferase-Aktivität:  $2 \times 10^3$ - $4 \times 10^4$  RLU). Nevirapin (finale Konzentration:  $3 \mu\text{M}$ ) blockierte die HIV-1 X<sup>+</sup> Infektion, was eine *bona fide* Infektion bestätigt. Für alle drei TLR-Agonisten (finale Konzentration:  $10 \mu\text{M}$ ) wurde eine verringerte Luciferase-Aktivität gemessen: Für R848 ergab sich eine 45- bis 80-fache Verringerung; für R837 eine 3- bis 40-fache und für TL8-506 eine 10- bis 500-fache Signalreduktion.

Die verringerte Luciferase-Aktivität bestätigt, dass die Aktivierung der entsprechenden TLR eine HIV-1 Restriktion induziert, was die zuvor veröffentlichten Resultate bestätigt. Zudem geht aus den hier gezeigten Ergebnissen hervor, dass sich die Agonisten in ihrer Wirkungsweise unterscheiden.



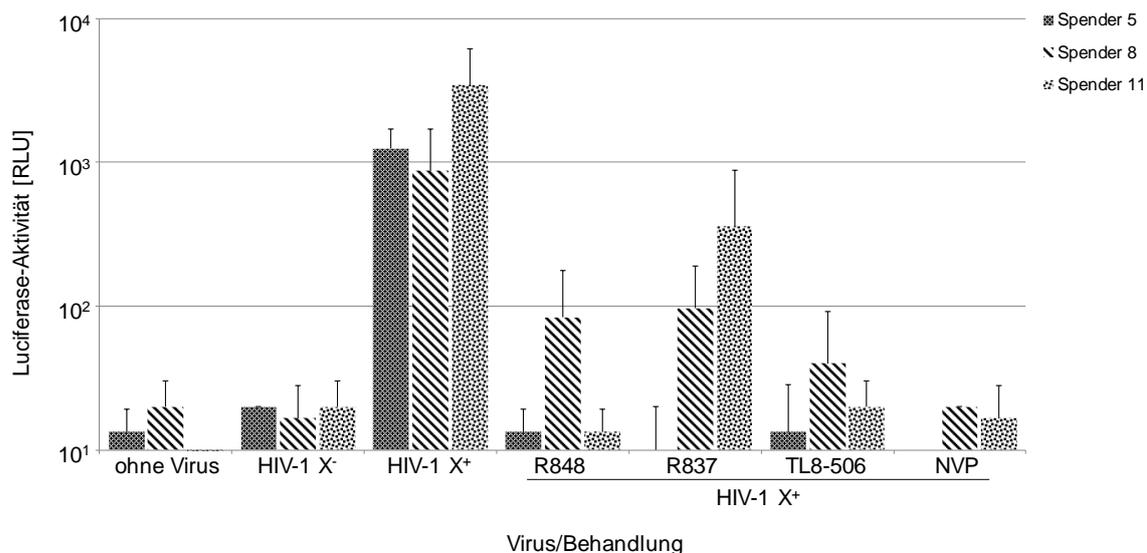
**Abbildung 16: Aktivierung von TLR7/8 löst Restriktion in infizierten Monozyten aus**

Aus PBMCs isolierte Monozyten von drei gesunden Spendern wurden mit R848 (Aktivierung von TLR7/8), R837 (Aktivierung von TLR7) und TL8-506 (Aktivierung von TLR8) behandelt (finale Konzentration:  $10 \mu\text{M}$ ) und anschließend mit VSVg-pseudotypisierten Reporterviren (HIV-1 X<sup>-</sup>:  $3,3 \times 10^7$  RLU; HIV-1 X<sup>+</sup>:  $1,4 \times 10^7$  RLU) infiziert. Die TLR-Aktivierung durch alle Agonisten führte zu einer verringerten Luciferase-Aktivität. Nevirapin ( $3 \mu\text{M}$ ) diente als Kontrolle einer *bona fide* Infektion.

### 4.2.3 Infektion mit TFenv-pseudotypisierten Reporterviren

Im zweiten Experiment erfolgte eine ähnliche Durchführung. Anstelle der VSVg-pseudotypisierten Reporterviren wurden die im Voraus hergestellten TFenv-pseudotypisierten Reporterviren verwendet (HIV-1 X<sup>-</sup>:  $3,3 \times 10^8$  RLU; HIV-1 X<sup>+</sup>:  $4,3 \times 10^8$  RLU). In Abbildung 17 sind die Ergebnisse des Luciferase-Assays von drei gesunden Spendern dargestellt (jeweils in Dreifachbestimmung; Rohdaten in logarithmischer Skalierung). Der Ansatz ohne Zugabe eines Reportervirus diente dazu, mögliche Hintergrundsignale in Relation mit der gemessenen Aktivität zu setzen. HIV-1 X<sup>-</sup> war durch das Fehlen von vpx nicht in der Lage, die Zellen zu infizieren (keine Zunahme der gemessenen Luciferase-Aktivität im Vergleich zu dem Hintergrundsignal). Die gemessene Luciferase-Aktivität der unbehandelten, mit HIV-1 X<sup>+</sup> infizierten Zellen lag bei 900-3000 RLU. Die Nevirapin-Kontrolle bestätigt eine *bona fide* Infektion. Die Behandlung erfolgte mit den TLR-Agonisten (finale Konzentration: 10 µM) R848 (Aktivierung von TLR7/8), R837 (Aktivierung von TLR7) und TL8-506 (Aktivierung von TLR8). Für alle drei TLR-Agonisten wurde eine eindeutig verringerte Luciferase-Aktivität gemessen: Für R848 ergab sich eine 12- bis 300-fache Verringerung; für R837 eine 9- bis 100-fache und für TL8-506 eine 45- bis 1000-fache Signalreduktion.

Auch in diesem Experiment bestätigt die verringerte Luciferase-Aktivität, dass durch die Aktivierung der entsprechenden TLR eine Restriktion der HIV-1 X<sup>+</sup> Infektion ausgelöst wurde. Insgesamt wurde das Experiment mit acht verschiedenen Spendern durchgeführt (siehe Anhang: Abbildung 21) und zeigt, dass die Ergebnisse reproduzierbar sind.



**Abbildung 17: Aktivierung von TLR7/8 löst Restriktion in infizierten Monozyten aus**

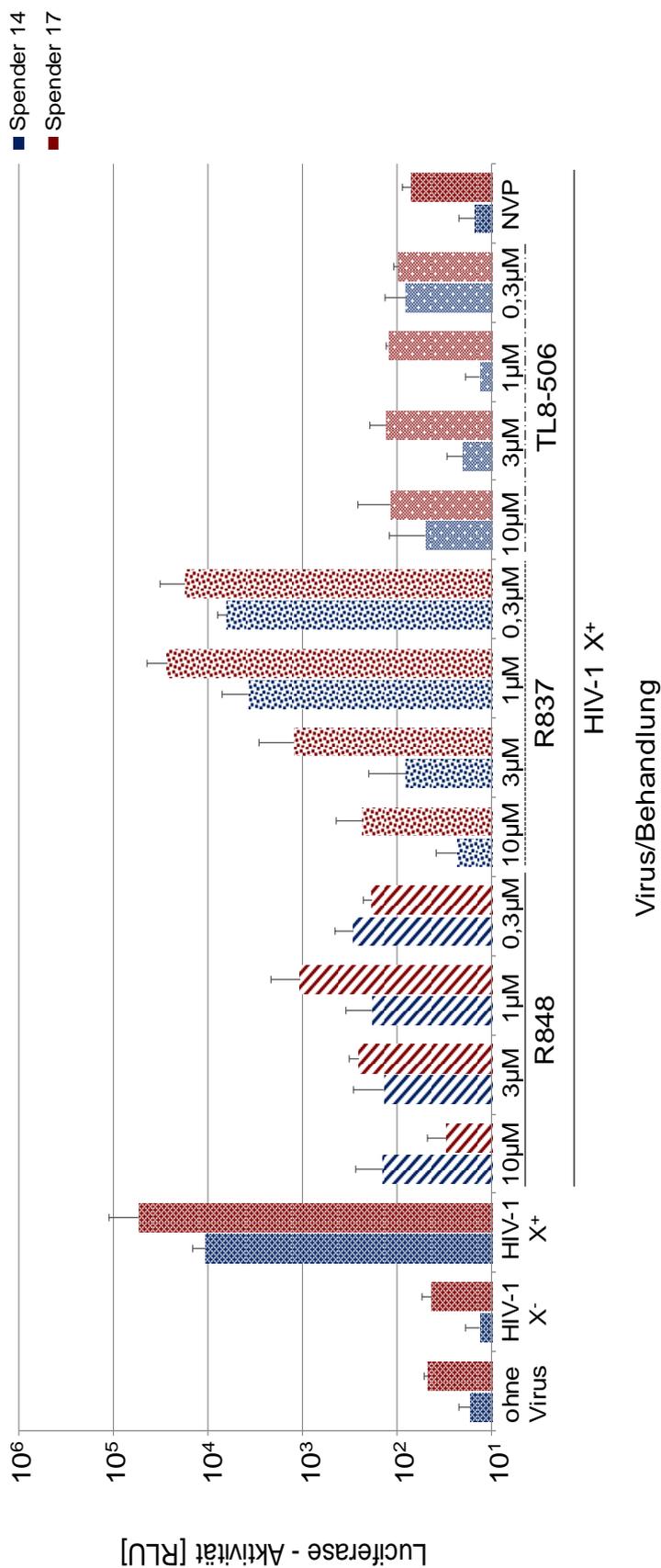
Aus PBMCs isolierte Monozyten von drei gesunden Spendern wurden mit R848 (Aktivierung von TLR7/8), R837 (Aktivierung von TLR7) und TL8-506 (Aktivierung von TLR8) behandelt (finale Konzentration: 10  $\mu$ M) und anschließend mit TFenv-pseudotypisierten Reporterviren (HIV-1 X<sup>-</sup>: 3,3x10<sup>8</sup> RLU; HIV-1 X<sup>+</sup>: 4,3x10<sup>8</sup> RLU) infiziert. Die Aktivierung durch alle TLR-Agonisten führte zu einer verringerten Luciferase-Aktivität. Nevirapin (3  $\mu$ M) diente als Kontrolle einer *bona fide* Infektion.

### 4.3 Titration der TLR-Agonisten

Da die Wirkungsweise der TLR-Agonisten in den bisherigen Experimenten variierte, wurde die Potenz der einzelnen Agonisten, eine HIV-1 X<sup>+</sup> Infektion zu blockieren, für unterschiedliche Konzentrationen überprüft. Für die Titration wurden die Zellen von zwei gesunden Spendern mit den TLR-Agonisten R848 (Aktivierung von TLR7/8), R837 (Aktivierung von TLR7) und TL8-506 (Aktivierung von TLR8) behandelt. Dabei wurden die Agonisten mit einer ansteigenden Konzentration von 0,3  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit TFenv-pseudotypisierten Reporterviren (HIV-1 X<sup>-</sup>: 3,3x10<sup>8</sup> RLU; HIV-1 X<sup>+</sup>: 4,3x10<sup>8</sup> RLU) infiziert. Die Ergebnisse des Luciferase-Assays sind in Abbildung 18 dargestellt (jeweils in Dreifachbestimmung; Rohdaten in logarithmischer Skalierung). Der Ansatz ohne Zugabe eines Reportervirus diente dazu, mögliche Hintergrundsignale in Relation mit der gemessenen Aktivität zu setzen. HIV-1 X<sup>-</sup> war durch das Fehlen von vpx nicht in der Lage, die Zellen zu infizieren (keine Zunahme der gemessenen Luciferase-Aktivität im Vergleich zu dem Hintergrundsignal). Die gemessene Luciferase-Aktivität der unbehandelten, mit HIV-1 X<sup>+</sup> infizierten Zellen lag bei 1x10<sup>4</sup>-5x10<sup>4</sup> RLU. Die Nevirapin-Kontrolle bestätigt eine *bona fide* Infektion.

Für R848 (Konzentrationen 0,3-10  $\mu\text{M}$ ) ergab sich eine 35- bis 1670-Fache Verringerung der Luciferase-Aktivität. Für R837 (Konzentrationen 3  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) ergab sich eine 50- bis 500-Fache Verringerung der Luciferase-Aktivität. Für die Konzentrationen 0,3  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  wurde die Luciferase-Aktivität maximal um das 2,5-Fache verringert. Für TL8-506 (Konzentrationen 0,3-10  $\mu\text{M}$ ) ergab sich eine 125- bis 670-Fache Verringerung der Luciferase-Aktivität.

Für die Konzentrationen 3  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  sind alle TLR-Agonisten in der Lage, eine HIV-1 X<sup>+</sup> Infektion zu blockieren. Anders als R837 führen R848 und TL8-506 zudem bis zu einer Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  zu einer HIV-1-Restriktion.



**Abbildung 18: Titration der TLR-Agonisten**

Aus PBMCs isolierte Monozyten von zwei gesunden Spendern wurden mit den TLR-Agonisten R848 (Aktivierung von TLR7/8), R837 (Aktivierung von TLR7) und TL8-506 (Aktivierung von TLR8) in Konzentrationen von 0,3-10 µM behandelt und anschließend mit den TFen-pseudotypisierten Reporterviren HIV-1 X<sup>-</sup> (3,3x10<sup>8</sup> RLU) und HIV-1 X<sup>+</sup> (4,3x10<sup>8</sup> RLU) infiziert. Nevirapin (3 µM) diente als Kontrolle einer *bona fide* Infektion.

## 4.4 Behandlung mit TLR-Antagonisten und Infektion von Monozyten

Um Rückschlüsse über die Spezifität der Restriktion durch die verwendeten TLR-Agonisten ziehen zu können, wurde im nächsten Schritt zusätzlich eine Behandlung der Monozyten mit TLR-Antagonisten durchgeführt. Das Antagonisten-Agonisten-Verhältnis sollte dabei 3:1 betragen. Um den Materialaufwand möglichst gering zu halten, wurden die Erkenntnisse aus der Agonisten-Titration (siehe 4.3) genutzt: Da für TLR8 kein entsprechender Antagonist zur Verfügung stand und durch die geringere Wirkungsweise von R837 ein zu hoher Materialaufwand entstehen würde (für ein 3:1 Verhältnis wären pro Ansatz 9  $\mu\text{M}$  der Antagonisten notwendig), ist für das weitere Vorgehen die Entscheidung auf die Verwendung von R848 mit einer Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  und den Einsatz der Antagonisten mit einer Konzentration von 0,9  $\mu\text{M}$  gefallen. Die Monozyten von sechs gesunden Spendern wurden aus PBMCs isoliert und zuerst mit den TLR-Antagonisten behandelt. Insgesamt standen zwei solcher Antagonisten zur Verfügung: ODN 2087 (Inhibierung von TLR7/8) und ODN 20958 (Inhibierung von TLR7). Die jeweiligen *Toll-like* Rezeptoren wurden durch eine Behandlung inhibiert. In einer anschließenden Behandlung mit R848 (Aktivierung von TLR7/8) sollten diese inhibierten TLR theoretisch nicht mehr aktiviert werden können und somit zu keiner Veränderung der Luciferase-Aktivität führen. Nach der Antagonisten- und Agonisten-Behandlung erfolgte die Infektion mit den TFenv-pseudotypisierten Reporterviren HIV-1 X<sup>-</sup> ( $5 \times 10^8$  RLU) und HIV-1 X<sup>+</sup> ( $6 \times 10^8$  RLU). Die Ergebnisse des Luciferase-Assays sind Abbildung 19 zu entnehmen (jeweils in Dreifachbestimmung; Rohdaten in logarithmischer Skalierung).

Die gemessene Luciferase-Aktivität der unbehandelten, mit HIV-1 X<sup>+</sup> infizierten Monozyten lag bei 900-8000 RLU. Durch die Zugabe von R848 (Aktivierung von TLR7/8) wurde die Luciferase-Aktivität bei den Spendern 12-14, 16 und 17 um das 15- bis 50-Fache verringert. Bei Spender 15 war die Verringerung der Luciferase-Aktivität mit einem Faktor von fünf weniger stark ausgeprägt. Dies spiegelt die bisherigen Ergebnisse wider: Die R848-Behandlung der Monozyten führt zu einer HIV-1-Restriktion.

Die Kombination aus ODN 2087 (Inhibierung von TLR7/8) und R848 (Aktivierung von TLR7/8) sollte zunächst klären, ob die R848-induzierte HIV-1-Restriktion spezifisch durch die Aktivierung von TLR7/8 erfolgt.

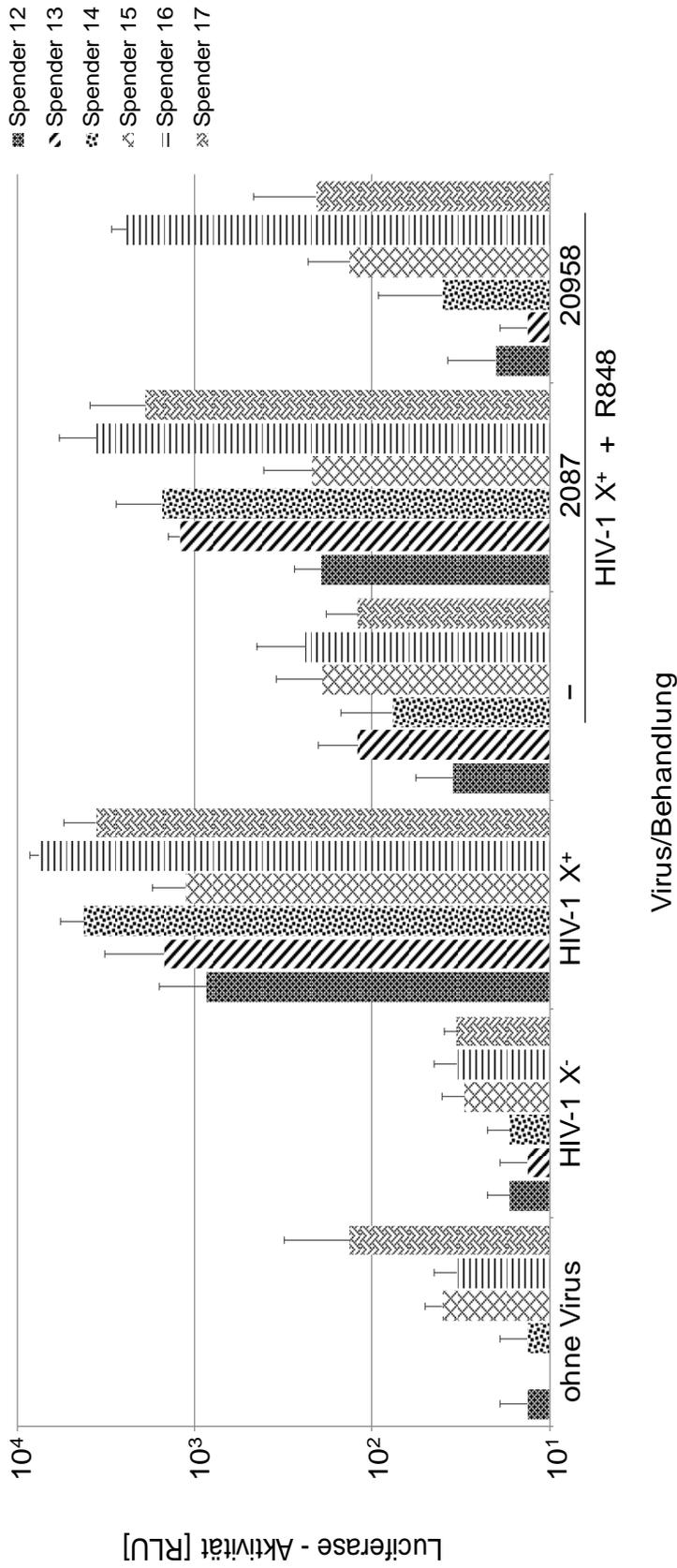
Bei den Spendern 12-14, 16 und 17, deren Zellen zusätzlich mit ODN 2087 behandelt wurden, war die Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten, mit HIV-1 X<sup>+</sup> infizierten Monozyten um das 1,5- bis 4,5-Fache verringert. Bei Spender 15 hatte die

Inhibierung von TLR7/8 keinen Einfluss auf die Wirkungsweise von R848: Die Luciferase-Aktivität entsprach mit ca. 200 RLU in etwa der bei der R848-Behandlung. Die Inhibierung von TLR7/8 führte infolgedessen (bis auf Spender 15) zu keiner Restriktion der HIV-1 X<sup>+</sup> Infektion.

Als Nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob R848 (Aktivierung von TLR7/8) in Kombination mit ODN 20958 (Inhibierung von TLR7) nach wie vor zu einer HIV-1-Restriktion führt.

Bei den Spendern 12-15 und 17, deren Zellen zusätzlich mit ODN 20958 behandelt wurden, war die Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten, mit HIV-1 X<sup>+</sup> infizierten Zellen um das 10- bis 100-Fache verringert. Bei Spender 16 war die Verringerung der Luciferase-Aktivität mit einem Faktor von drei weniger stark ausgeprägt. Trotz der Inhibierung von TLR7 konnte die HIV-1 X<sup>+</sup> Infektion, außer bei Spender 16, blockiert werden.

Durch die Inhibierung von TLR7/8 kann mit Hilfe von R848 (Aktivierung von TLR7/8) in infizierten Monozyten keine Restriktion induziert werden. Die Inhibierung von TLR7 hat keinen Einfluss auf die Wirkungsweise von R848, die zu einer HIV-1 Restriktion führt.

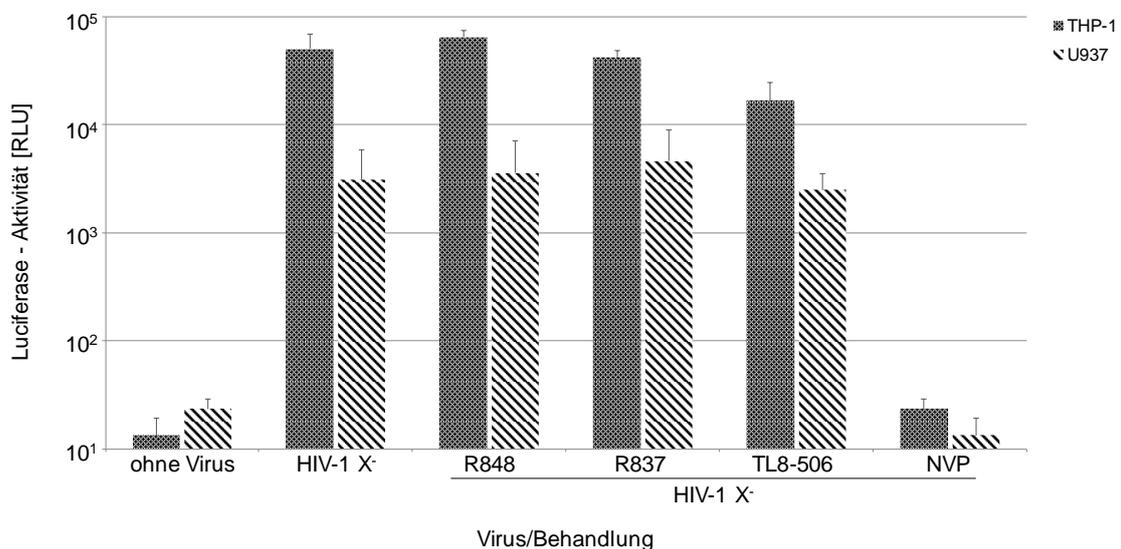


**Abbildung 19: Die Aktivierung von TLR8 ist wahrscheinlich Hauptauslöser der Restriktion**  
 Aus PBMCs isolierte Monozyten von sechs gesunden Spendern wurden mit den TLR-Antagonisten (0,9 µM) ODN 2087 (Inhibierung von TLR7/8) und ODN 20958 (Inhibierung von TLR7) behandelt. Im Anschluss folgte eine Behandlung mit dem TLR-Agonisten (0,3 µM) R848 (Aktivierung von TLR7/8). Es folgte eine Infektion der Zellen mit den TFenv-pseudotypisierten Reporterviren HIV-1 X<sup>-</sup> (5x10<sup>8</sup> RLU) und HIV-1 X<sup>+</sup> (6x10<sup>8</sup> RLU).

## 4.5 Behandlung mit TLR-Agonisten und Infektion von Zelllinien

THP-1 und U937 sind Zellen monozytärer Zelllinien und sollten als potentieller Ersatz für primäre humane Zellen getestet werden. THP-1- und U937-Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen/Well) wurden in 50  $\mu$ l Medium ausgesät. Zur erfolgreichen Infektion genügt auch hier wie in 4.1.2 das HIV-1 X<sup>-</sup> Reportervirus ( $1 \times 10^7$  RLU), da sich die Zellen beider Zelllinien teilen und SAMHD1 nicht eliminiert werden muss. Die Zellen wurden mit R848 (Aktivierung von TLR7/8), R837 (Aktivierung von TLR7) und TL8-506 (Aktivierung von TLR8) behandelt (finale Konzentration: 10  $\mu$ M) und anschließend mit dem VSVg-pseudotypisierten Reportervirus infiziert. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse nach Durchführung eines Luciferase-Assays (jeweils in Dreifachbestimmung; Rohdaten in logarithmischer Skalierung). Die Nevirapin-Kontrolle (finale Konzentration: 3  $\mu$ M) bestätigt eine *bona fide* Infektion. Die Luciferase-Aktivität der unbehandelten, mit HIV-1 X<sup>-</sup> infizierten THP-1-Zellen lag bei 50.000 RLU. Für U937-Zellen lag der Wert bei 3000 RLU. Die Behandlung mit den TLR-Agonisten zeigte für R848 und R837 keinen Einfluss auf die Luciferase-Aktivität. Die Behandlung mit TL8-506 zeigte eine bis zu 2,5-fach verringerte Luciferase-Aktivität.

THP-1-Zellen lassen sich im Vergleich zu U937-Zellen besser infizieren (Faktor 17). Bei beiden Zelllinien hat die TLR-Aktivierung keinen Einfluss auf die Luciferase-Aktivität.



**Abbildung 20: Aktivierung von TLR7/8 in THP-1- und U937-Zellen hat keinen Einfluss auf eine HIV-1 Infektion**

THP-1- und U937-Zellen wurden wie Monozyten zuvor mit R848 (Aktivierung von TLR7/8), R837 (Aktivierung von TLR7) und TL8-506 (Aktivierung von TLR8) behandelt (finale Konzentration: 10  $\mu$ M) und anschließend mit dem VSVg-pseudotypisierten Reportervirus HIV-1 X<sup>-</sup> ( $1 \times 10^7$  RLU) infiziert. Die TLR-Aktivierung durch alle Agonisten führte zu keiner verringerten Luciferase-Aktivität. Nevirapin (3  $\mu$ M) diente als Kontrolle einer *bona fide* Infektion.

## 5 Diskussion

*Toll-like* Rezeptoren können molekulare Muster von Pathogenen erkennen [24] und eine Immunreaktion, bestehend aus der Expression von antiviralen Proteinen und proinflammatorischen Zytokinen, hervorrufen [25, 26]. TLR7 und TLR8 befinden sich auf der Endosomenmembran von Monozyten [27] und erkennen einzelsträngige RNA [29, 30], lassen sich aber auch durch synthetisch hergestellte Agonisten *in vitro* aktivieren [31-33]. Monozyten gehören zu den sich nicht teilenden Zellen des Immunsystems [28], in denen der bereits bekannte Restriktionsfaktor SAMHD1 aktiv ist und die Replikation des HI-Virus Typ 1 inhibieren kann [36]. Laguette *et al.* [40] und Hrecka *et al.* [41] identifizierten SAMHD1 als den Restriktionsfaktor, der durch das akzessorische Protein vpx degradiert wird. Nian *et al.* [46] und Buitendijk *et al.* [47] zeigten, dass die Aktivierung von TLR7/8 in Monozyten bzw. PBMCs durch synthetisch hergestellte Liganden zu einer Inhibierung der HIV-1 Replikation führt. Hofmann *et al.* [1] nutzten zur Infektion von Monozyten ein pseudotypisiertes HI-Virus Typ 1, das in der Lage war, das akzessorische Protein vpx von SIV<sub>mac</sub> zu verpacken und damit die antivirale Wirkung von SAMHD1 zu blockieren. Es hat sich gezeigt, dass die Infektion trotz fehlender Wirkung von SAMHD1 durch die Aktivierung von TLR7 und 8 restringiert wird. Diese Ergebnisse legen den Rückschluss nahe, dass neben SAMHD1 ein anderer, bis dato unbekannter Restriktionsfaktor dafür verantwortlich ist. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Restriktion mit dem Verlust viraler RNA einhergeht. Es stellt sich weiterhin die Frage, inwieweit das angeborene Immunsystem in der Lage ist, eine virale Infektion durch die Expression zellulärer Proteine einzudämmen.

Die durch TLR7/8-Aktivierung hervorgerufene HIV-1 Restriktion in Monozyten sollte im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden. Am Anfang war es wichtig zu klären, ob die bisher gezeigten Ergebnisse mit VSVg-pseudotypisierten Reporterviren auch mit der Verwendung von TFenv-pseudotypisierten Reporterviren reproduzierbar sind, da dies einer *in vivo* HIV-1 Infektion entsprechen würde. In Abbildung 17 (S. 34) wird dies erfolgreich gezeigt: Das TFenv-pseudotypisierte Reportervirus HIV-1 X<sup>+</sup>, welches zudem das akzessorische Protein vpx verpackt, infizierte die Monozyten erfolgreich. Die Infektiosität ist im Vergleich zu dem VSVg-pseudotypisierten Virus (Abbildung 16, S. 32) im Durchschnitt um das 10-Fache verringert, obwohl die 30-Fache Menge des Virus eingesetzt wurde. Dieses Ergebnis lässt sich jedoch dadurch erklären, dass das VSVg-pseudotypisierte Reportervirus im Gegensatz zu dem TFenv-pseudotypisierten Reportervirus unabhängig von dem CD4-Rezeptor und CCR5- bzw. CXCR4-Corezeptor in die Zellen eindringen kann. Diese Eigenschaft könnte durchaus in einer höheren Infektiosität

resultieren. Es ist zudem bekannt, dass Monozyten eine geringere Anzahl an Rezeptoren besitzen, die für das erfolgreiche Eindringen des Virus obligatorisch sind [48]. Bei der HIV-1 X<sup>+</sup> Infektion traten zwischen den Spendern zum Teil erhebliche Schwankungen auf. Laut Angaben des Blutspendedienstes waren alle Spender zum Zeitpunkt der Blutabnahme in einem gesunden Zustand. Hat das Immunsystem eines Spenders jedoch kurz vor der Spende eine Infektion bekämpft, könnte es durchaus sein, dass durch hochregulierte Interferone die Expression von zusätzlichen Restriktionsfaktoren begünstigt war. In solch einem Fall würden sich zudem vermehrt Monozyten im Blut befinden, die zusammengenommen zu einer höheren Infektiosität führen könnten.

Neben TFenv-pseudotypisierten Viren stand auch die Verwendung von verschiedenen TLR-Agonisten im Vordergrund. R848 aktiviert TLR7 und 8 gleichzeitig. Bisher konnte jedoch nicht gezeigt werden, ob die Restriktion auch allein durch die Stimulation eines Rezeptors induziert wird. In Abbildung 17 (S. 34) hat sich gezeigt, dass auch die Aktivierung von TLR7 durch R837 und TLR8 durch TL8-506 eine Restriktion in HIV-1 X<sup>+</sup> infizierten Monozyten auslöst. Es zeigten sich jedoch Unterschiede in der Wirkungsweise: Die Aktivierung von TLR8 durch TL8-506 führte im Durchschnitt zu einer mehr als doppelt so starken HIV-1 X<sup>+</sup> Restriktion als die Aktivierung von TLR7 durch R837. Aus der Titration der TLR-Agonisten (Abbildung 18, S. 36) geht auch hervor, dass R837 bei niedrigen Konzentrationen (0,3-1 µM) keine antivirale Wirkung mehr zeigt. Es lässt sich annehmen, dass *Toll-like* Rezeptor 7 womöglich nicht Hauptauslöser der zuvor gezeigten Restriktion durch R848 (Aktivierung von TLR7/8) ist. Buitendijk *et al.* [47] nutzten in ihren Experimenten für die Aktivierung von TLR7 andere Liganden wie Gardiquimod und CL264. Es könnte auch durchaus möglich sein, dass andere Agonisten durch eine höhere Affinität für eine maßgebende Aktivierung des Rezeptors besser geeignet sind als R837.

Die getrennte Aktivierung von TLR7 und TLR8 führte zu keinem eindeutigen Aufschluss über die Spezifität der Restriktion. Zur weiteren Aufklärung wurden daher zusätzlich TLR-Antagonisten verwendet (Abbildung 19, S. 39). ODN 20958 inhibiert TLR7 und ODN 2087 TLR8. Beide Antagonisten wurden mit dem Agonisten R848 kombiniert. Wie erwartet zeigte sich bei der Kombination aus Inhibierung und Aktivierung von TLR7/8 kein deutlicher Unterschied zu den unbehandelten Zellen, die mit HIV-1 X<sup>+</sup> infiziert wurden. Die Luciferase-Aktivität wurde minimal um das 1,5-Fache (Spender 13) verringert und maximal um das 5-Fache (Spender 15). Die leichte Abnahme der Infektiosität beruht höchstwahrscheinlich darauf, dass nicht alle Rezeptoren durch den Antagonisten blockiert wurden und so die Aktivierung durch R848 zu einem minimalen Effekt geführt hat. Die

Antagonisten und Agonisten könnten in Zukunft in einem veränderten Verhältnis als 3:1 eingesetzt werden.

Im Gegensatz dazu hatte die Inhibierung von TLR7 durch ODN 20958 bis auf eine Ausnahme (Spender 16) keinen Einfluss auf die R848-Wirkung. Bei Spender 16 zeigte sich lediglich eine 3-fache Reduktion der Luciferase-Aktivität (vgl. bis zu 100-fache Reduktion bei den restlichen Spendern). Die Zellen dieses Spenders ließen sich jedoch auch mit einem Wert von 7000 RLU am besten infizieren (andere Spender erreichten maximal 4000 RLU). Lagen bei diesem Spender deutlich mehr Monozyten vor, könnte die eingesetzte Konzentration von R848 (0,3  $\mu$ M) dazu geführt haben, dass für die Anzahl der Rezeptoren nicht genügend Liganden zur Verfügung standen. Die Ergebnisse dieses Experiments deuten darauf hin, dass die durch R848 induzierte HIV-1 Restriktion spezifisch durch TLR8 ausgelöst wird. In Zukunft sollte zusätzlich ein Antagonist gefunden werden, der TLR8 inhibiert. Dieser könnte dann in Kombination mit dem TLR-Agonisten TL8-506 angewendet werden. Zudem sollte auch die Kombination von ODN 20958 und R837 getestet werden. Zuvor sollte jedoch überprüft werden, ob andere Agonisten bei der Aktivierung von TLR7 einen stärkeren Effekt zeigen.

In dem letzten Experiment wurde der Versuch gestartet, die bisherige Behandlung und Infektion von Monozyten auf monozytäre Zelllinien zu übertragen. Obwohl primäre Zellen den Vorteil haben, ein realitätsnahes Verhalten widerzuspiegeln, lassen sich Zelllinien durch molekularbiologische Methoden leicht manipulieren und erweitern so das Spektrum an möglichen Experimenten. Abbildung 20 (S. 40) zeigt jedoch, dass die Aktivierung von TLR7 und TLR8 durch R848, R837 und TL8-506 keine Restriktion der HIV-1 X' Infektion ausgelöst hat. Bosshart *et al.* [49] haben in ihrer Veröffentlichung insbesondere Unterschiede zwischen THP-1-Zellen und Monozyten hervorgehoben und auf eine Begrenzung der Zelllinie als Modell verwiesen. Monozyten reagieren z.B. wesentlich effizienter auf Lipopolysaccharide als THP-1-Zellen, da sie mehr CD14-Rezeptoren exprimieren, die zusammen mit dem *Toll-like* Rezeptor 4 und dem Protein MD-2 einen Komplex bilden. U937-Zellen exprimieren nachweisbar TLR1-9 [50]. Trotz eines niedrigeren Expressionslevels in Zelllinien wäre dennoch eine sichtbare Restriktion anzunehmen. Hofmann *et al.* [1] sind durch ihre Ergebnisse zu dem Schluss gekommen, dass ein neuartiger Restriktionsfaktor Auslöser der beschriebenen Inhibierung ist, die mit dem Verlust der viralen RNA zusammenhängt. Es ist durchaus denkbar, dass dieser Restriktionsfaktor genauso wie SAMHD1 nur in sich nicht teilenden Zellen aktiv gegen eine HIV-1 Infektion agieren kann. Diese Hypothese müsste zusammen mit den anderen Resultaten dieser Arbeit jedoch noch bestätigt werden.

Ein anderer interessanter Aspekt, der in Betrachtung gezogen werden kann, ist, warum sich die in den Experimenten verwendeten Monozyten überhaupt mit HIV-1 X<sup>+</sup> infizieren lassen. Wie in 1.2 beschrieben, erkennen TLR7 und TLR8 virale einzelsträngige RNA. In den durchgeführten Experimenten führte dies jedoch zu keiner Restriktion. Erst als die Rezeptoren der Zellen mit Agonisten aktiviert wurden, hat sich eine Inhibierung gezeigt. Dadurch wird die Frage aufgeworfen, warum die *Toll-like* Rezeptoren bei einer HIV-1 Infektion nicht in der Lage sind, das RNA-Genom zu erkennen. Lahaye *et al.* [51] und Rasaiyaah *et al.* [52] haben bereits gezeigt, dass die cDNA des HI-Virus nach der reversen Transkription durch das virale Capsid geschützt im Cytoplasma vorliegt. Das Virus ist dadurch in der Lage, eine Erkennung durch zelluläre DNA-Sensoren der Wirtszelle zu umgehen. Es lässt sich folglich mutmaßen, dass womöglich auch das RNA-Genom durch das Capsid geschützt im Cytoplasma vorliegt.

## 6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von TLR7 und TLR8 durch verschiedene TLR-Agonisten ausgelöst wird und in infizierten Monozyten eine HIV-1 Restriktion induziert. Die durch Aktivierung von TLR7/8 induzierte Restriktion der HIV-1 Infektion in Monozyten zeigte sich sowohl mit VSVg- als auch mit TFEV-pseudotypisierten Reporterviren erfolgreich. Wahrscheinlich erfolgt die Restriktion spezifisch durch die Aktivierung von *Toll-like* Rezeptor 8. In zukünftigen Experimenten könnten diese Erkenntnisse unter anderem dazu genutzt werden, den für die Restriktion verantwortlichen Restriktionsfaktor zu identifizieren und den zu Grunde liegenden Reaktionsmechanismus aufzuklären. Die RNA von behandelten Monozyten mit TLR-Agonisten kann in einem Screening auf exprimierte Gene untersucht werden. Potentielle Kandidaten eines solchen Screenings, die womöglich den unbekanntem Restriktionsfaktor codieren, könnten in einer Zelllinie zur Überexpression bzw. zum Gen-Knockout genutzt werden. Eine anschließende Infektion und Auswertung kann Aufschluss darüber geben, ob eine Restriktion induziert wird bzw. ausbleibt.

Da sich Zelllinien im Gegensatz zu primären Zellen leichter manipulieren lassen, können diese nicht nur zur Reproduktion der bisherigen Ergebnisse genutzt werden, sondern weiterführende Experimente ermöglichen. Es gilt daher weiterhin das Ziel, eine geeignete Zelllinie auszumachen.

In vergangenen Experimenten hat sich die Verwendung von TLR-Agonisten bewährt, die im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet wurden. In Zukunft könnte man ihre Wirkung nochmals vergleichend zu den hier verwendeten Agonisten testen.

## Literaturverzeichnis

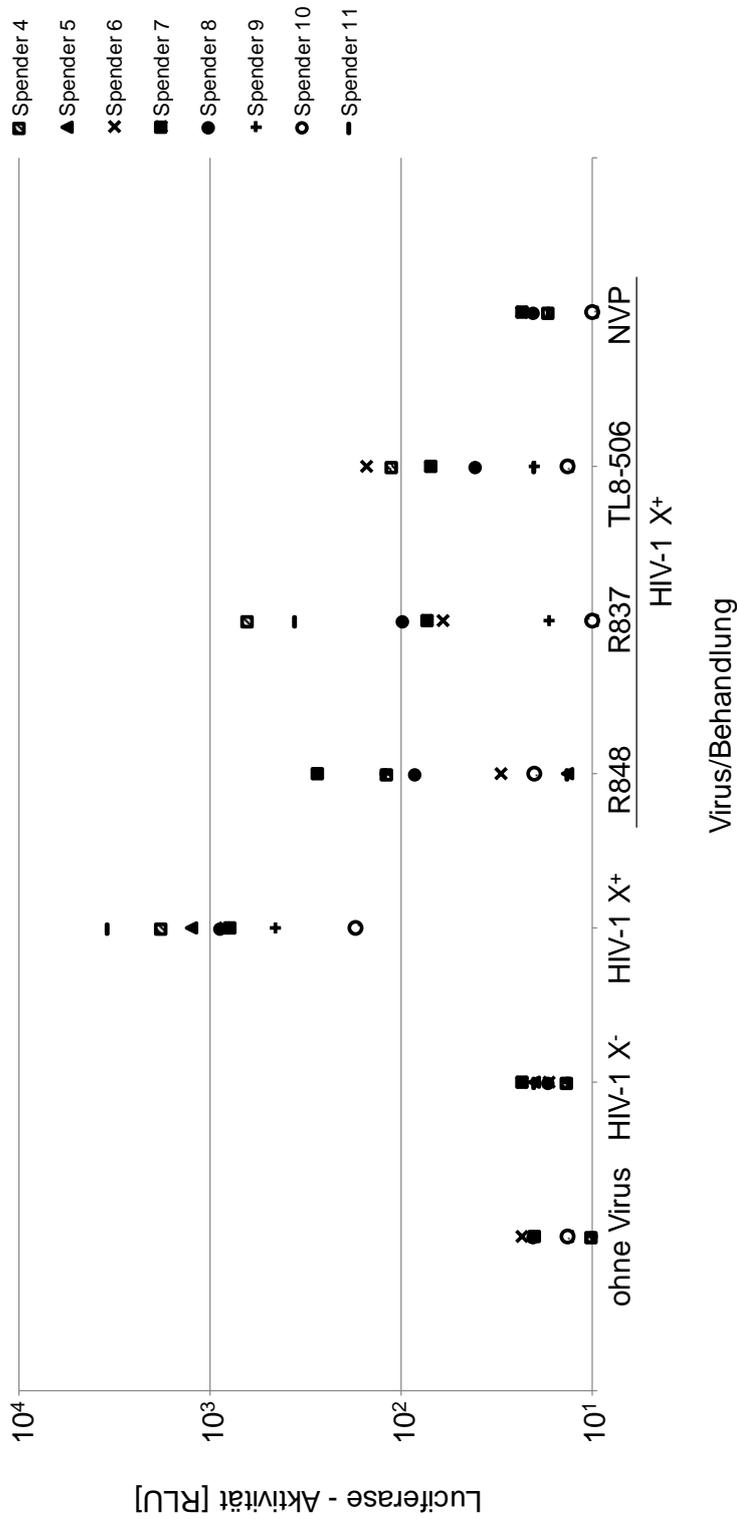
- [1] Hofmann, Henning; Vanwalscappel, Benedicte; Bloch, Nicolin; Landau, Nathaniel R. (2016): TLR7/8 agonist induces a post-entry SAMHD1-independent block to HIV-1 infection of monocytes. In: *Retrovirology* 13 (1), S. 83.
- [2] Centers for Disease Control (1981): Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. In: *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 30 (25), S. 305–308.
- [3] Gottlieb, M. S.; Schroff, R.; Schanker, H. M.; Weisman, J. D.; Fan, P. T.; Wolf, R. A.; Saxon, A. (1981): Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. In: *The New England journal of medicine* 305 (24), S. 1425–1431.
- [4] Follansbee, S. E.; Busch, D. F.; Wofsy, C. B.; Coleman, D. L.; Gullet, J.; Aurigemma, G. P. et al. (1982): An outbreak of Pneumocystis carinii pneumonia in homosexual men. In: *Annals of internal medicine* 96 (6 Pt 1), S. 705–713.
- [5] Greene, Warner C. (2007): A history of AIDS: looking back to see ahead. In: *European journal of immunology* 37 Suppl 1, S94-102.
- [6] Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J. et al. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). In: *Science (New York, N.Y.)* 220 (4599), S. 868–871.
- [7] Gallo, R. C.; Salahuddin, S. Z.; Popovic, M.; Shearer, G. M.; Kaplan, M.; Haynes, B. F. et al. (1984): Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. In: *Science (New York, N.Y.)* 224 (4648), S. 500–503.
- [8] Coffin, J.; Haase, A.; Levy, J. A.; Montagnier, L.; Oroszlan, S.; Teich, N. et al. (1986): What to call the AIDS virus? In: *Nature* 321 (6065), S. 10.
- [9] Clavel, F.; Guetard, D.; Brun-Vezinet, F.; Chamaret, S.; Rey, M. A.; Santos-Ferreira, M. O. et al. (1986): Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. In: *Science (New York, N.Y.)* 233 (4761), S. 343–346.
- [10] Hahn, B. H.; Shaw, G. M.; Cock, K. M. de; Sharp, P. M. (2000): AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. In: *Science (New York, N.Y.)* 287 (5453), S. 607–614.
- [11] Wertheim, Joel O.; Worobey, Michael (2009): Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. In: *PLoS computational biology* 5 (5), e1000377.
- [12] UNAIDS (2016): Global AIDS Update 2016.
- [13] Robert Koch-Institut (2016): Epidemiologisches Bulletin. Schätzung der Zahl der HIV-Neuinfektionen und der Gesamtzahl von Menschen mit HIV in Deutschland.
- [14] Modrow, Susanne (2010): Molekulare Virologie. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10403692>.
- [15] Freed, E. O. (1998): HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. In: *Virology* 251 (1), S. 1–15.

- [16] Nkeze, Joseph; Li, Lin; Benko, Zsigmond; Li, Ge; Zhao, Richard Y. (2015): Molecular characterization of HIV-1 genome in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. In: *Cell & bioscience* 5, S. 47.
- [17] Malim, Michael H.; Emerman, Michael (2008): HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. In: *Cell host & microbe* 3 (6), S. 388–398.
- [18] Schaller, Torsten; Bauby, Helene; Hue, Stephane; Malim, Michael H.; Goujon, Caroline (2014): New insights into an X-traordinary viral protein. In: *Frontiers in microbiology* 5, S. 126.
- [19] Ayinde, Diana; Maudet, Claire; Transy, Catherine; Margottin-Goguet, Florence (2010): Limelight on two HIV/SIV accessory proteins in macrophage infection: is Vpx overshadowing Vpr? In: *Retrovirology* 7, S. 35.
- [20] Sundquist, Wesley I.; Krausslich, Hans-Georg (2012): HIV-1 assembly, budding, and maturation. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (7), a006924.
- [21] Freed, Eric O. (2015): HIV-1 assembly, release and maturation. In: *Nature reviews. Microbiology* 13 (8), S. 484–496.
- [22] Wilen, Craig B.; Tilton, John C.; Doms, Robert W. (2012): HIV: cell binding and entry. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (8).
- [23] Barre-Sinoussi, Françoise; Ross, Anna Laura; Delfraissy, Jean-François (2013): Past, present and future: 30 years of HIV research. In: *Nature reviews. Microbiology* 11 (12), S. 877–883.
- [24] Janeway, Charles A., JR; Medzhitov, Ruslan (2002): Innate immune recognition. In: *Annual review of immunology* 20, S. 197–216.
- [25] Takeda, Kiyoshi; Akira, Shizuo (2005): Toll-like receptors in innate immunity. In: *International immunology* 17 (1), S. 1–14.
- [26] Wang, Xingyu; Chao, Wei; Saini, Manisha; Potash, Mary Jane (2011): A common path to innate immunity to HIV-1 induced by Toll-like receptor ligands in primary human macrophages. In: *PloS one* 6 (8), e24193.
- [27] Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801.
- [28] Murphy, Kenneth M.; Travers, Paul; Walport, Mark (2014): Janeway Immunologie. Unter Mitarbeit von Michael Ehrenstein, Claudia Mauri, Allan Mowat, Lothar Seidler und Ingrid Haußler-Siller. 7., Auflage, korrigierter Nachdruck 2014. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- [29] Heil, Florian; Hemmi, Hiroaki; Hochrein, Hubertus; Ampenberger, Franziska; Kirschning, Carsten; Akira, Shizuo et al. (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5663), S. 1526–1529.
- [30] Diebold, Sandra S.; Kaisho, Tsuneyasu; Hemmi, Hiroaki; Akira, Shizuo; Reis e Sousa, Caetano (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5663), S. 1529–1531.
- [31] Hemmi, Hiroaki; Kaisho, Tsuneyasu; Takeuchi, Osamu; Sato, Shintaro; Sanjo, Hideki; Hoshino, Katsuaki et al. (2002): Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. In: *Nature immunology* 3 (2), S. 196–200.
- [32] Lee, Jongdae; Chuang, Tsung-Hsien; Redecke, Vanessa; She, Liping; Pitha, Paula M.; Carson, Dennis A. et al. (2003): Molecular basis for the

- immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (11), S. 6646–6651.
- [33] Lu, Hailing; Dietsch, Gregory N.; Matthews, Maura-Ann H.; Yang, Yi; Ghanekar, Smita; Inokuma, Margaret et al. (2012): VTX-2337 is a novel TLR8 agonist that activates NK cells and augments ADCC. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (2), S. 499–509.
- [34] Lenert, Petar S. (2010): Classification, mechanisms of action, and therapeutic applications of inhibitory oligonucleotides for Toll-like receptors (TLR) 7 and 9. In: *Mediators of inflammation* 2010, S. 986596. DOI: 10.1155/2010/986596.
- [35] Lenert, P.; Stunz, L.; Yi, A. K.; Krieg, A. M.; Ashman, R. F. (2001): CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF-kappaB activation. In: *Antisense & nucleic acid drug development* 11 (4), S. 247–256.
- [36] Soliman, Mary; Srikrishna, Geetha; Balagopal, Ashwin (2017): Mechanisms of HIV-1 Control. In: *Current HIV/AIDS reports* 14 (3), S. 101–109.
- [37] Harris, Reuben S.; Dudley, Jaquelin P. (2015): APOBECs and virus restriction. In: *Virology* 479-480, S. 131–145.
- [38] Neil, Stuart J. D.; Zang, Trinity; Bieniasz, Paul D. (2008): Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. In: *Nature* 451 (7177), S. 425–430.
- [39] Lahouassa, Hichem; Daddacha, Waaqo; Hofmann, Henning; Ayinde, Diana; Logue, Eric C.; Dragin, Loic et al. (2012): SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. In: *Nature immunology* 13 (3), S. 223–228.
- [40] Laguette, Nadine; Sobhian, Bijan; Casartelli, Nicoletta; Ringeard, Mathieu; Chable-Bessia, Christine; Segeral, Emmanuel et al. (2011): SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. In: *Nature* 474 (7353), S. 654–657.
- [41] Hrecka, Kasia; Hao, Caili; Gierszewska, Magda; Swanson, Selene K.; Kesik-Brodacka, Malgorzata; Srivastava, Smita et al. (2011): Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. In: *Nature* 474 (7353), S. 658–661.
- [42] Sunseri, Nicole; O'Brien, Meagan; Bhardwaj, Nina; Landau, Nathaniel R. (2011): Human immunodeficiency virus type 1 modified to package Simian immunodeficiency virus Vpx efficiently infects macrophages and dendritic cells. In: *Journal of virology* 85 (13), S. 6263–6274.
- [43] Simon, Viviana; Bloch, Nicolin; Landau, Nathaniel R. (2015): Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. In: *Nature immunology* 16 (6), S. 546–553.
- [44] Sanders-Bear, Brigitte E.; Eschricht, Magdalena; Seifried, Janna; Hirsch, Vanessa M.; Allan, Jonathan S.; Norley, Stephen (2012): Characterization of a monoclonal anti-capsid antibody that cross-reacts with three major primate lentivirus lineages. In: *Virology* 422 (2), S. 402–412.
- [45] Corporation, Promega (2011): Luciferase Assay System Technical Bulletin TB281.
- [46] Nian, Hua; Geng, Wen-Qing; Cui, Hua-Lu; Bao, Ming-jia; Zhang, Zi-ning; Zhang, Min et al. (2012): R-848 triggers the expression of TLR7/8 and suppresses HIV replication in monocytes. In: *BMC infectious diseases* 12, S. 5.

- [47] Buitendijk, Maarten; Eszterhas, Susan K.; Howell, Alexandra L. (2014): Toll-like receptor agonists are potent inhibitors of human immunodeficiency virus-type 1 replication in peripheral blood mononuclear cells. In: *AIDS research and human retroviruses* 30 (5), S. 457–467.
- [48] Koppensteiner, Herwig; Brack-Werner, Ruth; Schindler, Michael (2012): Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection. In: *Retrovirology* 9, S. 82.
- [49] Bosshart, Herbert; Heinzelmann, Michael (2016): THP-1 cells as a model for human monocytes. In: *Annals of translational medicine* 4 (21), S. 438.
- [50] Xiong, Fang; Wang, Xing-Bing; Zhang, Jia-Hua; Liu, Wei; Sun, Si; Liu, Li-Qiong et al. (2007): Expression and role of toll-like receptors in U937 cells. In: *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* 15 (3), S. 449–453.
- [51] Lahaye, Xavier; Satoh, Takeshi; Gentili, Matteo; Cerboni, Silvia; Conrad, Cecile; Hurbain, Ilse et al. (2013): The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor cGAS in dendritic cells. In: *Immunity* 39 (6), S. 1132–1142.
- [52] Rasaiyaah, Jane; Tan, Choon Ping; Fletcher, Adam J.; Price, Amanda J.; Blondeau, Caroline; Hilditch, Laura et al. (2013): HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. In: *Nature* 503 (7476), S. 402–405.

## Anhang



**Abbildung 21: Aktivierung von TLR7/8 löst Restriktion in infizierten Monozyten aus**

Aus PBMCs isolierte Monozyten von acht gesunden Spendern wurden mit R848 (Aktivierung von TLR7/8), R837 (Aktivierung von TLR7) und TL8-506 (Aktivierung von TLR8) behandelt (finale Konzentration: 10  $\mu$ M) und anschließend mit TFenv-pseudotypisierten Reporterviren (HIV-1 X<sup>-</sup>: 3,3x10<sup>8</sup> RLU; HIV-1 X<sup>+</sup>: 4,3x10<sup>8</sup> RLU) infiziert. Die TLR-Aktivierung durch alle Agonisten führte zu einer verringerten Luciferase-Aktivität. Nevirapin (3  $\mu$ M) diente als Kontrolle einer *bona fide* Infektion.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich in den letzten Monaten unterstützt und es mir ermöglicht haben, diese Bachelorarbeit anzufertigen.

Ich möchte Prof. Bannert dafür danken, dass ich die Bachelorarbeit in seiner Arbeitsgruppe am Robert Koch-Institut anfertigen konnte. Auch dafür, dass er sich als Zweitprüfer dazu bereit erklärt hat, diese Arbeit zu betreuen und zu korrigieren. Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Lauster als Erstprüfer für die Übernahme der Betreuung seitens der Universität.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Hofmann für die Bereitstellung des Themas und für eine hervorragende Betreuung durch seine tatkräftige Unterstützung. Ebenso bedanke ich mich bei Nicole Norley und Martina Keller für ihre Hilfsbereitschaft und Mitarbeit während der gesamten Zeit. Weiterhin möchte ich dem gesamten FG18 für eine gute Zusammenarbeit und tolle Arbeitsatmosphäre danken.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester, die mir während der gesamten Studienzeit und besonders in den letzten Monaten den Rücken gestärkt und mich ermutigt haben. Einen großen Beitrag haben auch meine Freunde geleistet, die mir immer zur Seite standen und mich auch beim Erstellen der Arbeit unterstützt haben. Danke!

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass ich die von mir eingereichte Bachelorarbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

---

Ort, Datum

Unterschrift