

**Die Induktion von
CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen durch
transmembrane Hüllproteine
von Retroviren**

Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Diplom-Ingenieurin
der Fakultät Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin

vorgelegt von

Viet Loan Dao Thi
(Matrikel-Nr.: 202802)

Berlin, November 2006

Gutachter: Dr. H. von Döhren
Technische Universität Berlin

Eidesstattliche Erklärung

Name: Viet Loan Dao Thi

Matrikelnr.: 202802

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Diplomarbeit bis auf die offizielle Betreuung selbst und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und dass die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben sind.

Berlin, den 02. November 2006

Unterschrift

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad	Addieren auf ein Gesamtvolumen von
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrom</i> , erworbenes Immundefizienzsyndrom
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
aTreg	adaptive regulatorische T-Zelle
BaEV	<i>baboon endogenous retrovirus</i>
bidest.	doppelt destilliert
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHR	C-terminale Helixregion
CSK-17	Konsensuspeptid von Cianciolo
Ct	<i>threshold-cycle</i> = der Reaktionszyklus einer Real Time-PCR, bei dem das Fluoreszenzsignal die Signifikanzgrenze übersteigt
CTL	Zytotoxische T-Zellen
CTLA-4	Zytotoxisches T-Zell Antigen
d.h.	das heißt
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddH ₂ O	aqua bidest
DDT	Dithiothreitol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNS	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , Enzymgekoppelter Immuntest
env	<i>envelope protein</i> , Hüllprotein
ERV	endogenes Retrovirus
FEA	Feline Embryonale Fibroblasten
FeLV	<i>feline leukemia virus</i> , felines endogenes Leukämievirus
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FP	Fusionspeptid
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i> , Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
gag	<i>group specific antigen</i> , Gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene</i>
gp	Glykoprotein
HAART	<i>highly active anti retroviral therapy</i> , Hochaktive Antiretrovirale Therapie
HARS	<i>H. Polymorpha autonomously replicating sequence</i> , Autonom replizierende Sequenz
HEPES	2- [4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin]ethansulfonsäure
HERV-K	humanes endogenes Retrovirus-K
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> , humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase

IFN	Interferon
IL	Interleukin
IN	Integrase
IPEX	<i>immunodysregulation, polyendocrinopathy, enderopathy X-linked syndrome</i>
ISU	immunsuppressiv
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
KoRV	Koala Retrovirus
LB	Luria Bertani
LLP	<i>lentivirus lytic peptides</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg.	Lösung
LTR	<i>long-terminal repeats</i>
M	Molarität
MA	Matrixprotein
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MFa	<i>mating factor a</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mol	$6,3 \times 10^{23}$ Teilchen
Mrd	Milliarden
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MuLV	murines Leukämievirus
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
n	nano
ng	Nanogramm
NHR	N-terminale Helixregion
NIH	<i>National Institute of Health</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T cell</i> , nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NK	Natürliche Killerzelle
NP-40	Nonidet P40
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
OD	Optische Dichte
OPD	o-Phenyldiamin
ORF	open reading frame, Offener Leserahmen
p	pico
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAK	Primärantikörper
PB	Primerbindungsstelle
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , Periphere mononukleäre Blutzelle
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
PERV	porzines endogenes Retrovirus
pg	Picogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMFV	<i>permanent human fibroblast virus</i>
POD	<i>peroxidase enzyme solution</i> , Merrettichperoxidase
pol	Polymerase
PP	Polypurintrakt
PR	Protease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI1640	<i>Rosswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
sek	Sekunde(n)
SA	Spleißakzeptorstelle
SAG	Superantigen
sAK	Sekundärantikörper

SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SD	Spleißdonorstelle
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i> , Affen-Immundefizienz-Virus
SLA	Schweine Leukozyten Antigen
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i> , Tris gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TCS	<i>thrombin cleavage site</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-tetra-Methylendiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TM	Transmembranes Hüllprotein
Tr1	regulatorische T-Zellen vom Typ1
Treg	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(Hydroxymethyl-)aminoethan
TZR	T-Zell Rezeptor
U	<i>unit</i> , Einheit
ün	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen anteilig vom Gesamtvolumen
w/v	Masse anteilig am Gesamtvolumen
WHO	<i>World Health Organisation</i>
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose medium</i> , Hefe Vollmedium
YPG	<i>yeast extract peptone glycerol medium</i> , Hefe Expressions Medium
YNB	<i>yeast nitrogen base medium</i> , Hefe Stickstoffbasis Minimalmedium
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ZE	Zellen

Aminosäuresequenzen sind im EinBuchstabenCode dargestellt:

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

Die Basen der Nukleinsäuren:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymidin
U	Uracil

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Retroviren	1
1.1.1. Einteilung der Retroviren	2
1.1.2. Aufbau retroviraler Viruspartikel	2
1.1.3. Genomstruktur	3
1.1.4. Retrovirale Proteine	5
1.2. Überblick über das humane Immunsystem	9
1.2.1 Relevante Zytokine des Immunsystems	11
1.2.1.1 Interleukin 2	11
1.2.1.2 Interleukin 10	11
1.2.1.3 Transformierender Wachstumsfaktor beta	12
1.2.2 Regulatorische T-Zellen (Tregs)	13
1.2.2.1 Natürliche CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen	13
1.2.2.2 Adaptive regulatorische T-Zellen (aTreg)	15
1.2.2.3 Regulatorische T-Zellen und virale Infektionen	17
1.2.2.4 Regulatorische T-Zellen während der Tumorigenese	18
1.3 Retrovirale transmembrane Hüllproteine wirken immunsuppressiv	18
1.4 Immunsuppressive Domäne	19
1.5 Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3 Geräte	23
2.1.4 Kommerzielle Kits	23
2.1.5 Zellen	23
2.1.6 Nährmedien	24
2.1.7 Puffer	24
2.1.9 Primer und Sonden	27
2.1.10 Peptide	27
2.1.11 Vektoren	28
2.2 Methoden	28
2.2.1. Mikrobiologische Methoden	29
2.2.1.1 Arbeiten und Umgang mit Bakterien	29
2.2.1.2 Arbeiten und Umgang mit Hefen (<i>Hansenula polymorpha</i>)	30
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	32
2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)	32
2.2.2.1.1 Standard-PCR	32
2.2.2.1.2 Real-Time Quantitative PCR (RTQ-PCR)	33

2.2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.2.3	Gel-Extraktion	37
2.2.2.4	Restriktionsverdau	37
2.2.2.5	Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	38
2.2.2.6	Ligation	39
2.2.2.7	Plasmid-Präparation	39
2.2.2.8	DNS Präparation aus Hefen	40
2.2.2.9	Reinigung und Konzentrierung von DNS	40
2.2.2.10	Isolation von Riboukneinsäuren (RNS) aus eukaryotischen Zellen.....	40
2.2.2.11	Sequenzierung.....	41
2.2.2.12	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	41
2.2.2.13	Reverse Transkription	42
2.2.2.14	One-Step RT-PCR.....	42
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	43
2.2.3.1	Kopplung von Peptiden	43
2.2.3.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	44
2.2.3.3	Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
2.2.3.4	Trichloressigsäure-Fällung	45
2.2.3.5	ECL-Entwicklung.....	45
2.2.3.6	DAB-Färbung	46
2.2.3.7	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC).....	46
2.2.3.8	Regeneration der Ni-NTA-Säule.....	47
2.2.3.9	Kalte Aceton/Methanol Fällung.....	47
2.2.3.10	Analyse N-glykosylierter Proteine	47
2.2.4	Immunologische Methoden	47
2.2.4.1	Analyse am Durchflusszytometer	47
2.2.4.2	Western Blot	49
2.2.4.3	IL-10-Zytokin ELISA.....	49
2.2.4.4	Zytokin-Array.....	50
2.2.4.5	Lymphozyten Proliferationsassays	50
2.2.5	Zellkulturtechniken.....	51
2.2.5.1	Kultivierung und Passagierung	51
2.2.5.2	Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung	52
2.2.5.3	Kryokonservierung	52
2.2.5.4	Auftauen	53
2.2.5.5	Isolierung humaner PBMCs.....	53
2.2.5.6	Aussaat der humanen PBMCs.....	54
2.2.5.7	Präparation von murinen Milzzellen	54
2.2.6	Virologische Techniken.....	54
2.2.6.1	Viruszucht	54
2.2.6.2	Lyse	55
2.2.6.3	Aufreinigung von Viruspartikeln	55

3. Ergebnisse	56
3.1 Gewinnung und Charakterisierung retroviraler Proteine	56
3.1.1 Gewinnung und Charakterisierung der Retroviruspräparationen.....	56
3.1.2 Gewinnung und Charakterisierung des rekombinanten transmembranen Hüllproteins des humanen endogenen Retrovirus-K (HERV-K TM).....	57
3.1.2.1 Klonierung von HERV-K TM in den Expressionsvektor pFPMT121-MF α -His ₆ -TCS	58
3.1.2.2 Transfektion, Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung vom..	59
HERV-K TM-Protein.....	59
3.1.3 Gewinnung und Charakterisierung von Peptid-Polymeren	64
3.2 Untersuchung der Induktion regulatorischer T-Zellen <i>in vitro</i>	65
3.2.1. Untersuchung der Treg-Induktion durch die inaktivierte PERV-Präparation <i>in vitro</i> .	65
3.2.2. Untersuchung der Treg-Induktion durch das rekombinante HERV-K TM-Protein <i>in vitro</i>	68
3.2.3 Untersuchung der Treg-Induktion durch das Peptid-Heteropolymer K137 <i>in vitro</i>	73
4. Diskussion	76
4.1 Induktion von regulatorischen T-Zellen durch die inaktivierte PERV-Präparation.....	76
4.1.1 Herstellung von retroviralen Präparationen	76
4.1.2 Funktionalität der inaktivierten PERV-Präparation.....	77
4.2 Induktion von regulatorischen T-Zellen durch das rekombinante HERV-K TM-Protein	79
4.2.1 Herstellung des rekombinanten HERV-K TM-Proteins in <i>H. polymorpha</i>	79
4.2.2 Funktionalität des rekombinanten HERV-K TM-Proteins	80
4.3 Induktion von regulatorischen T-Zellen durch das Peptid-Heteropolymer K137.....	82
4.3.1 Herstellung von biologisch aktiven ISU Peptid-Polymeren mittels EDC-Kopplung	82
4.3.2. Funktionalität des gp41 ISU Peptid-Heteropolymers K137	83
4.4 Alamar Blue vs [3H]Thymidin-Vergleich der beiden Proliferationsassays.....	86
4.5 Ausblick	87
5. Zusammenfassung	88
6. Literaturverzeichnis	89

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. 1 Schematischer Aufbau eines Retrovirus	3
Abb. 1. 2 Genomorganisation der retroviralen RNS [nach Modrow & Falke, 1997].....	3
Abb. 1. 3 Integrierte Provirus-DNS [nach Modrow & Falke, 1997]	5
Abb. 1. 4 Aufbau retroviraler TM-Proteine am Beispiel von gp41 [nach Shnaper et al. 2001].....	7
Abb. 1. 5 Retroviraler Infektionszyklus [aus Cancer Medicine 6, BC Decker Inc. 2003].....	9
Abb. 1. 6 Entwicklung und Funktion von natürlichen regulatorischen T-Zellen	15
Abb. 1. 7 Entwicklung und Funktion von adaptiven regulatorischen T-Zellen.....	16
Abb. 1. 8 Aminosäuresequenzen der homologen Peptide von retroviralen TM-Proteinen	20
Abb. 2. 1 Schematische Darstellung des Expressionsvektors pFPMT121-MFa-His ₆ -TCS	28
Abb. 2. 2 Übersicht der Zytokine vom RayBio® Cytokine Array VI	50
Abb. 3. 1 Real-Time PCR Amplifikationskurven zum Nachweis der Provirus-integration.....	56
Abb. 3. 2 Darstellung der Saccharose-Gradienten Fraktionen von PERV in der SDS-PAGE (A) und im Western Blot (B).....	57
Abb. 3. 3 Kolonie-PCR-Amplifikate der pFPMT121-MFa-His ₆ -TCS/HERV-K TM Klone im Agarosegel	58
Abb. 3. 4 Aminosäuresequenz des Klon 3 (pFPMT121-MFa-His ₆ -TCS/HERV-K TM).....	58
Abb. 3. 5 Nachweis der Smash ´n Grab PCR-Amplifikate im Agarosegel.....	59
Abb. 3. 6 Nachweis des pFPMT121-MFa-His ₆ -TCS/HERV-K TM-Proteins in der SDS-PAGE (A) und im Western Blot (B).....	60
Abb. 3. 7 Darstellung der HERV-K TM-Protein-Aufreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie in der SDS-PAGE (A) und im Western Blot (B).....	61
Abb. 3. 8 Analyse des HERV-K TM-Protein N-Glykosylierungsmusters mittels PNGase F in der SDS-PAGE (A) und im Western Blot (B)	62
Abb. 3. 9 Charakterisierung des HERV-K TM-Proteins in der SDS-PAGE (A) und im Western Blot (B+C).....	63
Abb. 3. 10 Darstellung der N-Glykosylierungsstellen und der Epitopbereiche der Ziege 26 in der Sequenz des rekombinanten HERV-K TM-Proteins gp36 aus <i>E. coli</i> [Büscher et al. 2006] .63	
Abb. 3. 11 Darstellung der Kopplung in der SDS-PAGE (A) und im Western Blot (B)	64
Abb. 3. 12 Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach 24h Inkubation mit der PERV- Präparation	66
Abb. 3. 13 Prozentualer Anteil an CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Lymphozyten nach 24h Inkubation mit der PERV-Präparation	66
Abb. 3. 14 Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in humanen PBMCs nach 24h Inkubation mit der PERV-Präparation	67
Abb. 3. 15 Einfluß der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation nach 24h Stunden Inkubation mit der PERV-Präparation im Alamar Blue und [3H]Thymidin Inkorporations- Assay	67
Abb. 3. 16 Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach 24h Inkubation mit BSA und dem rekombinanten HERV-K TM-Protein	68

Abb. 3. 17 Prozentualer Anteil an CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Lymphozyten nach 24h Inkubation mit BSA und dem rekombinanten HERV-K TM-Protein	69
Abb. 3. 18 Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in humanen PBMCs nach 24h Inkubation mit BSA und dem rekombinanten HERV-K TM-Protein	69
Abb. 3. 19 Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach 24h Inkubation mit höher verdünntem BSA und rekombinanten HERV-K TM-Protein	70
Abb. 3. 20 Prozentualer Anteil an CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Lymphozyten nach 24h Inkubation mit höher verdünntem BSA und rekombinanten HERV-K TM-Protein	70
Abb. 3. 21 Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in humanen PBMCs nach 24h Inkubation mit höher verdünntem BSA und rekombinanten HERV-K TM-Protein.....	71
Abb. 3. 22 Inhibition der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation nach 24h Stunden Inkubation mit BSA und dem rekombinanten HERV-K TM-Protein im Alamar Blue und [3H] Thymidin Inkorporations-Assay.....	71
Abb. 3. 23 Modulation der Zytokinsekretion (RayBio® Cytokine Array VI) humaner PBMCs nach 24h Inkubation mit BSA und dem rekombinanten HERV-K TM-Protein	72
Abb. 3. 24 Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach 24h Inkubation mit K137	73
Abb. 3. 25 Prozentualer Anteil an CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Lymphozyten nach 24h Inkubation mit K137	74
Abb. 3. 26 Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in humanen PBMCs nach 24h Inkubation mit K137.....	74
Abb. 3. 27 Inhibition der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation nach 24h Stunden Inkubation mit K137 im Alamar Blue und [3H] Thymidin Inkorporations-Assay	75
Abb. 4. 1 Aufbau der IFN- α Sequenz und Sequenzvergleich von ISU-Peptiden mit humanen IFN- α [Denner et al. 1998].....	84
Abb. 4. 2 Theoretische 3D-Struktur von Interferon-alpha	84

1. Einleitung

Retroviren werden mit einer Reihe von Krankheiten wie malignen Tumorerkrankungen [Geissler & Theile 1983], Immundefizienzen [Virelizier 1975] sowie neurologischen Funktionsstörungen [Andrews & Gardner 1974] assoziiert. Sie betreffen eine große Anzahl verschiedenster Lebewesen, darunter auch den Menschen. Das bedeutendste und brisanteste Beispiel hierfür ist sicherlich das humane Lentivirus HIV-1 (*human immunodeficiency virus*), welches die pathogene Immunschwäche AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) auslösen kann [Kanki et al. 1987]. Laut WHO- (*World Health Organisation*) Bericht 2006 leben derzeit weltweit 38,6 Millionen HIV-infizierte Menschen und jährlich sterben ca. 3 Millionen Infizierte an AIDS. Bisher ist noch relativ ungewiss, wie HIV bei den Infizierten eine Immundefizienz hervorrufen kann, die aufgrund opportunistischer Krankheiten meist letal verläuft. Analog dazu wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression von humanen endogenen Retroviren (HERV) und der malignen Tumorentwicklung berichtet, die von einem geschwächten Immunsystem begünstigt wird [Mangeny et al. 2001]. Viele Arbeitsgruppen haben sich bereits mit dem Pathogenesemechanismus während einer HIV-Infektion und der retroviral bedingten Tumorausbildung beschäftigt, jedoch ist bis zum heutigen Tage unklar, wie genau es zur Dysfunktion des Immunsystems kommt. Seit einigen Jahren jedoch wird aufgrund aktueller Untersuchungen vermutet, dass so genannte regulatorische T-Zellen (Treg) an der HIV- und Tumorinduzierten Immunsuppression beteiligt sind [Sakaguchi et al. 2001, Hasenkrug 2003]. Indem man den Mechanismus der induzierten Dysfunktion identifiziert und versteht, kann man den Ansatz für ein Therapeutikum entwickeln, diese Dysfunktion zu unterbinden um dem Patienten einen verminderten Krankheitsverlauf zu ermöglichen.

1. 1 Retroviren

Retroviren wurden zu Beginn des letzten Jahrhunderts während der Untersuchungen zu neoplastischen Geflügelkrankheiten durch Ellermann & Bang und Peyton Rous entdeckt. Es handelt sich hierbei um eukaryotische Viren, deren Erbinformation als einzelsträngiges Ribonukleinsäure (RNS)-Molekül vorliegt, aber umgeschrieben und als Desoxyribonukleinsäure (DNS) fest in das Genom der Wirtszelle integriert wird [Coffin 1997]. Diese Eigenschaft erfordert einen Vorgang, der gegen das 1958 von Francis Crick postulierte zentrale Dogma der Molekularbiologie verstößt, nämlich dass DNS in RNS umgeschrieben werden kann aber nicht umgekehrt. 1970 entdecken Howard Temin und David Baltimore unabhängig voneinander das Enzym, welches diesen Vorgang der Retroviren ermöglicht: eine RNS-abhängige DNS-Polymerase, die Reverse Transkriptase. Bei einer retroviralen Infektion transkribiert die Reverse Transkriptase die virale RNS in einen komplementären DNS-Strang, so dass zunächst ein RNS-DNS-Hybrid entsteht. Der darauf folgende Abbau der RNS und die Replikation des verbliebenen DNS-Einzelstrangs durch das Enzym, resultiert in der Synthese eines doppelsträngigen DNS-Moleküls, welches die weitere Virus-Infektion steuert. Auf den gesamten Infektionszyklus eines Retrovirus wird in Abschnitt 1.1.5 näher eingegangen.

1.1.1. Einteilung der Retroviren

Nach morphologischen und genetischen Gesichtspunkten, der evolutionären Verwandtschaft und Besonderheiten während der Infektion und den durch sie verursachten Erkrankungsformen wird die Familie der *Retroviridae* in sieben Gattungen eingeteilt: die α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren, sowie die *Lenti*- und *Spumaviren*. Darüber hinaus unterscheidet man zwischen exogenen und endogenen Retroviren. Endogene Retroviren (ERV) sind, im Gegensatz zu den exogenen Vertretern, ein integraler Bestandteil des Genoms ihrer Wirtsspezies. Abgesehen von wenigen Ausnahmen fehlt ihnen ein exogener Lebenszyklus, so dass eine horizontale Verbreitung unterbunden wird. Allerdings ist eine vertikale Übertragung, d.h. durch Vererbung nach den Mendelschen Regeln von einer Generation auf die nächste, möglich [Coffin 1997]. Eine Vielzahl von Vertebraten weisen endogene Retroviren auf [Herniou et al. 1998], die meisten sind jedoch aufgrund des fehlenden Selektionsdruckes defekt und, durch zahlreiche Terminationssignale innerhalb der Strukturgene apathogen für ihren Wirt [Löwer et al. 1996]. Diese so genannten Retrotransposons sind weit verbreitet und machen z.B. bis zu acht Prozent des menschlichen Genoms aus [Mallet & Prudhomme 2004, Mayer & Meese 2005]. Bei dem Koala Retrovirus (KoRV), dem porcinen endogenen Retrovirus (PERV) und dem humanen endogenen Retrovirus-K (HERV-K) handelt es sich um endogene Retroviren, wohingegen das humane Immundefizienz-Virus (HIV) zur Gruppe der exogenen Vertreter gehört. Das feline Leukämievirus (FeLV) kann wiederum sowohl auf dem endogenen, als auch auf dem exogenen Weg übertragen werden.

1.1.2. Aufbau retroviraler Viruspartikel

Bei den Retroviren handelt es sich um umhüllte Viren, die zusätzlich zum üblichen viralen Capsid eine Lipidmembran besitzen, welche von einer zellulären Membran wie z.B. der Kern- oder der Zytoplasmamembran der Wirtszelle, abgeleitet ist. Für alle Viren gilt, dass die Struktur der Viruspartikel, auch Virion genannt, evolutionär bedingt die Hauptaktivität eines Virus, nämlich die Propagation widerspiegelt. Dies beinhaltet die Inkorporation des viralen Genoms in eine Hülle, die außerhalb von Wirtszellen stabil sein soll, das Erkennen und Eindringen in entsprechende Wirtszellen, die Replikation des Genoms, sowie die Translation der viralen mRNS, um neue virale Proteine zu produzieren [Coffin 1997]. Die Virionen der verschiedenen Retroviren haben einen gemeinsamen ähnlichen Aufbau mit einem Durchmesser von ca. 100 nm [Modrow & Falke 2003]. In Abbildung 1.1 ist ein schematisches Model eines Retrovirus dargestellt.

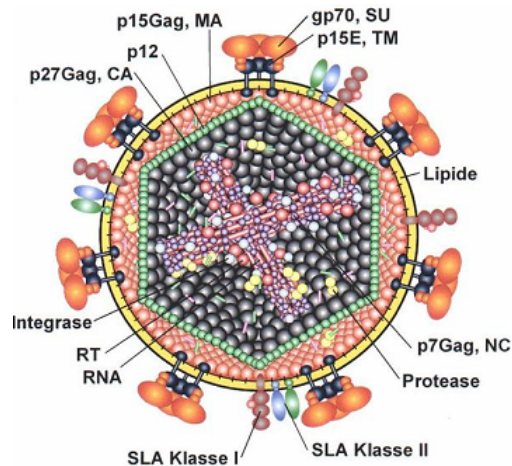


Abb. 1. 1 Schematischer Aufbau eines Retrovirus

Model des porzinen endogenen Retrovirus von Dr. S. Norley und Dr. S. Tacke
 CA=Capsidprotein, MA=Matrixprotein, NC=Nucleocapsidprotein, RT=Reverse Transkriptase, SU=*surface unit*, TM=transmembranes Hüllprotein, SLA =Schweine Leukozyten Antigen

Die äußere Lipidschicht trägt Glykoproteinkomplexe, welche jeweils aus zwei Polypeptiden, dem externen Glykoprotein (*surface glycoprotein*, SU) und dem transmembranen Hüllprotein (TM) bestehen. Da die Hülle eines Retrovirus aus der Wirtszellmembran entsteht, beinhaltet sie verschiedene wirtsspezifische Proteine, wie im Falle des porzinen endogenen Retrovirus verschiedene Klassen des Schweine Leukozyten Antigens (SLA) oder im Falle von HIV verschiedene Klassen des Humanen Leukozyten Antigens (HLA). Unter der viralen Hülle befindet sich eine Schicht aus Matrixproteinen (MA), welche durch aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit dem inneren Teil der Hüllmembran assoziiert sind. Innerhalb der Virionen, befindet sich das Capsid, welches je nach Gattung als sphärisch-ikosaedrische oder konische Form vorliegt. Es beinhaltet neben den für den viralen Replikationszyklus wichtigen Enzymen Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) außerdem zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNS, die nicht durch Basenpaarung miteinander verbunden sind.

1.1.3. Genomstruktur

Das retrovirale Genom besteht aus zwei identischen einzelsträngigen RNS-Molekülen, die jeweils 7000 bis 12000 Basen lang sein können. Es kodiert die für die virale Propagation notwendigen Proteine und beinhaltet zusätzlich folgende Merkmale (Abb. 1.2):

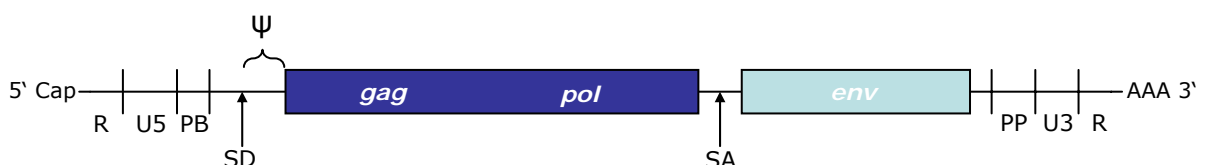


Abb. 1. 2 Genomorganisation der retroviralen RNS [nach Modrow & Falke, 1997]

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

Das retrovirale Genom ist am 5' Ende mit einer Cap-Gruppe modifiziert und am 3' Ende polyadenyliert. Die Cap-Struktur dient dem Schutz vor einem Abbau durch zelluläre Nukleasen, die Polyadenylierungssequenz ist, da sie das Erkennungssignal für die Poly(A)-Polymerase darstellt, Voraussetzung zur Nutzung der eukaryotischen Translationsmaschinerie. An beiden Enden befinden sich zudem kurze repetitive Sequenzen genomischer RNS, auch R-Region (R=*redundant*) genannt, die am 5' Ende an die Cap-Struktur und am 3' Ende an den Poly-A-Schwanz angrenzt. An die R-Region am 5' Ende schließt sich die so genannte U5-Region (U=*unique*) an, analog dazu am 3' Ende die U3-Region. Die U5-Region enthält Sequenzen, die für die Integration des Provirus in das Zellgenom wichtig sind und wird von der R-Region und der Primer-Bindungsstelle (PB) flankiert. Die PB ist komplementär zum 3' Ende einer spezifischen tRNS der Wirtszelle und stellt die Bindungsstelle für diese tRNS dar, welche als Primer für die Reverse Transkriptase fungiert, um die Synthese des antisense Strangs der viralen DNS zu initiieren. Auf die PB-Stelle folgt die *leader*-Region, die eine Spleißdonorstelle (SD) enthält. Diese ist für die Produktion aller gespleißten RNS-Moleküle und, in Kombination mit der downstream gelegenen Spleißakzeptorstelle (SA), für die Synthese von *env*-mRNS zuständig. Ferner beinhaltet die Leader-Region eine als ψ -Stelle bezeichnete kurze Sequenzfolge, mit der sich die RNS-Genome bei der Virus-Morphogenese an die Nucleocapsidabschnitte der sich bildenden Virionen anlagern. Im Anschluss an die Leader-Region folgen die Sequenzen für die Kodierung der viralen Proteine, deren Nukleotidlänge jeweils vom Virustyp abhängt. Sie tragen die Information für die Synthese der gruppenspezifischen Antigene (*gag*), der enzymatisch aktiven Proteine (*pol*), sowie der Glykoproteine (*env*) für die Virushülle. *Gag* codiert für die Strukturproteine, die das Viruspartikel aufbauen, darunter das Matrixprotein, das Capsidprotein und das Nucleocapsidprotein. *Pol* codiert die virale Protease, Reverse Transkriptase und Integrase, und *env* für das Hüllprotein, welches posttranslational in das Transmembranprotein und das externe Hüllprotein prozessiert wird. Downstream der Protein codierenden Region befindet sich der Polypurintrakt (PP), welcher während der Reversen Transkription gespalten wird um einen RNS Primer für die Synthese des *sense*-Stranges der viralen DNS zu erzeugen. Schließlich befindet sich zwischen dem PP und dem 3' Ende der viralen RNS, die bereits erwähnte U3-Region. Diese Region beinhaltet neben Promotor Sequenzen, die die virale RNS Transkription regulieren, wie die U5-Region für die Integration in das Wirtsgenom relevante Basenfolgen.

Das retrovirale Genom wird im Prozess der Infektion mittels der Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNS umgeschrieben und in das Wirtsgenom integriert. In dieser Form spricht man vom Provirus bzw. von der integrierten Provirus-DNS (Abb. 1.3). Im Provirus-Genom werden die Protein kodierenden Regionen von den *long-terminal repeats* (LTR) flankiert. Diese bestehen aus identischen Sequenzfolgen und entsprechen im retroviralen Genom den R- und U-Regionen. Demnach enthält die LTR die Promoter- und Enhancerelemente, die die retrovirale Genexpression kontrollieren.

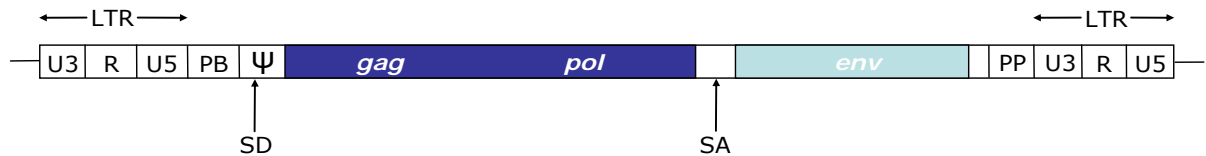


Abb. 1. 3 Integrierte Provirus-DNS [nach Modrow & Falke, 1997]

R=*redundant*, U=*unique*, PBS=Primerbindungsstelle, SD=Spleißdonor, SA=Spleißakzeptor, PP=Polypurin-trakt, LTR=*long-terminal repeats*

1.1.4. Retrovirale Proteine

Gag-Proteine

Ein Viruspartikel besteht überwiegend aus Gag-Proteinen. Zu den gruppenspezifischen Antigenen gehören die Matrix-, die Capsid- und die Nucleocapsidproteine, die zunächst als gemeinsames Vorläuferprotein synthetisiert werden, welches dann durch die virale Protease in die einzelnen Komponenten gespalten wird [Huseby et al. 2005]. Die Funktion der Gag-Proteine besteht vor allem im Aufbau des Viruspartikels, wie bereits in Abschnitt 1.1.2 und 1.1.3. beschrieben worden ist.

Pol-Proteine

Wie die Gag-Proteine werden auch die Produkte des *pol*-Gens zunächst als gemeinsames Vorläuferprotein synthetisiert und folgend mittels der viralen Protease, einer Aspartatprotease, prozessiert. Resultierend aus der proteolytischen Spaltung entstehen die virale Protease, Integrase und Reverse Transkriptase. Die Aktivitäten dieser Enzyme stehen in Wechselwirkung zueinander und hängen von der Prozessierung durch die Protease ab [Katz & Skalka 1994]. Die Integrase kann als Endonuklease und auch als Ligase wirken: zum einen bewirkt sie das Entfernen von je 2 Basen an den 3' Enden der LTR und zum anderen die Integration der linearen, doppelsträngigen DNS-Kopie des retroviralen Genoms in das Genom der Wirtszelle (provirale Formation) [Coffin 1997]. Die 1970 entdeckte Reverse Transkriptase ist eine DNS Polymerase, die sowohl RNS- als auch DNS-Moleküle als Matrize zur Replikation nutzen kann [Baltimore 1970, Temin & Mizutani 1970]. Zusätzlich besitzt sie eine integrale RNase H-Aktivität, die den RNS-Anteil vom RNS-DNS-Hybriddoppelstrang entfernt. Im Gegensatz zur normalen DNS-Polymerase besitzt sie jedoch keine 5'-3' Exonukleaseaktivität (*proofreading*) [Malboeuf et al. 2001], weshalb es bei der Reversen Transkriptase mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit von $1:10^3$ bis $1:10^4$ zum fehlerhaften Einbau einer Base kommt [Coffin 1997]. Durch diese fehlende Korrekturlese-Fähigkeit kommt es zu einer hohen genetischen Variabilität innerhalb einer Viruspopulation und damit im Falle eines Selektionsdruckes, wie z.B. der immunologischen Abwehr des Wirtes, zur Ausbildung von Fluchtmutanten („Quasispezies“). Dies ermöglicht eine schnell Anpassung des Virus an antivirale Medikamente bzw. die Ausbildung von Resistenzen, weshalb es unter anderem bisher nicht möglich war, ein Vakzin gegen HIV zu entwickeln.

Env-Proteine

Das retrovirale Hüllprotein besteht, wie bereits beschrieben, aus zwei Polypeptiden, einem externen, hydrophilen Polypeptid, dem SU-Protein, und einem membrandurchdringenden Protein, dem TM-Protein. Zusammen bilden sie oligomere Komplexe, die als so genannte *spikes* auf der Virusoberfläche präsentiert werden. Beide Polypeptide werden durch das *env*-Gen im retroviralen Genom kodiert und als Vorläuferprotein synthetisiert, während des Transports über Vesikel vom Golgi Apparat zur Plasmamembran N-glykosyliert und schließlich mittels einer Furinprotease gespalten. Die Hüllproteine sind nicht für den Zusammenbau eines umhüllten Virions nötig, spielen aber eine essentielle Rolle bei der Penetration einer Zielzelle: Die SU-Domäne bindet an einen spezifischen Rezeptor auf der Zielzelle, so dass das fusionsinduzierende Potential des TM-Proteins aktiviert und die Fusion der Virus- und der Zellmembran initiiert wird [Coffin 1997]. Das SU-Protein ist somit für die Rezeptorbindung zuständig, während das TM-Protein die Aufgabe hat das SU-Protein festzuhalten und für die Fusion der Membranen verantwortlich ist. Das TM-Protein ist mit einer aus ca. 20 hydrophoben Aminosäuren bestehenden Sequenz in der Hüllmembran des Virus verankert, während das SU-Protein über nichtkovalente Bindungen mit dem externen Teil des TM-Protein verbunden ist. Das SU-Protein der Retroviren FeLV, PERV und KoRV wird aufgrund des Molekulargewichts als gp70 bezeichnet, das TM-Protein als p15E. Bei HIV hingegen hat das SU-Protein ein Molekulargewicht von 120 kDa und das TM-Protein 41 kDa, woraus sich die Bezeichnungen gp120 bzw. gp41 für die reifen HIV-Glykoproteine und gp160 für die Vorläuferproteine ableiten [McCune et al. 1988, Freed et al. 1989]. Die strikte Spezifität der SU-Protein/Rezeptor Interaktion definiert die Wirtsspezies- bzw. Wirtsorganbreite (Tropismus) des jeweiligen Virustyps. Für HIV z.B. stellt, neben den Chemokin-Corezeptoren CCR-5 und CXCR4, das CD4 Antigen auf T-Helferzellen, Makrophagen und einigen anderen Zellen das hochaffine Rezeptormolekül dar, welches in der Zell-Zell Erkennung involviert ist [Dalglish et al. 1984, Klatzmann et al. 1984]. Hingegen ist für die Penetration von FeLV-T, ein Subtypus des felines Leukämievirus, die Präsentation eines membranen Rezeptors, bestehend aus dem Transportprotein Pit1 und dem löslichen Cofaktor FeLIX, notwendig [Cheng et al. 2006].

Im Gegensatz zu dem SU-Protein, welches im Falle des gp120 von HIV neben vier konstanten, fünf variable Regionen und aufgrund dessen einen hohen Grad an Diversität aufweist, ist das TM-Protein vieler Retroviren in der Aminosäuresequenz und in Folge dessen im Aufbau hochkonserviert [Bénil et al. 2001]. Das wohl am besten untersuchte TM-Protein, das gp41 von HIV, zeigt exemplarisch den Aufbau und die Funktion eines retroviralen TM-Proteins. Es wird in drei Bereiche eingeteilt, der N-terminalen Ektodomäne, der C-terminalen Endodomäne und einer Transmembran-Domäne, die Ekto- und Endodomäne verbindet (Abb. 1.4).

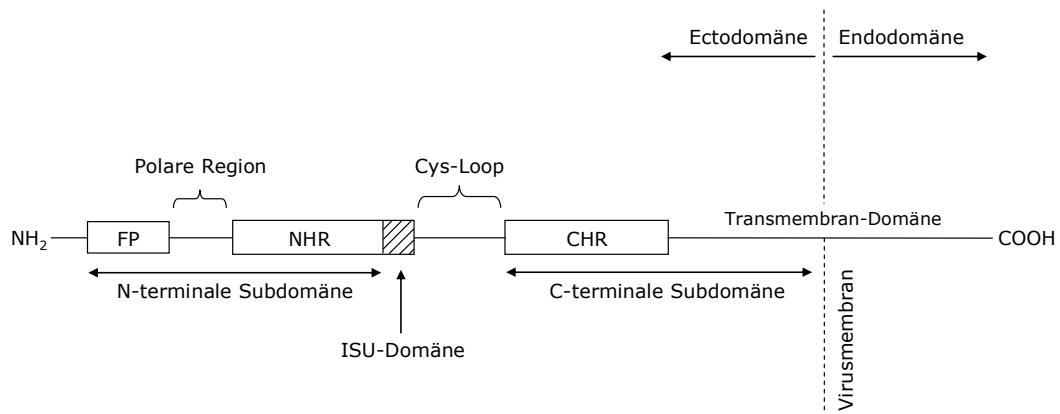


Abb. 1. 4 Aufbau retroviraler TM-Proteine am Beispiel von gp41 [nach Schnaper et al. 2001]

Schematische Struktur des TM-Proteins gp41 von HIV

FP=Fusionspeptid, NHR=Aminoterminaler Heptad Repeat Region, CHR=Carboxyterminaler Heptad Repeat Region, ISU-Domäne=Immunsuppressive Domäne

Die gp41 Endodomäne, welche aus hochkonservierten und zum Teil hydrophoben Bereichen, darunter die so genannten *lentivirus lytic peptides* (LLP) [Chen et al. 2001], besteht, ist an der Membran-Assoziation und der Multimerization der gp41 Moleküle beteiligt [Lee et al. 2000]. Die 175 AS große gp41 Ectodomäne enthält verschiedene funktionelle Regionen, die maßgeblich an der Membranfusion beteiligt sind: Im N-Terminus des gp41, befindet sich das glyzinreiche, hydrophobe Fusionspeptid (FP), welches während einer Infektion in die Wirtszellmembran eindringt, diese destabilisiert und somit die Fusion mit der Zellmembran erleichtert [Brasseur et al. 1988]. Auf das Fusionspeptid folgend wurden zwei Heptad Repeat Regionen, die aminoterminaler (NHR) und die carboxyterminale Heptad Repeat Region (CHR) identifiziert, welche durch eine Cysteinbrücke miteinander verknüpft sind. Ist das TM-Protein nicht an eine Lipidmembran assoziiert, so falten sich drei NHR-Moleküle zu einer zentral und parallel angeordneten α -helikalen *coiled-coil*-Struktur zusammen. Diese ist umhüllt von drei antiparallelen CHR α -Helices, so dass ein 6-strängiges helikales Bündel entsteht [Chan et al. 1997, Weissenhorn et al. 1997], welches durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren innerhalb der Helix stabilisiert ist. In dieser trimeren Hairpin-Anordnung spricht man im Hinblick auf die während des Fusionsprozess stattfindenden intramolekularen Konformationsänderungen des Proteins auch von der so genannten „*six-helix-bundle*“ [Debnath 2006].

Auf die hochkonservierte immunsuppressive (ISU-) Domäne, welche sich zwischen der NHR-Region und dem Cystein-Loop befindet, wird in Abschnitt 1.4 näher eingegangen.

Glykosylierung der retroviralen Env-Proteine

Die SU- und TM-Proteine einiger Retroviren wie z.B. HIV-1 werden im Laufe der Reifung vom Vorläuferprotein in die fertigen Polypeptide durch zelluläre Enzyme N-glykosyliert. Diese knüpfen Mannose-reiche Oligosaccharide an Asparagin in Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr-Motive

innerhalb der Peptidsequenzen [Kronquist et al. 1978], wobei die Anzahl und Verteilung der N-verknüpften Glykosylierungsstellen zwischen den verschiedenen Retroviren erheblich variiert. Die Aminossäuresequenz der Env-Proteine von HIV-1 z.B. besitzt etwa 30 Asn-X-Ser/Thr Oligosaccharid-Verknüpfungsstellen, von denen ca. 80% in der Sequenz des gp120 lokalisiert ist [Leonard et al. 1990]. Das TM-Protein von HIV, das gp41, hingegen besitzt nur vier der Konsensusstellen [Dash et al. 1994]. Die Bedeutung der Kohlehydrat-Seitenketten bei der Glykoprotein-Biosynthese, beim Transport und der Stabilität, ist noch nicht geklärt [Coffin 1997], sie machen jedoch wie im Falle des gp120 bis zu 50% des Molekulargewichts aus [Reitter & Desroisiers 1998]. Die Oligosaccharidketten der Glykoproteine fungieren nicht als Signal für den Transport zur Zelloberfläche, sorgen jedoch wohl für eine gewisse Hydrophilität, die für die korrekte Proteinfaltung nötig ist und welche wiederum Voraussetzung für den einwandfreien Proteintransport und deren Funktion ist. Darüber hinaus erhöhen sie die Stabilität der Glykoproteine, indem sie die für proteolytisch aktive Enzyme anfälligen Seitenketten zum Schutz maskieren. Die meisten N-Glykosylierungen sind jedoch nicht essentiell für die biologische Funktion eines Virus [Dedera et al. 1992]. Nicht alle retroviralen Hüllproteine werden im Laufe der posttranslationalen Modifikationen glykosyliert, woraus sich die Bezeichnung p15E für die TM-Proteine von KoRV, PERV und FeLV ableiten. Neben der N-Glykosylierung findet bei einigen Retroviren auch O-Glykosylierung der Env-Proteine statt [Pinter & Honnen 1988, Bernstein et al. 1994]. Allerdings ist auch bei ihnen die biologische Bedeutung bislang ungeklärt.

1.1.5 Retroviraler Infektionszyklus

Die Infektion einer Zielzelle beginnt mit der Bindung der SU-Einheit an die spezifischen Rezeptoren auf der Wirtszellmembran woraufhin die Membran mit der Virushülle verschmilzt und das Nucleocapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle abgegeben wird. Derzeitige Modelle [Gallo et al. 2003, Sackett & Shai 2003] des wohl am meist untersuchten Fusionsvorganges zwischen HIV-1 und dessen Zielzellmembran beinhalten eine Reihe von Konformationsänderungen des gp41, die die Fusion zur Folge haben. Analog dazu wurde bei vielen umhüllten Viren, wie z.B. Influenza-, Ebola- oder Coronaviren [Wilson et al. 1981, Bosch et al. 2003] ähnliche Strukturveränderungen der TM-Proteine festgestellt, weshalb man von einem konservierten Prozess sprechen kann.

Nach dem Fusionsvorgang und dem Eintritt in das Zytoplasma werden Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) aus dem Zytosol in das Capsid aufgenommen, und mit Hilfe der Reverse Transkriptase wird aus dem viralen Genom eine doppelsträngige DNS-Kopie generiert. Diese wird in den Nucleus transportiert und durch die Integrase zufällig in die chromosomale DNS eingebaut. Die provirale DNS wird dann von der RNS Polymerase II der Wirtszelle in RNS transkribiert, die die gleichen terminalen Strukturen wie das parentale Genom besitzt. Sie dient zum einen zur Synthese virusspezifischer Proteine und zum anderen der Bildung neuer, genomischer RNS. Im Zytoplasma setzt schließlich die Translationsmaschinerie der Wirtszelle die virale mRNS in Glyko- und Nucleocapsidproteine um, an welche die genomische RNS bindet. Autonom entstehen somit Virionen („*self-assembly*“), die durch so genanntes *budding* (Knospung) freigesetzt werden und zu infektiösen Viren reifen können.

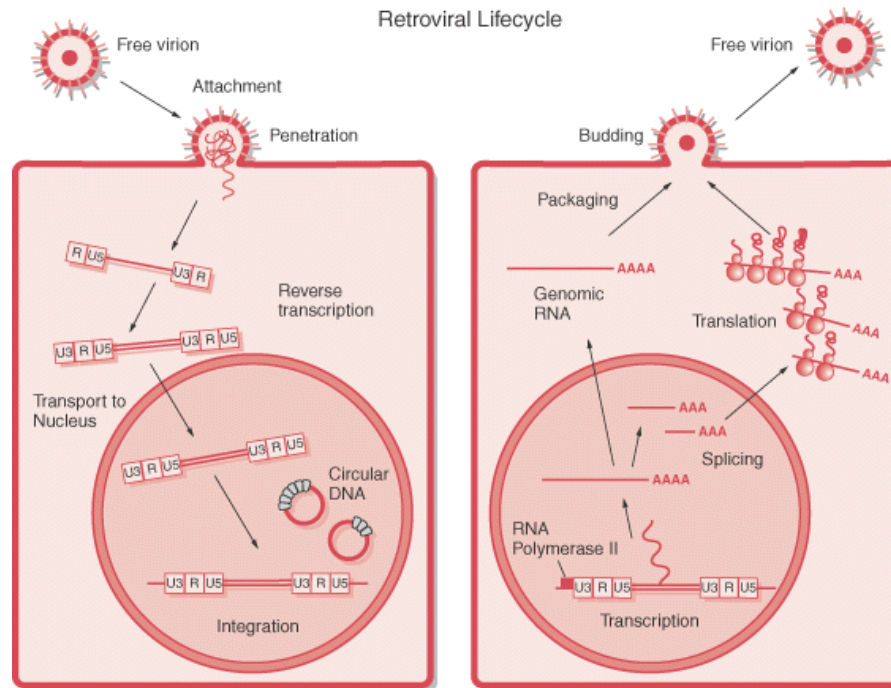


Abb. 1. 5 Retroviraler Infektionszyklus [aus Cancer Medicine 6, BC Decker Inc. 2003]

U=unique, R=redundant

1.2. Überblick über das humane Immunsystem

Die Primärfunktion des humanen Immunsystems besteht in der ständigen Überwachung und Verteidigung des Körpers. Während es normale Zellen nicht beeinträchtigen darf, muss es gezielt Krankheitserreger wie Viren und Bakterien aber auch entartete körpereigene Zellen erkennen und bekämpfen. Folglich muss das Immunsystem neben einem Mechanismus zur Eliminierung von Pathogenen auch einen subtilen Selbstzerstörungsmechanismus für selbstreaktive Zellen haben, die normales Gewebe angreifen würden. Selbsttoleranz und das Entfernen von autoreaktiven Lymphozyten sind somit essentiell für eine geregelte Immunfunktion. Dieser Abschnitt soll einen kurzen Überblick über das komplex regulierte Immunsystem geben.

Das Immunsystem wird in 2 Systeme unterteilt, zum einen in das unspezifische, nichtadaptive und zum anderen in das spezifische, adaptive System. Die nichtadaptive, auch als angeboren bezeichnete Immunantwort besteht in sofortigen bzw. innerhalb von wenigen Stunden ausgelösten unspezifischen Abwehrmechanismen. Diese beinhalten neben physikalischen und chemischen Barrieren auch zelluläre Elemente wie phagozytische Zellen (Neutrophile, Monozyten, Makrophagen), eosinophile Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), sowie lösliche Faktoren wie das Komplementsystem, Zytokine und Chemokine [Huston 1997]. Bei der Aktivierung des Komplementsystems erfolgt durch proteolytisch kaskadenartige gegenseitige Aktivierung und Zusammensetzung der Komplementfaktoren die direkte Opsonisierung und Lyse der Targetzellen und damit die Eliminierung von Antigenen und antigenträger Mikroorganismen. Auf die Funktion der Zytokine wird in Abschnitt 1.2.1 näher eingegangen.

Die spezifische, adaptive Immunantwort beinhaltet Antigen-spezifische Abwehrreaktionen, die innerhalb weniger Tage gebildet werden. Als Effektorzellen fungieren T- und B-Lymphozyten (T- und B-Zellen), deren klonale Expansion durch Antigenerkennung ausgelöst wird. B-Lymphozyten produzieren Antikörper, die durch Bindung an spezifische Antigene der Targetzellen deren Fähigkeit, die Wirtszelle zu infiltrieren, beeinträchtigen und diese zugleich für phagozytisch aktive Zellen markieren. Im Gegensatz dazu stehen die T-Lymphozyten. Diese zerstören entweder infizierte Zellen direkt oder aktivieren andere Zellen des Immunsystems. Man unterscheidet zytotoxische $CD8^+$ (*cytotoxic T-lymphocytes*, CTL) und $CD4^+$ T-Helfer-Zellen (T_H -Zellen). CTLs erkennen Moleküle, die an MHC Klasse-I-Moleküle (*major histocompatibility complex*) gebunden sind. Da diese neu synthetisierte Proteine präsentieren und auf fast allen Körperzellen exprimiert werden, können CTLs mit fast allen Körperzellen interagieren und im Falle einer Infektion durch ein Virus oder Bakterium reagieren. Sie können einerseits über die gezielte Sekretion von Perforin und Granzymen die Nekrose bzw. Apoptose der Zielzelle auslösen und andererseits über die Expression und das Binden von Fas-Liganden und anderen Molekülen der TNF-Ligandenfamilie an entsprechende Rezeptoren auf der Zielzelle ihre Apoptose auslösen [Mitsui et al. 2005]. Darüber hinaus sezernieren sie Zytokine, darunter vor allem Interferon-gamma ($IFN-\gamma$), Tumor Nekrose Faktor-alpha ($TNF-\alpha$) und Tumor Nekrose Faktor-beta ($TNF-\beta$), die den Zellen zur Resistenz gegen Bakterien- und Vireninfektionen verhelfen [Delves & Roitt 2000].

T_H -Zellen interagieren im Gegensatz zu den CTLs, hauptsächlich mit Zellen des Immunsystems. Sie erkennen Antigene, die an MHC Klasse-II-Moleküle gebunden sind und durch den Abbau von Proteinen entstehen, die durch Endozytose oder Phagozytose internalisiert worden sind. Da MHC Klasse-II-Moleküle somit ausschließlich von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden, konzentriert sich die unterstützende Wirkung der T_H -Zellen auf B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen in Blut, Lymphe und anderen Geweben [Stryer 1995]. Aufgrund der von ihnen sezernierten Zytokine sind T-Helfer-Zellen in verschiedene Subpopulationen, darunter T_H1 - und T_H2 -Zellen, unterteilt. T_H1 - Zellen aktivieren Makrophagen und veranlassen B-Zellen zur Bildung opsonierender Antikörper durch die Sekretion von $IFN-\gamma$, Interleukin- (IL -) 2 und $TNF-\beta$. T_H2 -Zellen dagegen bilden vor allem $IL-4$, $IL-5$, $IL-6$, $IL-10$, $IL-13$ und $TGF-\beta$ und regen damit B-Zellen zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern an, aktivieren eosinophile Granulozyten und hemmen teilweise die Funktion von Makrophagen [Romagnani 1999, Inagaki et al. 2006].

Neben den CTLs und den T_H -Zellen gibt es noch zwei weitere Arten von T-Lymphozyten, darunter die so genannten regulatorischen T-Zellen, auf die im Abschnitt 1.2.2 näher eingegangen wird, und die T-Gedächtniszellen, die mit den B-Gedächtniszellen im Falle einer erneuten Exposition mit einem bereits bekämpften Pathogen und dessen Antigen, eine schnelle und präzise Immunantwort ermöglichen [Huston 1997]. Es handelt sich hierbei um langlebige jedoch funktionell selber inaktive T- und B-Zellen, deren Erkennungsstrukturen und Reaktionsbereitschaft auf ein spezifisches Antigen gerichtet sind, dem das Immunsystem bereits zuvor ausgesetzt war. Bei erneutem Antigen-Kontakt lösen diese Zellen eine schnelle Immunreaktion aus und stellen somit eine Art immunologisches Gedächtnis dar.

1.2.1 Relevante Zytokine des Immunsystems

1.2.1.1 Interleukin 2

Bei Interleukin-2 (IL-2) handelt es sich um ein typisches 4- α -Helix Zytokin, welches hauptsächlich von aktivierten CD4⁺ T_H1-Zellen, aber auch von naiven CD8⁺ T-Zellen [Kish et al. 2005], dendritischen [Granucci et al. 2001] und thymischen Zellen [Cheng et al. 2002] produziert wird. Ehemals auch als T-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet, wird es *in vitro* aufgrund seiner stimulierenden Wirkung auf das Wachstum von T- und B-Zellen zur klonalen Expansion eingesetzt [Morgan et al. 1976, Lowenthal et al. 1985]. Normalerweise wird es während einer Immunantwort gegen ein körperfremdes Antigen gebildet [Smith 1988], dessen Bindung an den T-Zell Antigen Rezeptor (TZR) die Sekretion von IL-2 stimuliert und die Expression des IL-2 Rezeptors IL2R zur Folge hat.

IL-2 wirkt hauptsächlich autokrin: die IL2/IL2R Interaktion führt zu einem starken Konzentrationsanstieg der für die Regulation des Zellzyklus wichtigen Zykline und kann so die Proliferation, die Differentiation und das Überleben der antigenspezifischen T-Zellen induzieren [Abbas et al. 2003]. Es wirkt jedoch nicht ausschließlich autokrin, sondern kann auch andere Zellen des Immunsystems beeinflussen: wie bereits beschrieben induziert es nicht nur die Proliferation von T- sondern auch von B-Zellen und deren Antikörpersynthese, darüber hinaus kann es in hohen Konzentrationen auch die zytolytischen Funktionen der natürlichen Killerzellen (NK) verstärken [Wang et al. 2000, Schultz et al. 2001].

Neben seiner T-Zell Aktivierung *in vitro* hat IL-2 eine überwiegend limitierende statt verstärkende T-Zell Antwort *in vivo* [Antony et al. 2006], da es eine kritische Rolle bei der Entwicklung und peripheren Expansion von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen spielt [Malek et al. 2002, Nelson 2004], auf die im Abschnitt 1.2.2 näher eingegangen wird. So zeigten *knock-out* Mäuse, die IL-2 oder IL2R-defizient waren, keine Immunsuppression sondern stattdessen schwere Autoimmun-Erkrankungen [Schorle et al. 1991, Sadlack et al. 1993, Suzuki et al. 1995], was die Bedeutung von IL-2 als negativer Regulator autoreaktiver T-Zellen und essentieller Bestandteil im Aufrechterhalten von Selbsttoleranz unterstützt [Abbas 2003].

1.2.1.2 Interleukin 10

Wie IL-2 gehört auch Interleukin 10 (IL-10) zu der 4- α -Helix Zytokin-Familie und ist als Homodimer funktionell [Delves et al. 1998]. Es wird hauptsächlich von CD4⁺ T_H2-Zellen gebildet, aber auch einige aktivierte B-Zellen [Lund et al. 2005] und Makrophagen [Riemann et al. 2005], humane T_H1-Zellen [Del Prete et al. 1993], Monozyten [de Waal Malefyt et al. 1991] und nicht-hämatopoetische Quellen wie Keratinozyten [Enk et al. 1992] oder Melanomzellen [Enzmann et al. 1998] produzieren IL-10. Darüber hinaus gibt es eine Subpopulation an regulatorischen T-Zellen (Abschnitt 2.1.1), die IL-10 in großen Mengen sekretieren [Levings et al. 2005].

Kinetische Studien haben gezeigt, dass IL-10 im Vergleich zu anderen immunregulatorischen Zytokinen verzögert ausgeschüttet wird, das Maximum wird erst nach 24-48 Stunden (h) erreicht [de Waal Malefyt et al. 1991]. Die Expression von IL-10 wird in den unterschiedlichen Zelltypen durch unterschiedliche Mechanismen reguliert, so bilden z.B. Monozyten nach Stimulation mit Lipopolysacchariden [de Waal Malefyt et al. 1991], Prostaglandin E₂ [Bernbenou et al. 1997] und TNF- α [Wanidworanun et al. 1993] IL-10. Derzeitige Arbeiten zeigen jedoch,

dass die IL-10 Transkription durch die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 reguliert wird, welche grundlegend von vielen verschiedenen Zell-Typen exprimiert werden [Brightbill et al. 2000, Tone et al. 2000]. Kombiniert mit der variablen Stabilität der IL-10 mRNA auf post-transkriptioneller Ebene ist dies ein Hinweis darauf, dass IL-10 konstitutiv transkribiert wird und Veränderungen post-transkriptionellen mRNA Degradationsmechanismen unterliegt [Powell et al. 2000], was im Vergleich zur Transkriptionsaktivierung eine schnellere Kontrolle der IL-10 Expression möglich macht.

Die Expression von IL-10 führt zu diversen immunsuppressiven und antiinflammatorischen Effekten, die autoimmune Prozesse durch verschiedene Angriffspunkten blockieren können: es führt bei Lymphozyten zur Hemmung der T_H1 -Immunantwort und begünstigt T_H2 -Reaktionen, indem es die Proliferation, Aktivierung und Zytokinsynthese von T_H1 - und natürlichen Killerzellen unterdrückt [Mossman 1994]. So reduziert es z.B. die Expression von MHC Klasse-II-Molekülen [de Waal Malefyt et al. 1991] und kostimulatorischen B7-Molekülen [Ding et al. 1993] auf Antigen-Präsentierenden Zellen (APZ), begünstigt die Differentiation von regulatorischen T-Zellen (Tr1-Typ, Abschnitt 1.2.2) und kann die proinflammatorische Zytokin-Expression/Funktion wie die von IFN- γ [Delves et al. 1998] und TNF- α [Daftarian et al. 1996] unterdrücken. Des Weiteren hat es suppressive Effekte auf Makrophagen und Dendritische Zellen (DZ), indem es ihre Reifung und somit ihre Fähigkeit, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell Antworten zu unterstützen, inhibiert [Delves et al. 1998]. Wichtig zu erwähnen ist neben den bereits beschriebenen Effekten, dass sowohl proinflammatorische Zytokine von T_H1 -, wie auch von T_H2 -Zellen die IL-10 Freisetzung erhöhen [Daftarian et al. 1996], was die Bedeutung von IL-10 als immunsuppressives und antiinflammatorisches Zytokin unterstreicht und es in seiner Funktion eine anhaltende und überschießende Entzündung verhindern kann. Es fungiert somit *in vitro* als Gegenspieler von IL-2, welches bei Sekretion eher eine Immunaktivierung zur Folge hat.

1.2.1.3 Transformierender Wachstumsfaktor beta

Bei dem transformierenden Wachstumsfaktor beta (TGF- β) handelt es sich um ein stark pleiotropes Zytokin, welches je nach Zelltyp, Entwicklungsstadium, Differenzierung und Zellzyklus-Position der Zielzelle unterschiedliche Aktivitäten aufweist [Govinden & Bhoola 2003]. In Abhängigkeit von diesen Parametern moduliert TGF- β Proliferation, Apoptose [Lee et al. 2006], Aktivierung und Differenzierung der entsprechenden Zielzellen [Moses & Serra 1996, Obara et al. 2005] und kann so auch auf Immunantworten regulierend wirken [Gorelik & Flavell 2002]. Es gehört der TGF- β Superfamilie an und wird vornehmlich als latenter Komplex aus dem TGF- β Homodimer, den TGF- β Propeptiden und dem TGF- β Bindeprotein sekretiert [Chen et al. 2005]. Als „*downstream*“ Vermittler fungieren Mitglieder der Smad- Proteinfamilie (Ableitung aus den Namen der verwandten Proteine Sma, *small body size* und Mad, *mother against decapentaplegic*): das TGF- β Signal initiiert als ligand-gebundener heteromere Rezeptor-Komplex durch Rekrutierung und Phosphorylierung von Smad-Proteinen eine Signalkette. Die Smad-Proteine wandeln das Signal durch Oligomerisation und Transport in den Nukleus um, wo sie als Transkriptionsfaktoren die Gen-Expression beeinflussen können. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von diversen Molekülen mit dem TGF- β -Rezeptor als „*fine-tuning*“ an den regulativen Effekten durch TGF- β beteiligt ist [Runyan et al. 2006].

Aufgrund seines breiten Aktivitätsspektrums spielt TGF- β eine zentrale Rolle bei der Regeneration, Immunreaktion sowie bei der Tumorigenese. Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass es sich immunsuppressiv [Palladino et al. 1990, Fargeas et al. 1992, Letterio et al. 1998] und damit favorisierend auf eine Infektion [Kekow et al. 1990] oder Tumorstadium auswirkt [Jarnicki et al. 2006]. Während einer Sepsis z.B. kann von Milzmakrophagen sekretiertes TGF- β parakrin die IL-2 mRNA Expression von T-Zellen und damit deren Proliferation inhibieren [Ahmad et al. 1997]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es im Falle von HIV *in vitro* die Virus-Verbreitung in infizierten Monozyten und PBMCs begünstigen kann, indem es die replikationsfördernde Zytokinproduktion stimuliert [Lotz & Seth 1993].

1.2.2 Regulatorische T-Zellen (Tregs)

Immuntoleranz gegenüber körpereigenen und körperfremden, aber harmlosen Antigenen ist ein elementarer Prozess um nicht-essentielle und selbstzerstörerische Immunantworten zu verhindern. Der Prozess der T-Zell Rezeptor Generation, basierend auf zufälligen Arrangements und Promiskuitäten, birgt das Risiko, autoreaktive T-Zellen zu entwickeln. Die Toleranz-Induktion durch klonale Deletion solcher autoreaktiven T-Zellen mittels Interaktion mit dendritischen Zellen im Thymus ist ein gut untersuchter Mechanismus, der dafür zuständig ist, autoaggressive Immunreaktionen in der Peripherie zu verhindern. Da es sich jedoch bei der klonalen Deletion um einen imperfekten Prozess handelt, treten mitunter autoreaktive T-Zellen in die Peripherie ein. Um diese zu kontrollieren, gibt es eine Subpopulation an suppressiv bzw. regulatorisch aktiven Zellen, die so genannten regulatorischen T-Zellen (Tregs). Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Tregs im hohem Maße an der Selbsttoleranz, durch Unterdrückung von Allergien [Akbari et al. 2003] und Autoimmun-Krankheiten [Sakaguchi et al. 1985] wie z.B. Multiple Sklerose [Viglietta et al. 2004] oder rheumatoide Arthritis [Ehrenstein et al. 2004], beteiligt sind. Zudem können sie ungewollte Abstoßungsreaktionen, wie z.B. bei einer Transplantation [Chai et al. 2005] oder der Entwicklung eines Fötus [Michaelsson et al. 2006] verhindern. Charakterisierung der Mechanismen, die die Balance zwischen Immuntoleranz und effektiver Immunantwort kontrollieren, stellen somit heutzutage eine der bedeutendsten Untersuchungen dar, um neue Konzepte für Immuntherapien zu entwickeln: um einerseits Immunantworten bei Infektionen und Tumorentwicklung zu verstärken und um andererseits ungewollte Reaktionen bei Autoimmunitäten oder Transplantationen zu supprimieren. Dieser Abschnitt soll einen kurzen Überblick über die T-Zell Population geben, die mitunter zuständig für das Gleichgewicht zwischen effektiver Immunantwort und Immununterdrückung ist, den regulatorischen T-Zellen.

1.2.2.1 Natürliche CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen

Man unterscheidet zwei Haupttypen von regulatorischen T-Zellen, zum einen die natürlichen und zum anderen die adaptiven Tregs. Sie unterscheiden sich in ihrem Ursprung, ihren Funktionen und Wirkungsweise derart voneinander, dass man von zwei Subpopulationen sprechen kann [Bluestone & Abbas 2003]. Die natürlichen Tregs (nTregs) reifen im Thymus unter dem Einfluss von Zytokinen wie TGF- β oder IL-10 heran und machen ca. 5-10 % der CD4⁺ T-Zell Population in der Peripherie aus [Sakaguchi et al. 1995]. Die Selektion erfolgt ebenfalls im Thymus durch Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors (TZR) mit körpereigenen Antigenen an MHC Klasse-II-

Molekülen von hämopoetischen Stromazellen [Couthino et al. 2005]. Sie exprimieren eine Kombination aus verschiedenen Markern auf der Oberfläche, wie z.B. dem IL-2 Rezeptor CD25, CD62L, CD103, CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen*) oder GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene*) [Sakaguchi et al. 1995, Takahashi et al. 2000, Shimizu et al. 2002]. Da diese jedoch auch von aktivierten aber nicht suppressiv wirkenden konventionellen T-Helfer-Zellen exprimiert werden, eignen sie sich nicht, um nTregs phänotypisch zu charakterisieren. Man hat jedoch einen spezifischen Marker gefunden, der die Identifizierung von nTregs ermöglichte, den Transkriptionsfaktor FoxP3. Dieser ist sowohl an der Entwicklung als auch an der Funktion von nTregs beteiligt [Hori et al. 2003, Fontenot et al. 2003], so dass man FoxP3 der Rolle eines „*master regulator*“ bzw. „*master control gene*“ zuspricht. FoxP3 kann als Transkriptionssuppressor des IL-2 Promoters durch Konkurrieren um die Bindung mit dem nukleären Faktor aktivierter T-Zellen (NF-AT) [Schubert et al. 2001] wirken. Darüber hinaus wurde ein direktes Interagieren mit NF-AT oder dem nukleären Faktor κ B (NF- κ B) beschrieben, welches zur Repression der Zytokin-Genexpression und Effektorfunktionen von T-Helfer Zellen führt [Bettelli et al. 2005]. FoxP3 *knock-out* Mäusen (*scorfy mice* = Schorf Maus) mangelt es an nTregs und sie entwickeln ein schweres lymphoproliferatives Autoimmun-Syndrom, welches 4-5 Wochen nach der Geburt letal verläuft [Brunkow et al. 2001]. Analog dazu führt es bei Menschen, bei denen das FoxP3 Gen durch Mutationen inaktiviert ist, zum so genannten IPEX-Syndrom (*immunodysregulation, polyendocrinopathy, enderopathy X-linked syndrome*) [Wildin et al. 2001]. Da FoxP3 auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, führt es bei Männern zu aggressiven Autoimmunitäten und führt durch eine Überproduktion autoinflammatorischer Zytokine zum Tod, während es bei heterozygoten Frauen meist asymptomatisch verläuft [Tommasini et al. 2002]. Dies lässt darauf schließen, dass schon eine geringe Population nTregs ausreicht, um Selbsttoleranz zu erhalten und dass FoxP3 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Reifung von nTregs spielt.

Für die suppressive Aktivität von nTregs *in vitro* wurden zwei Möglichkeiten beschrieben, zum einen Zell-Kontaktabhängige und zum anderen Zell-Kontaktunabhängige Wirkmechanismen (Abb. 1.6). Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob die Zell-Kontaktabhängigen Mechanismen direkt oder indirekt über Antigen-Präsentierende Zellen auf T-Effektorzellen wirken. So gehen die simpelsten Modelle von einem suppressiven Effekt durch Konkurrenz um APZs und spezifischen MHC/Peptid-Antigenen Komplexen aus [Fehérvári & Sakaguchi 2004]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Rezeptor CTLA-4 auf nTregs dazu in der Lage ist, die Induktion von Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) bei Interaktion mit seinen Liganden B7.1 bzw. B7.2 (CD80/CD86) auf dendritischen Zellen einzuleiten. IDO katalysiert die Umwandlung von Tryptophan zu Kynurenin und anderen Metaboliten, welche immunsuppressive Effekte auf die nähere Umgebung von DZs haben können [Grohmann et al. 2002, Fallarino et al. 2003] und führt daneben zur Depletion an freien Tryptophan, welches für die Aktivierung von naiven CD4+ T-Zellen wichtig ist [Mellor & Munn 2004]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nTregs dazu in der Lage sind, die Expression von CD80 und CD86 auf DZs runterzeregulieren und diese somit in ineffiziente APZs umzuwandeln [Cederbom et al. 2000]. Diese Mechanismen weisen auf eine APZ-abhängige Wirkungsweise von nTregs hin, allerdings kann man eine direkte Suppression auf die Effektorzellen nicht ausschließen, da *in vitro* Studien mit „APZ-freien“ Systemen suppressive Aktivitäten von nTregs nachgewiesen haben [Shevach et al. 2001,

Piccirillo & Shevach 2001]. Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der bereits erwähnten Zell-Kontaktunabhängigen Mechanismen, die über lösliche Faktoren und damit weit reichend wirken: da nTregs den hoch-affinen IL-2 Rezeptor CD25 exprimieren, könnten sie autoreaktiven T-Zellen freies IL-2 entziehen [de la Rosa et al. 2004], welches wie in Abschnitt 1.2.1.1 beschrieben, ein essentieller Wachstumsfaktor für Lymphozyten ist. Daneben wurde in *in vivo* Studien gezeigt, dass nTregs suppressiv auf Effektorzellen über die Sekretion von IL-10 und TGF- β wirken können [Asseman et al. 1999, Fuss et al. 2002, Maloy et al. 2003]. *In vitro* jedoch, beschränkt sich ihre Wirkungsweise primär auf Zell-Kontaktabhängige Mechanismen [Shevach et al. 2001].

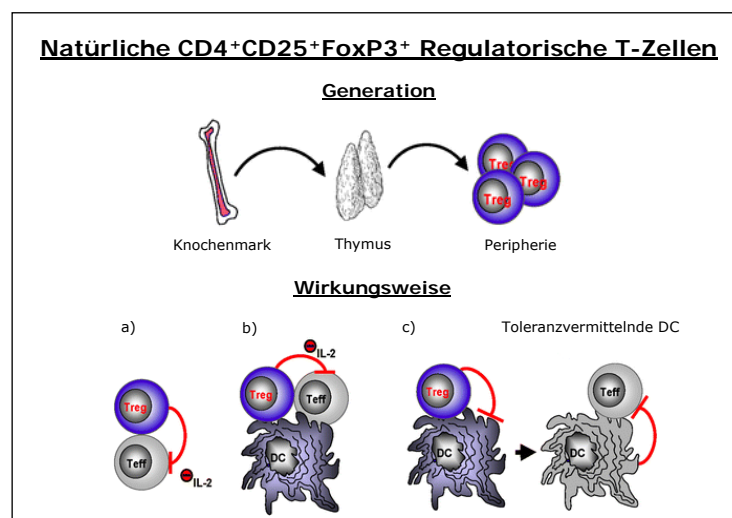


Abb. 1. 6 Entwicklung und Funktion von natürlichen regulatorischen T-Zellen

[nach Becker et al. 2006]

Treg=regulatorische T-Zelle, Teff=Effektorzelle, DZ=Dendritische Zelle

Verschiedene Möglichkeiten der Wirkungsweise von nTregs:

- a) direkt
- b) indirekt über APZ
- c) über toleranzvermittelnde DZ

1.2.2.2 Adaptive regulatorische T-Zellen (aTreg)

Ein weiterer Zell-Kontaktabhängiger Mechanismus von nTregs ist der der „infektiösen Toleranz“ [Cobbold & Waldmann 1998, Jonuleit et al. 2002, Dieckmann et al. 2002]: nTregs können in der Peripherie mittels Zell-Kontaktabhängiger Mechanismen ihre Suppressor-Aktivität an konventionelle CD4⁺ T-Zellen weitergeben, welche allerdings dann ausschließlich über lösliche Faktoren Toleranz vermitteln. Diese induzierten regulatorischen Zellen werden adaptive regulatorische T-Zellen (aTreg) genannt [Bluestone & Abbas 2003] (Abb.1.17). Deren Entwicklung wird darüber hinaus durch suboptimale Antigen-Stimulation [Weiner 2001] oder durch die Präsenz von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 oder TGF- β stimuliert [Chen et al. 2003]. Ebenso konnte eine unterstützende Wirkung auf die Entstehung von suppressiv aktiven T-Zellen durch immunsuppressive und anti-inflammatorische Agenzien gezeigt werden [Barrat et al. 2002, Adorini et al. 2004]. Aus naiven CD4⁺ T-Zellen können so *in vivo* wie auch *in vitro* T-Zellen heran reifen, welche aufgrund ihrer suppressiven Aktivität als regulatorische T-Zellen Typ 1 (Tr1) bezeichnet werden. Diese weisen ein niedriges Proliferationsvermögen auf und zeichnen

sich durch hohe Sekretion von IL-10 aus. Daneben schütten sie moderate Mengen an TGF- β , IL-5 sowie IFN- γ , aber kein IL-2 oder IL-4 aus [Groux et al. 1997]. Auf die TZR-vermittelte Aktivierung folgend, exprimieren Tr1-Zellen normale Level an T-Zell Aktivierungsmarker wie CD40L, CD69 und HLA-DR, aber ebenso wie die nTregs, erhöhte Level an CTLA-4 [Roncarolo et al. 2001]. Aufgrund der Ausschüttung von IL-10 und TGF- β sind sie im hohen Maße an der „downregulation“ von Immunantworten beteiligt: so können sie die Immunglobulin-Produktion von B-Zellen supprimieren [Kitani et al. 2000], die Differentiation von Monozyten zu DZs, sowie DZ-Reifung und deren IL-12 Produktion blockieren [Cavani et al. 2000]. Daneben konnten Groux et al. [1997] zeigen, dass die Ko-Kultivierung von CD4⁺ T-Zellen mit Tr1-Zellklonen in Anwesenheit von allogenen APZs in einer supprimierten Proliferationsresonanz resultiert. Diese suppressiven Effekte konnten durch anti-TGF- β und/oder anti-IL-10 monoklonale Antikörper (mAK) neutralisiert werden, was darauf hinweist, dass die regulatorische Aktivität hauptsächlich durch diese beiden Zytokine vermittelt wird [Roncarolo et al. 2001]. Allerdings ist noch nicht eindeutig geklärt, ob Tr1-Zellen auf APZs, T-Zellen oder beide wirken, da sie durch die Sekretion von IL-10 und TGF- β die Fähigkeit haben, beide Zelltypen zu modulieren.

Neben den Tr1-Zellen wurde noch eine weitere Subpopulation an CD4⁺ T-Zellen gefunden, die Toleranz vermitteln kann und in der Peripherie zu aTregs heranreift, die T_{H3}-Zellen. Diese zeichnen sich durch eine hohe Sekretion von TGF- β und moderate Mengen an IL-10 aus und haben sich in diversen Tiermodellen als inhibierend auf die Entwicklung von Autoimmunitäten erwiesen. Die T_{H3}-Zellen wirken wie die Tr1-Zellen nicht antigen-spezifisch sondern ausschließlich über TGF- β - und/oder IL-10-Sekretion supprimierend auf die Aktivierung von T_{H1}- sowie T_{H2}-Zellen [Weiner 1997, 2001]. Während die Tr1 Zellen jedoch vor allem durch IL-10 induziert werden [Levings et al. 2005], erfolgt die Aktivierung der T_{H3}-Zellen hauptsächlich durch TGF- β [Zheng et al. 2002].

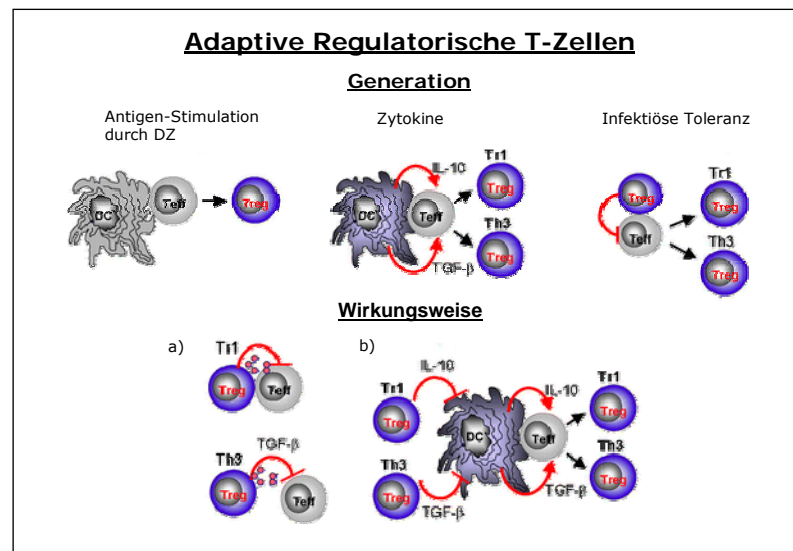


Abb. 1. 7 Entwicklung und Funktion von adaptiven regulatorischen T-Zellen

[nach Becker et al. 2006]

Treg=regulatorische T-Zelle, Teff=Effektorzelle, DZ=Dendritische Zelle, IL-10=Interleukin 10, TGF- β =transforming growth factor-beta

Verschiedene Möglichkeiten der Wirkungsweise von aTregs:

- a) direkt
- b) indirekt über APZ

Im Zuge der „infektiösen Toleranz“ konnte Stassen et al. [2004] sogar zeigen, dass unterschiedliche Subpopulationen an nTregs entweder Tr1- oder T_H3-Zellen induzieren. Ob im Gegensatz dazu in der Peripherie aus naiven CD4⁺-Zellen CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen mit äquivalent suppressivem Potential wie nTregs heranreifen können, ist bislang ein weniger gut untersuchter Prozess [Fehervari & Sakaguchi 2004]. Einigen Arbeitsgruppen ist es jedoch mittels Ko-Stimulation des TZR gelungen, diese *in vitro* aus CD4⁺CD25⁻ Populationen zu induzieren [Curotto de Lafaille et al. 2004, Battaglia et al. 2005, Mahic et al. 2006].

1.2.2.3 Regulatorische T-Zellen und virale Infektionen

Neben den positiven Auswirkungen der Tregs bezüglich Autoimmunitäten und der Aufrechterhaltung der Immunbalance können sie auch negative Aspekte mit sich bringen: so wurde in einigen Tiermodellen gezeigt, dass sie effektiv an der Suppression der Immunantworten gegenüber Tumoren sowie bakteriellen und akuten viralen Infekten beteiligt sind [Belkaid et al. 2002, Vahlenkamp et al. 2004, Valzasina et al. 2006].

Viele Viren besitzen die Fähigkeit der Immunantwort des Wirtes zu entgehen bzw. diese zu supprimieren, was darauf hindeutet, dass dies den Vorteil für den Erreger mit sich bringt, sich effizient zu verbreiten oder sogar um persistente Infektion zu etablieren. Da die Aktivierung und Funktion der T-Zellen eine zentrale Position in der antiviralen Abwehr einnimmt, stellen diese das überwiegende Ziel für viral-induzierte immunsuppressive Mechanismen dar [Schneider-Schaulies & Dittmer 2006]. Im Falle einer HIV-Infektion haben bereits verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt, dass Tregs an der induzierten Fehlfunktion durch Suppression der T-Zell Antwort beteiligt sind [Aahndal et al. 2004, Kinter et al. 2004, Weiss et al. 2004]. Eine chronische HIV-Infektion ist mit einer allgemeinen Immundysregulation assoziiert, die durch simultane Hyperimmun-Aktivierung sowie paradoxer Anergie von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen charakterisiert ist [Clerici et al. 1989, Miedema 1992]. T-Zell Dysfunktionen während einer HIV-Infektion beinhalten eine beeinträchtigte Antigen-spezifische T-Zell Proliferation [Rosenberg et al. 1999, Lichterfeld et al. 2004], veränderte Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen [Clerici & Shearer 1993], supprimierte Interferon Produktion von CD8⁺ T-Zellen [Dittmer et al. 2004] sowie eine reduzierte Produktion von CD8⁺ cytotoxischen Molekülen [Zelinskyy et al. 2005]. Es konnte gezeigt werden, dass Tregs von HIV-infizierten Individuen die Proliferation und die Zytokinproduktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen supprimieren [Kinter et al. 2004], was eine Korrelation zwischen der Induktion von Tregs und der beschriebenen defekten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Funktion während einer Infektion unterstreicht. Ebenso führte eine Treg-Depletion bei humanen PBMCs zur signifikanten Erhöhung der Antigen-spezifischen Zytokinproduktion von HIV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen [Nixon et al. 2005]. Man geht davon aus, dass Tregs durch Zell-Kontaktabhängige Mechanismen oder Zytokin-Sekretion supprimierend auf die T-Zellen wirken, jedoch ist noch ungeklärt, wie genau es zur Induktion der Tregs während einer HIV-Infektion kommt. Gezeigt werden konnte jedoch, dass immunmodulatorisch wirkende Proteine wie gp120, Pol und Gag von HIV die IL-10 und/oder TGF- β Produktion von Makrophagen und Monozyten stimulieren [Taoufik et al. 1997, Garba et al. 2002]. Ein weiterer möglicher Mechanismus wurde von Schneider-Schaulies & Dittmer [2006] beschrieben: durch die Infektion von DZs könnten Viren deren Reifung und Zytokinproduktion stören und somit die Balance zwischen CTLs und Tregs negativ beeinflussen. Experimentell [Steinman et al. 2003,

Probst et al. 2003] konnte nämlich gezeigt werden, dass unreife DZs eher Tregs als T_H -Zellen stimulieren, was in einer schweren Suppression der CTL-Antwort und damit der Entwicklung von chronischen Infektionen resultieren kann. Die Manipulation der Treg-Induktion in den frühen Stadien einer HIV-Infektion könnte somit helfen, die normale antivirale Antwort wiederherzustellen und das Voranschreiten der Infektion zu verhindern.

1.2.2.4 Regulatorische T-Zellen während der Tumorigenese

Analog zur Immunsuppression während einer Infektion, kann auch das Tumorwachstum von einer beeinträchtigten Immunantwort begünstigt werden. Es hat sich gezeigt, dass die Aktivität und Anzahl der tumor-reaktiven T-Zellen in Krebs-Patienten zu gering ist, um die Krankheit effektiv zu bekämpfen [Yamaguchi & Sakaguchi 2006]. Die molekulare Basis für die Akquisition des immunresistenten Phänotyps der entarteten Zellen ist noch nicht völlig geklärt, jedoch wurden einige Mechanismen, wie das Herunterregulieren von MHC Klasse-I-Antigenen [Garcia-Lora et al. 2003] sowie das Hochregulieren von Apoptose-Inhibitoren beschrieben [Smyth et al. 2003]. Mit der Entdeckung der regulatorischen T-Zellen, wurden diese als weitere mögliche Ursache für die geschwächte Immunantwort in Betracht gezogen und tatsächlich konnte ein signifikanter Anstieg von Tregs in Krebs-Patienten von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden: so wurde 2001 von Woo et al. beschrieben, dass Tumor-assoziierte T-Zellen von Patienten mit Epithel-Tumoren einen erhöhten Anteil an TGF- β sekretierenden $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aufwiesen. Ebenso konnte ein Anstieg von funktionellen Tregs im peripheren Blut und in Tumornähe von Brustkrebs- sowie Pankreaskrebspatienten [Liyanage et al. 2003], in Patienten mit hepatozellulärem Karzinom [Ormandy et al. 2005] und Magen- und Speiseröhrentumoren [Ichihara et al. 2003] demonstriert werden. Analog zur Induktion von Tregs während einer viralen Infektion, wird das Tumorwachstum durch beeinträchtigte $CD8^+$ T-Zell Antworten favorisiert, die wiederum durch inhibierende Effekte der Tregs auf die $CD4^+$ T-Zellen und einem IL-10-reichen Milieu zustande kommen [Dercamp et al. 2005]. Die Tregs schwächen somit das Immunsystem und erklären so zum Teil die schwache Immunantwort gegen Tumor-Antigene. Jedoch ist die Frage, ob es zum Anstieg der Tregs über Proliferation oder über Umverteilung aus anderen Arealen wie z.B. das Knochenmark kommt, noch nicht geklärt [Beyer & Schultze 2006]. Ein Ansatz hierzu wird derzeit von Wolf et al. [2006] untersucht, welcher aufgrund von Telomerase Aktivität in den Tregs auf eine aktive Proliferation hindeutet. Sicher ist allerdings, dass es zur Induktion der Tregs kommt, und dass deren Depletion eine erhöhte Antitumor-Immunität zur Folge hat [North & Awwad 1990, Shimizu et al. 1999], was im Hinblick auf eine Antitumor-Therapie von großen Nutzen sein könnte.

1.3 Retrovirale transmembrane Hüllproteine wirken immunsuppressiv

Retrovirale Infektionen sind, ebenso wie einige andere virale Infektionen, von einer Suppression der zellulären sowie humoralen Immunantwort begleitet. So wurde in mehreren Untersuchungen gezeigt, dass Retroviren trotz Inaktivierung immunsuppressiv wirken können: durch Inkubation mit inaktiviertem FeLV [Hebebrand et al. 1977], PERV [Tacke et al. 2000] und inaktiviertem BaEV (*baboon endogenous retrovirus*) und PMFV (*permanent human fibroblast virus*) [Denner et al. 1980, 1985] wurde die Proliferation von humanen Lymphozyten *in vitro* inhibiert. Der genaue Mechanismus der Immunsuppression durch Retroviren während einer Infektion ist ein bislang

ungeklärter Prozess, jedoch wurde postuliert, dass er auf einem gemeinsamen, konservierten Merkmal basiert [Denner et al. 2000]. Im Vergleich zu den *pol* Genen, bei denen das Gen welches die Reverse Transkriptase kodiert, am stärksten konserviert ist, hat man lange Zeit aufgrund der Diversität der Rezeptor Moleküle angenommen, dass die *env* Gene, die die interagierenden Proteine kodieren, nicht konserviert sind [Bénil et al. 2001]. Die TM-Untereinheit hat sich jedoch, wie in Abschnitt 1.1.4 bereits beschrieben, in Relation zum konservierten Fusionsprozess (Abschnitt 1.1.5) als hoch konserviert erwiesen. Tatsächlich haben mehrere Arbeitsgruppen [Denner et al. 1986, Oostendorp et al. 1993, Haraguchi et al. 1995] das immunsuppressive Potential von retroviralen TM-Proteinen *in vitro* untersucht und herausgefunden, dass diese höchstwahrscheinlich an der induzierten Immundysfunktion beteiligt sind. So berichteten bereits 1979 Hebebrand et al. von einer Inhibition der Mitogen- und Antigenantwort von humanen Lymphozyten durch Ko-Kultivierung mit p15E von FeLV. Ferner hat Cianciolo et al. 1980 gezeigt, dass das p15E von MuLV (*murine leukemia virus*) die Akkumulation von Makrophagen in inflammatorischen Loci verhindern kann. Ebenso konnte auch eine Korrelation zwischen Tumorstadium, Immunsuppression und der Expression von endogenen retroviralen TM-Proteinen festgestellt werden: die Arbeitsgruppe um Mangeney und Heidmann z.B. beschreibt 1998 und 2001 die Expression der *env*-Proteine von endogenen Retroviren in humanen und murinen Tumoren und der damit verbundenen Immunsuppression die die Abstoßung durch das Immunsystem verhindert. In diesem Zusammenhang wurde auch untersucht, ob Tregs bei der retroviral induzierten Immunsuppression eine Rolle spielen. Und tatsächlich zeigten Mangeney & Heidmann 2005, dass die Expression von endogenen Retroviren und deren *env*-Proteinen in Tumoren durch Induktion von Tregs eine geschwächte Antitumor Antwort zur Folge hat.

1.4 Immunsuppressive Domäne

Sequenz- und Strukturanalysen der transmembranen Hüllproteine von δ - und γ -Retroviren zeigten, dass es einen 17 Aminosäuren langen Bereich zwischen dem Cysteinloop und dem NHR-Bereich gibt, der besonders hoch konserviert ist. 1985 wurde von Cianciolo aus dieser Sequenz ein Konsensuspeptid (CSK-17) abgeleitet und synthetisch hergestellt (Abb.1.8). Aufgrund der inhibierenden Effekte des CSK-17 Peptids auf die Proliferation und Differentiation von Lymphozyten und der Homologie zum Bereich im retroviralen TM-Protein, wurde dieser Bereich daraufhin als Immunsuppressive (ISU-) Domäne bezeichnet [Ruegg et al. 1989, Denner et al. 1994].

CKS-17	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
PERV-A	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
KoRV	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
MuLV	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
FLV	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
GLV	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
FeLV-A	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
HERV-K	L	A	N	Q	I	N	D	L	R	Q	T	V	I	W	M	G	D
HTLV-1	A	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	W	E	Q	G	G	L
HIV-1 (env583-599)	L	Q	A	R	I	L	A	V	E	R	Y	L	K	D	Q	Q	L

Abb. 1. 8 Aminosäuresequenzen der homologen Peptide von retroviralen TM-Proteinen

[nach Cianciolo 1985]

CKS-17=synthetisches TM-Heptadekapeptid, PERV=porzines endogenes Retrovirus, KoRV=Koala Retrovirus, MuLV=murines Leukämievirus, FLV=Friend Leukämievirus, FeLV=felines Leukämievirus, HERV-K=humanes endogenes Retrovirus-K, HTLV-1=humanes T-Zell Leukämievirus Typ 1, HIV=humanes Immundefizienzvirus; von der CKS-17 Sequenz abweichende Aminosäuren sind in rot dargestellt.

Von mehreren Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass das CKS-17 Peptid neben den inhibierenden Auswirkungen auf die Lymphozyten auch weitere immunsuppressive Effekte *in vitro* hat und quasi als immunmodulatorische Domäne fungiert [Haraguchi et al. 1995]. Dass es inhibierend auf die Mitogen- und Alloantigen abhängige Proliferation von humanen Lymphozyten wirkt, wurde bereits 1985 von Cianciolo selber gezeigt. Daneben wirkt es suppressiv auf den „respiratory burst“ von humanen Monozyten [Harrel et al. 1986], auf die Immunglobulin Sekretion [Mitani et al. 1987], IL-1 Aktivität [Kleiner mann et al. 1987] und IFN- γ Produktion [Ogasawara et al. 1988] sowie auf die durch NK-Zellen vermittelte Zytotoxizität [Harris et al. 1987]. Gleichermäßen konnten immunsuppressive induzierende Effekte auf das intrazelluläre cAMP- (*cyclic adenosine monophosphate*) Level, die Aktivierung von MAP- (*mitogen-activated protein*) Kinasen, die Phosphorylierung der Phospholipasen PLC-gamma1, Raf-1, MEK, ERK1/2 [Fan et al. 2005] und auf eine Imbalance der T_H1/T_H2-Zytokinantwort [Haraguchi et al. 1995] gezeigt werden. Analog dazu konnte für ein synthetisches Peptid der ISU-Domäne von HIV-1, welches moderate Homologien zum CKS-17 Peptid aufweist, ebenso immunsuppressive Effekte gezeigt werden. Als immunsuppressiv aktive ISU-Domäne von HIV-1 gp41 wurde der Bereich AS 581-597 1994 von Monell & Strand identifiziert, welcher in direkter Nachbarschaft zur immunodominanten Region AS 598-607 liegt. Das HIV-ISU Peptid hemmt *in vitro* die Mitogen- und Lymphokinabhängige Proliferation von humanen und murinen Lymphozyten [Ruegg et al. 1989, Denner et al. 1996] und hat modulatorische Effekte auf die T_H1/T_H2-Zytokinantwort [Denner et al. 1998], was darauf schliessen läßt, dass es einen direkten immunsuppressiven Effekt *in vivo* hat und zu der Immundefunktion in AIDS-Patienten beitragen kann.

1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob durch die transmembranen Hüllproteine von Retroviren und durch die von ihnen abgeleiteten Peptide eine Induktion von regulatorischen T-Zellen erfolgt. Eine Erhöhung der Treg-Population während der Pathogenese von AIDS und Tumorerkrankungen konnte bereits nachgewiesen werden, so dass für den Fall des Nachweises, dass die retroviralen TM-Proteine für eine Treg-Induktion verantwortlich sind, diese als mögliche Targets für künftige Therapeutika in Betracht gezogen werden könnten, um retroviral bedingte Immundysfunktionen zu vermindern. Für die Untersuchung der Treg-Induktion durch Retroviren sollen inaktivierte Präparationen der Gammaretroviren PERV, KoRV und FeLV mittels infizierter Zelllinien und Separation über einen Saccharose-Gradienten hergestellt werden. Diese Viren wurden gewählt, da FeLV und KoRV in Folge einer Infektion zu gravierenden Immunschwächen führen und PERV eine potentielle Gefahr bei der Xenotransplantation darstellt. Um die eventuell induzierte Treg-Population auf die transmembranen Hüllproteine von Retroviren einzugrenzen, soll ein retrovirales TM-Protein rekombinant hergestellt werden. Die TM-Proteine von PERV, KoRV und FeLV stehen zwar rekombinant zur Verfügung, jedoch sind diese, aufgrund der Produktion in *E. coli*, durch LPS kontaminiert. In dieser Arbeit soll nun das TM-Protein von HERV-K mittels eines endotoxinfreien eukaryotischem Expressionssystem rekombinant hergestellt werden. Dazu wird als produzierender Organismus *H. polymorpha* verwendet und mit einem entsprechenden Vektor, der die Ektodomäne des rekombinanten HERV-K TMs enthält, transfiziert. Das TM-Protein von HERV-K soll produziert werden, da es sich bei diesem um das am besten erhaltene endogene Retrovirus beim Menschen handelt und es daher ein potentiell replikationskompetentes Retrovirus darstellt, dessen Expression zur Entstehung von Tumorkrankheiten beitragen könnte. Tatsächlich wurde eine Expression in malignen Tumoren nachgewiesen, so dass eine Relation zwischen dem TM-Protein von HERV-K, der Induktion von Tregs und der Tumorentwicklung untersucht werden kann. Schließlich soll überprüft werden, ob die immunsuppressiv aktive, hochkonservierte ISU-Domäne in der retroviralen TM-Sequenz in der Lage ist, regulatorische T-Zellen zu induzieren. Um einen Beitrag zum Verständnis der Immunpathogenese während einer HIV-Infektion zu leisten, sollen möglichst konformationsnative gp41 ISU-Peptide hergestellt werden. Da gezeigt worden war, dass ISU-Monomere mit einem Molekulargewicht von unter 4 kDa biologisch nicht aktiv sind, werden die gp41 ISU-Polymere unter Verwendung eines reaktiven Carbodiimid zu aktiven Polymeren gekoppelt. Die finale Charakterisierung der retroviralen Proben erfolgt mittels Analyse im Western Blot und SDS-PAGE. Die Induktion von Tregs in humanen PBMCs durch Inkubation mit den retroviralen Peptiden soll *in vitro* durch Untersuchung der Zytokinmodulation, Effekte auf die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation und Veränderungen in der Expression und dem Transkriptionslevel von FoxP3 untersucht werden. Die Untersuchung der Zytokinmodulation erfolgt über Zytokinarrays und einem IL-10 spezifischen *capture* ELISA. Um eine Hemmung der Lymphozytenproliferation durch die retroviralen Proben zu untersuchen, sollen zwei verschiedene Assays miteinander verglichen werden, den relativ neuen Alamar Blue Assay mit dem konventionellen [³H]Thymidin Inkorporations-Assay. Schließlich soll die Lymphozytenpopulation im FACS (*fluorescence activated cell sorting*) anhand der Treg spezifischen Marker CD4, CD25 und FoxP3 charakterisiert und darüber hinaus eine Änderung im FoxP3 Transkriptionslevel anhand einer quantitativen TaqMan-Sonden Real-Time PCR untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-
Carbodiimid Hydrochlorid

10x PCR Puffer

2- [4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin]
ethansulfonsäure

Alamar Blue™

Bacto™ Peptone

BCA™ Protein Assay Reagent A+B

BigDye® -Mastermix

Bradford Lösung

Bovine Serum Albumin

Concanavalin A

Coomassie® Brilliant Blue

tetrahydrochloride dihydrate

Dimetyl sulfoxide

Dulbecco's Modified Eagle Medium

dNTP Mix (10mM)

ECL™ Western Blotting Detection

Ethidiumbromid

Fötales Kälberserum

Gel Code® Blue Stain Reagent

Gel Dry™ Drying Solution

Kanamycinsulfat

L-Glutamin

N, N, N', N'-tetra-Methylen-diamin

NEB-Puffer

O'Gene Ruler™, DNA Ladder Mix

PageRuler™, Prestained Protein Ladder

PCR-Puffer (10-fach mit MgCl₂)

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)

Pro Bond™ Resin

Roswell Park Memorial Institute Medium

T4-Ligase

T4-Puffer

Taq Polymerase Ampli-Taq® Gold

Tween 20

Magermilchpulver

Trypanblau 0,4%

PIERCE, Illinois, USA

Roche, Mannheim, Deutschland

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Biosource International Inc., Camarillo, USA

BD Bioscience, San Jose, USA

PIERCE, Illinois, USA

Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Bio-Rad, München, Deutschland

Serva, Heidelberg, Deutschland

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Serva, Heidelberg, Deutschland

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England

Sigma-Aldrich, München, Deutschland

PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

PIERCE, Illinois, USA

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Amersham Biosciences, Buckinghamshire,
England

NEB, Frankfurt a.M., Deutschland

Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Applied Biosystems, New Jersey, USA

Sigma, Steinheim, Deutschland

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Applied Biosystems, New Jersey, USA

Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Fa. Sucofin, Zeven, Deutschland

Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

CL-XPosure™ Film

Filtereinheit Rotrand FP20/0,2 CA-S

Immobilon™ Transfer Membranes

Nuncleon Surface Flachboden

Zellkulturflaschen T25, T75, T175

Weithalsflasche Serie 303 PP

PIERCE, Illinois, USA

Schleicher & Schueller, Dassel, Deutschland

Millepore, Schwalbach, Deutschland

Nunc, Wiesbaden, Deutschland

TPP, Midwest Scientific St. Louis, MO, USA

Kautex Textron, Bonn, Deutschland

2.1.3 Geräte

BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Branson Sonifier II 250	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Branson Modell 102 C	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
CO ₂ Incubator MCO-20AIC	Sanyo, München, Deutschland
ELISA Reader Spectra Classic	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Entwicklungsmaschine Curix 60	Agfa, Köln, Deutschland
EP-Gradient-S PCR	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
FACScalibur	BD-Biosciences, San Jose, USA
Filter Mate Harvester	PerkinElmer <i>precisely</i> , Wellesley, USA
Gel Doc 2000	Bio-Rad, München, Deutschland
Gene Pulser II	Bio-Rad, München, Deutschland
Inversmikroskop ID 03	Zeiss, Jena, Deutschland
Konzentrator <i>Concentrator</i> 530	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Kühlzentrifuge Centrifuge 5403	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Micro Beta Trilux <i>Luminescence Counter</i>	PerkinElmer <i>precisely</i> , Wellesley, USA
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Realtime-PCR-Cycler MX4000	Stratagene, La Jolla, USA
Refraktometer	A.Krüß Optronic, Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator Innova 4330	New Brunswick Scientific, Nürtingen Deutschland
Sterilbank Steril Gard Class2	The Baker Company, Sanford, Maine USA
ThermoStat <i>plus</i>	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Tischzentrifuge <i>Centrifuge</i> 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Ultrazentrifuge <i>Ultracentrifuge</i> L8-70	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20xP	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro, Langensebold, Deutschland

2.1.4 Kommerzielle Kits

Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix	Stratagene, La Jolla, USA
E.Z.N.A® Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Invisorb® Plasmid Maxi Kit	Invitex , Berlin, Deutschland
JetQuick-Gel Extraction-Kit	GENOMED GmbH, Bad Oeyenhausen, Deutschland
JetQuick-PCR Purification-Kit	GENOMED GmbH, Bad Oeyenhausen, Deutschland
OptEIA™ Human IL-10 Set	BD Biosciences, San Jose, USA
RayBio® Human Cytokine Antibody Array	RayBiotech, Inc., Norcross, USA
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
RNeasy-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript™ One-Step RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 ZellenBakterien

E. coli BL21-CodonPlus(DE3)-RP
E. coli OneShot® TOP10

Stratagene, La Jolla, USA
 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Hefen

H. polymorpha

Humane Zelllinien

293
 Feline Embryonale Fibroblasten

ATCC, USA, ECACC Nr.: 85100602
 M. Reinacher, Giessen, Deutschland
 O. Jarret, Glasgow, UK

2.1.6 Nährmedien

Medium	Zusammensetzung	Zellen
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl	Bakterien
LBA-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 100 µg/ml Ampicillin	Bakterien
YPD	1 % Hefeextrakt, 2 % Bakto Peptone, 2 % Glucose, 15 µg/ml Kanamycin, 10 µg/ml Inositol	Hefen
YPM	1 % Hefeextrakt, 2 % Bakto Peptone, 2 % Methanol 15 µg/ml Kanamycin, 10 µg/ml Inositol	Hefen
YNB	0,67 % Hefe Stickstoffbase, 2 % Glucose 15 µg/ml Kanamycin, 10 µg/ml Inositol	Hefen
RPMI1640	supplementiert mit 10% FKS, 2 % Glutamin, 1 % HEPES, 1 % Penicillin/Streptomycin	Murine/ Humane PBMCs
DMEM	supplementiert mit 10 % FKS, 2 % Glutamin, 1,5 % HEPES 1 % Penicillin/Streptomycin	293
DMEM	supplementiert mit 10 % FKS, 2 % Glutamin, 1 % HEPES 1 % Penicillin/Streptomycin	FEA
Einfriermedium	FKS, 10 % DMSO LB-Medium, 60 % Glycerol YPD, 60 % Glycerol	tier. Zellen Bakterien Hefen

2.1.7 Puffer

Name	Zusammensetzung	Abschnitt
<u>Agarosegelelektrophorese</u>		2.2.2.2
50x TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Acetat	
10x Gel Ladepuffer	50 mM EDTA 50 % (w/v) Glycerol 10 mM Tris-HCL pH 8,0 1 mM EDTA 0,3 % (w/v) Bromphenolblau 0,3 % (w/v) Xylencyanol FF	
<u>SDS-PAGE</u>		2.2.3.3
Gelpuffer	3 M Tris-HCL pH 8,4 0,3 % SDS	
Anodenpuffer	0,2 M Tris pH8,9	
Kathodenpuffer	100 mM Tris-Base (pH 8,25) 100 mM Tricin 0,1 % (w/v) SDS	
Probenpuffer	50 mM Tris-HCL pH 6,8 12 % (v/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,02 % (w/v) <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	

Name	Zusammensetzung	Abschnitt
Färbelösung	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250	
Entfärbelösung	20 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure	
PBS „ohne“ pH 7,2	137 mM NaCl 8,8 mM Na ₂ PO ₄ 2,7 mM KC 0,7 mM KH ₂ PO ₄	
<u>Western Blot</u>		2.2.4.3
Transferpuffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 20 % Methanol 3,75 g/l SDS	
Waschpuffer	PBS mit 0,1 % Tween 20	
Blockierungspuffer	5 % Milchpulver 0,1 % Tween 20 in PBS	
Substratlösung (DAB)	25 mM Tris HCl 0,5 mg/ml Diaminobenzidin	
<u>Herstellen kompetenter Bakterien</u>		2.2.1.1.4
TBFI (pH 5,8)	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerol	
TBF II (pH 6,8)	10 mM RbCl 10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerol	
<u>Herstellen kompetenter Hefen</u>		2.2.2.1.2.4
Kaliumphosphat-Puffer	50 mM KH ₂ PO ₄	
STM-Puffer (pH 7,5)	270 mM Sucrose 10 mM Tris-HCl 1 mM MgCl	
<u>DNS Präparation aus Hefen</u>		
Lyse Puffer	2 % Triton X-100 1 % SDS 100 mM NaCl 19 mM Tris 1 mM EDTA pH 6,8	
<u>Ni-NTA Affinitätschromatographie</u>		2.2.3.7
Bindepuffer B	100 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 8,0) 10 mM Tris-Cl 8 mM Harnstoff	
Waschpuffer C	100 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 6,3) 10 mM Tris-Cl 8 mM Harnstoff	

Name	Zusammensetzung	Abschnitt
Elutionspuffer D	100 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4,5) 10 mM Tris-Cl 8 mM Harnstoff	
<u>Kalte Aceton/Methanol-Fällung</u>		2.2.3.9
Saures Aceton	1 mM HCl Aceton	
Präzipitations-Reagenz	50 % Saures Aceton 50 % Methanol	
<u>Intrazelluläres Färben für eine FACS-Messung</u>		2.2.4.1
Puffer F	2 % (v/v) Formaldehyd in PBS „ohne“	
Puffer P	0,2 % (v/v) Tween 20 in PBS „ohne“	
Puffer W	2 % FKS 0,2 % (v/v) NaN ₃ in PBS „ohne“	
<u>Lyse</u>		2.2.6.2
Lysepuffer	10 % (v/v) 10x PCR-Puffer 0,1 % (v/v) Proteinase K	
<u>Separation von Viruspartikeln</u>		2.2.6.3
TSE-Puffer (pH 7,4)	20 mM Tris-HCl 0,1 mM EDTA 10 mM NaCl	
Saccharose-Lösung 15%	15 % (v/v) Saccharose in TSE	
Saccharose-Lösung 65%	65 % (v/v) Saccharose in TSE	

2.1.8 Antikörper

Name	Herkunft	Konzentration
<u>Primärantikörper:</u>		
Ziegenserum 1	AG Denner, RKI, immunisiert mit ISU gp41	1:2000
Ziegenserum 20	AG Denner, RKI, immunisiert mit PERV p15E	1:500
Ziegenserum 26	AG Denner, RKI, immunisiert mit HERV gp36	1:500
Ziegenserum 27	AG Denner, RKI, immunisiert mit FeLV p15E	1:500
Penta-His-Antibody	Qiagen, Hilden, Deutschland	0,2 µg/ml
<u>Sekundärantikörper:</u>		
a-Rat IgG HPRT	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	0,43 µg/ml
a-Mouse IgG HPRT	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	0,5 µg/ml
a-Goat IgG HPRT	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	0,16 µg/ml
<u>Fluorochrom-Konjugate:</u>		
Anti-CD3-FITC	BD-Biosciences, San Jose, USA	0,5µg/3x10 ⁵ ZE
Anti-Foxp3-FITC	BD-Biosciences, San Jose, USA	0,5µg/3x10 ⁵ ZE
Anti-CD8-APC	BD-Biosciences, San Jose, USA	0,03µg/3x10 ⁵ ZE
Anti-CD4-APC	BD-Biosciences, San Jose, USA	0,25µg/3x10 ⁵ ZE
Anti-CD8-PE	BD-Biosciences, San Jose, USA	0,063µg/3x10 ⁵ ZE
Anti-CD25-PE	BD-Biosciences, San Jose, USA	0,063µg/3x10 ⁵ ZE

2.1.9 Primer und Sonden

Name	Sequenz (5'-3')	Fragmentgröße [bp]
FeLV RTQ for	TCAAGTATGTTCCCATGAGATACAA	185
FeLV RTQ rev	GAAGGTCGAACTCTGGTCAACT	
FeLV RTQ Sonde	6Fam-TTAAGCACCTGGGCCCCGGC-[Dabcyl]	
FoxP3-for	TCAAGCACTGCCAGGCG	195
FoxP3-rev	CAGGAGCCCTTGTCGGAT	150
FoxP3-Real-for	CGACCCCTTTTACCTACGCC	
FoxP3-Real-rev	GGATGGCGTTCTTCCAGGTGGC	800
FoxP3-Con-for	GTGGCCCGGATGTGAGAAGG	
FoxP3-Con-rev	GGTCCCTGTGGGCACATCCA	
FoxP3 Sonde	6Fam-TCCGCTGGGCCATCCTGGAGGCTC-[3BQ1]	
hs GAPDH 2 (+)	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	149
hs GAPDH 2 (-)	TGGTCCACACCCATGACGA	
HERV-TM NotI for	CGATGCGGCCGCGTAGCAGGAGTTGCATTGCAC	480
HERV-TM BglIII rev	GCTAAGATCTTTACGTAGTACTTCCAATGGTCTTA	
PERV-TM for	ACAGGCGGCGCGGCCCTAATCACAGGACCG	96
PERV-TM rev	GGTAGATCTTCAGTTGAACCATCCTTCAAA	
PERV-s-for	TCCAGGGCTCATAATTTGTC	
PERV-as-rev	TGATGGCCATCCAACATCGA	
PERV Sonde	6Fam-AGAAGGGACCTTGGCAGACTTTCT-BHQ1	
KoRV-5-for	CTAATAAAAGGGCCCATAGA	
KoRV-6-for	GTTGAACCATCCCTCGTACC	
KoRV-p15E-Sonde	6Fam-CCATGGATACAGACCTTAGGGCCC-DQ	

2.1.10 Peptide

Name	Sequenz	Herkunft
HIV ISU	NH ₂ -KQLQARILAVERYLKDQQL-COOH	Jerini, Berlin
MuLV/PERV-A ISU	NH ₂ -VLQNRRLDLLFLKEGGLC-COOH	Jerini, Berlin

2.1.11 Vektoren

pFPMT121-MF α -His₆-TCS [Degelmann et al. 2002]

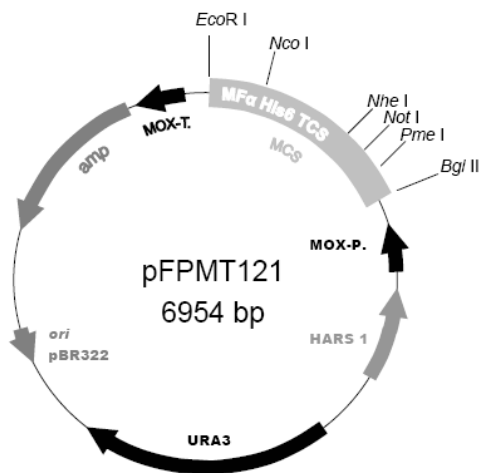


Abb. 2. 1 Schematische Darstellung des Expressionsvektors pFPMT121-MF α -His₆-TCS

Unter Verwendung des pFPMT121-MF-His-TCS Vektors [Degelmann et al. 2002], sollte das rekombinante HERV-K TM-Protein in *H. polymorpha* exprimiert werden. Zwischen MOX-Promotor und MOX-Terminator ist eine *multiple cloning site* (MCS) eingefügt, die das Klonieren und die Expression von heterologen *open reading frames* (ORF, Offener Leserahmen) möglich macht. Die Expression kann durch den MOX-Promoter reguliert werden, der durch Glukose supprimiert und durch Methanol induziert wird. Für die Sekretion der rekombinanten Proteine ist die Hefe Exportsignalsequenz vom Mating Faktor α und zur Aufreinigung der Proteine ein 6facher His-Tag in die MCS integriert. Die *thrombin cleavage site* (TCS) ermöglicht es, den His-Tag später wieder zu entfernen. Der in dieser Arbeit verwendete Wildtypstamm RB 11 besitzt eine Uracil-Auxotrophie, welche zur Selektion mit Hilfe des Markergen (URA 3) tragenden Vektors ausgenutzt werden kann. Neben dem HARS1 Element zur Erzeugung von hoch produzierenden Stämmen besitzt der Vektor ein *ori*- und ein Ampicillin Resistenzgen um ihn in *E. coli* zu vervielfältigen und selektieren.

2.2 Methoden

Steriles Arbeiten

Zur Sterilisierung wurden alle Medien, Puffer und Verbrauchsmaterialien bei 121 °C und 1.5 bar 15-20 min lang autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wie Bradford-Lösung wurden mit einem Sterilfilter der Porengröße 0,22 μ m filtriert und bei 4 °C gelagert. Glaspipetten und Glasgeräte wurden im Trockenschrank mindestens 2 h bei 200 °C erhitzt. Arbeiten, bei denen eine Kontamination mit Fremdorganismen verhindert werden sollte, wurden unter sterilen Arbeitsbänken und in getrennten Räumen ausgeführt. Zusätzlich erfolgte die Anzucht von Bakterien, Hefen und tierischen Zellen in verschiedenen Inkubatoren.

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Arbeiten und Umgang mit Bakterien

2.2.1.1.1 Stammhaltung

Für die längerfristige Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden Glycerinkulturen von dem betreffenden Stamm angelegt. Dazu wurden die zu lagernden Bakterienkulturen mit 50 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei -20 °C eingefroren. Bakterienstämme, die häufiger benötigt wurden, konnten auf LB-Vollmediumplatten, umwickelt mit Parafilm, mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.

2.2.1.1.2 Vermehrung von Bakterienkulturen

Die Bakterienkulturen wurden, soweit nicht anders vermerkt, unter ausreichender Belüftung bei 37 °C in LB-Vollmedium angezogen. Bestand eine plasmidvermittelte Ampicillin-Resistenz, so wurden die Medien mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/µl supplimentiert. Die Anzucht von Kulturen mit Volumina unter 5 ml erfolgte in PP-Röhrchen [Greiner Bio-One], Kulturvolumina von 20 ml bis 200 ml wurden in Erlenmeyerkolben bebrütet. Die Inkubation erfolgte jeweils unter Schütteln bei 230 rpm [Schüttelinkubator Innova 4330, New Brunswick Scientific]. Beimpft wurden die Medien durch Übertragung von Einzelkolonien durch Picken mittels einer sterilen Pipettenspitze von Nährbodenplatten oder aus Glycerinkulturen.

2.2.1.1.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte der Kulturen wurde photometrisch bestimmt [BioPhotometer, Eppendorf].

Die erfasste optische Dichte (OD) ist ein Maß für die Konzentration an Mikroorganismen in einem flüssigen Medium. Dabei wird die Eigenabsorption der Zellen ausgenutzt und die gemessenen Extinktionswerte für die Ermittlung der Zellkonzentration herangezogen. Die mathematische Beschreibung erfolgt über das Lambert-Beersche Gesetz.

$$OD_{600} = \Delta E = \epsilon_{\text{mol}} \times c \times d$$

[ΔE =im Photometer gemessene Extinktion bzw. Extinktionsdifferenz, ϵ_{mol} =wellenabhängiger molarer Extinktionskoeffizient [mm x Zellen/ml], c =Konzentration [Zellen/ml], d =Schichtdicke der Küvette [cm]]

Angegeben wird die optische Dichte als OD mit der benutzten Wellenlänge als Index; im Falle von Bakterien und Hefen wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ gemessen. Die Schichtdicke der verwendeten Küvetten betrug 10 mm, als Blankwert diente Medium.

2.2.1.1.4 Herstellung kompetenter Bakterien

Die meisten Bakterien, darunter auch *Escherichia coli* (*E. coli*) besitzen keine natürliche Transformationskompetenz. Um diese zur Aufnahme zirkulärer DNS zu befähigen, werden sie durch physikalische oder chemische Methoden künstlich kompetent gemacht. Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien vom Stamm *E. coli OneShot® Top10* [Invitrogen] wurden nach dem Rubidiumchlorid-Protokoll von Qiagen kompetent gemacht: aus einer frischen Vorkultur

wurden 100 ml LB-Medium 1:1000 angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde anschließend für 5 min auf Eis gekühlt und die Bakterien in der Avanti J20xP-Zentrifuge [Beckmann] für 10 min und 4000 g bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in 30 ml TFB I-Puffer pelletiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien erneut bei 4 °C für 10 min und 4000 g pelletiert. Das Pellet wurde in 4 ml eiskaltem TFB II-Puffer resuspendiert und die kompetenten Bakterien zu je 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.1.5 Transformation kompetenter Bakterien

Unter Transformation im Zusammenhang mit rekombinanter DNS versteht man die Aufnahme von freier DNS in eine Zelle. Um die kompetenten Bakterien zu transformieren wurde die Hitzeschock-Methode angewandt, bei der die Zellwände der Bakterien durch einen raschen Temperaturwechsel kurzzeitig permeabel für Plasmid-DNS sind.

Es wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet: die bei -80 °C gelagerten Aliquots der kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 20 min lang mit 1-10 µl der zu transformierenden DNS-Lösung auf Eis inkubiert. Die Menge an zugegebener DNS-Lösung richtete sich nach dem DNS-Gehalt. Wurde eine Retransformation mit einem bereits isolierten Insert-tragenden Plasmid durchgeführt, so reichten Mengen von 1 ng an einzusetzender DNS. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 45 sek bei 42 °C und eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Danach wurde der Ansatz mit 500 µl auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium vermischt und für 60 min bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Dann wurden die transformierten Bakterien mit einer Tischzentrifuge für 1 min bei 16000 g pelletiert und in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Schließlich erfolgte ein Ausstrich der Bakteriensuspension auf einer LB-Platte mit geeignetem Selektionsmarker. Als Negativkontrolle wurden kompetente Bakterien ohne Zugabe von DNS einer Hitzeschock-Behandlung unterzogen.

2.2.1.2 Arbeiten und Umgang mit Hefen (*Hansenula polymorpha*)

2.2.1.2.1 Stammhaltung

Mit den Hefekulturen wurde zur Stammhaltung verfahren wie bei den Bakterienkulturen in Abschnitt 2.2.1.1.1 beschrieben.

2.2.1.2.2 Vermehrung von Hefekulturen

Die Hefekulturen wurden wie die Bakterienkulturen schüttelnd bei 37 °C, 230 rpm und ausreichender Belüftung angezogen [Innova, New Brunswick Scientific]. Die Anzucht der untransfizierten Hefen erfolgte im Vollmedium YPD, die der transfizierten Hefen im Minimalmedium YNB. Zur Induktion der Proteinexpression wurden die Hefen bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert und in gleiche Volumina Expressionsmedium YPM umgesetzt.

Die Anzucht von Kulturvolumina unter 5 ml erfolgte in sterilen PP-Röhrchen [Greiner Bio-One], Kulturvolumina ab 20 ml wurden in Erlenmeyerkolben angezogen. Das Animpfen der Kulturen erfolgte entweder durch Anziehen aus einer Glyzerinkultur oder durch Picken einer Einzelkolonie mittels einer sterilen Impföse von einer Nährbodenplatte.

2.2.1.2.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte der Hefekulturen wurde wie bei den Bakterienkulturen photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ erfasst.

2.2.1.2.4 Herstellung kompetenter Hefen

Um Hefen zur Aufnahme DNS zu befähigen, müssen auch diese künstlich kompetent gemacht werden. Dazu wurden 200 ml YPD-Medium mit 3-5 ml einer frischen Rb11 Hefe-Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,8 bis 1,2 angezogen. Die Hefen wurden dann mittels Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm und Raumtemperatur (RT) geerntet und in 0,2 Volumen auf 37 °C vorgewärmten Kaliumphosphat-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von Dithiothreitol (DTT) bis zu einer finalen Konzentration von 25 mM erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Hefen wieder durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min bei RT geerntet und zweimal mit sterilem STM-Puffer gewaschen, zunächst in 1 Volumen, dann in 0,5 Volumen. Das finale Zellpellet wurde daraufhin in 0,005 Volumen STM-Puffer resuspendiert und in 60 μ l-Aliquots bei -80 °C eingefroren. Die kompetenten Hefen wurden vor jeder Transformation möglichst frisch hergestellt, da sie nicht länger als 2-3 Wochen bei -80 °C aufbewahrt werden können.

2.2.1.2.5 Transformation kompetenter Hefen

Die Transformation von Plasmid-DNS in kompetente Hefen erfolgte durch Elektroporation. Bei der Elektroporation wird durch die Pulse eines sich entladenden Kondensators kurzzeitig ein elektrisches Feld erzeugt, welches Löcher in den Zellwänden hervorruft. Durch diese Öffnungen kann Fremd-DNS in die Hefen gelangen.

Für die Transformation wurden kompetente Hefen auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNS (200 ng-1 μ g) inkubiert. Die Zellen mit der Plasmid-DNS wurden dann in vorgekühlte 2 mm Küvetten pipettiert. Nach vorsichtigem Abtrocknen der Küvette wurden sie in den Elektroporator [Gene Pulser II, BioRad] platziert und bei 2,0 kV, 15 μ F, 200 Ohm gepulst. Sofort nach dem Pulsen wurde 1 ml YPD zu den Zellen pipettiert und diese anschließend in Eppendorf Tubes überführt. Zur Erholung der Zellen erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C und 230 rpm. Die transformierten Hefen wurden schließlich durch Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm geerntet und in 1 ml Selektionsmedium gewaschen. Das Zellpellet wurde im Rücklauf resuspendiert und auf Selektions-Agarplatten (YNB) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte dann bei 37 °C über mehrere Tage. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich der Leervektor ohne Insert und als Negativkontrolle kompetente RB11 ohne Plasmid elektroporiert.

2.2.1.2.6 Selektion von hoch produzierenden RB11-Hefen

Im Hinblick auf das Herstellen rekombinanter Proteine, ist es bei der hier verwendeten Hefe *H. Polymorpha* möglich, eine spontane Integration des durch die Transformation aufgenommenen Plasmids in das Wirtsgenom zu erreichen [Degelmann et al. 2002]. Dazu ist eine autonom replizierende Sequenz, im Falle von *H. Polymorpha* ein so genanntes HARS-Element, auf dem zu integrierenden Plasmid und eine wiederholte Kultivierung unter selektierenden Bedingungen nötig (Passagierung). Während dieser Prozedur kann sich das Plasmid multiplizieren und spontan in

das Wirtsgenom integrieren [Sohn et al. 1996]. Um die Hefen, die das aufgenommene Plasmid in ihr Genom integriert haben von denen zu selektieren, die es zwar aufgenommen, aber nicht integriert haben, werden die Klone anschließend abwechselnd in YPD und YNB kultiviert. Dazu wurden jeweils 200 µl der Kultur in YNB in 3 ml YPD überführt und 4-6 h lang angezogen. Danach erfolgte der Mediumwechsel in YNB (wieder 200 µl in 3 ml YNB) und eine Inkubation über Nacht. Durch die Inkubation im Vollmedium und damit nicht selektierenden Bedingungen, verloren die Hefen während der Mitose aufgrund von Wachstumsvorteilen das nicht integrierte Plasmid (*plasmid curing*). Durch den Wechsel ins Minimalmedium jedoch konnten im Anschluss nur die Klone wachsen, die das Plasmid integriert hatten; es erfolgte also eine Auslese, um Hefen herzustellen, die das rekombinante Protein in großen Mengen produzieren konnten.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

2.2.2.1.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion [Mullis et al. 1983] ist die selektive *in vitro* Amplifikation eines DNS-Abschnittes. Dies erfolgt in einer zyklischen Reaktion, welche die DNS Denaturierung, die Hybridisierung der Primer (*annealing*) und die Kettenverlängerung (*elongation*) umfasst: zunächst wird die doppelsträngige DNS in Einzelstränge durch eine Temperaturerhöhung auf 95°C gespalten. Diesen Schritt nennt man Denaturierung, bei dem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen aufgebrochen werden. Durch Absenken der Temperatur können dann kurze komplementäre Oligonukleotide (*primer*) an die Template-DNS binden. Dieser Schritt heißt Primerhybridisierung bzw. *primer annealing*. Die Sequenzen der beiden Oligonukleotide (*sense primer* und *antisense primer*) werden so gewählt, dass der eine mit einer bestimmten Sequenz des Plus-Stranges der Ziel-DNS (Template) und der andere mit einem bestimmten Bereich des Minus-Stranges hybridisieren kann. Hierbei weisen die 3'-Enden der Primer aufeinander zu und flankieren somit den zu amplifizierenden DNA-Bereich. Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 2-3 °C unter ihrem Schmelzpunkt, typischerweise zwischen 50 und 65 °C.

Nach dem Hybridisierungsschritt wird die Temperatur auf 72 °C erhöht. Diese Temperatur stellt das Aktivitätsoptimum der in *E. coli* rekombinant hergestellten Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* dar. Bei diesem Schritt der Elongation verlängert die Taq-Polymerase die Primer am 3' OH-Ende durch kovalentes Anfügen von Nukleosidtriphosphaten (dNTPs) unter Abspaltung von Pyrophosphat.

Der eben beschriebene Zyklus, bestehend aus den Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation wird bis zu 40 Mal wiederholt wobei jedes Mal der neu synthetisierte Strang als Template für den nächsten Zyklus dient, so dass es zu einer exponentiellen Amplifikation der DNS kommt.

Die Reaktionsbedingungen einer Standard-PCR in einem 25 µl Reaktionsansatz wurden, sofern nicht anders vermerkt, wie folgt gewählt:

Template	x µl (50 ng – 100 ng)
Primer (for + rev)	1 µl Primermix (10 pmol)
Puffer	2,5 µl 10x PCR-Puffer (mit 15 mM MgCl ₂)
dNTPs	1 µl (2 mM)
MgCl ₂	0,5 µl (25 mM) (optional)
Ampli-Taq-Gold	0,25 µl (5 U/µl)
Nukleasefreies ddH ₂ O	ad 25 µl

Die Menge des Templates richtete sich nach der Art und Konzentration des Moleküls, welches amplifiziert werden sollte.

Die verwendeten Temperatur-Programme variierten entsprechend der Primersequenzen und der Länge der zu amplifizierenden DNS-Produkte. Das Primerdesign hinsichtlich Dimerization, Self-Priming und Schmelztemperatur wurde mit dem Edit-Sequence-Programm der DNS-Star-Software [Laser Gene] ausgeführt.

Bedingungen für die Standard PCR zur Amplifikation von HERV-K-TM

Template	pCK30
Primer	TM for <i>Not</i> I + TM rev <i>Bgl</i> II
Temperaturprofil	95°C/10 min– 95°/30 sek–55°C/30 sek–72°C/30 sek –72°C/10 min ----- 35 x -----

Bedingungen für die Standard PCR zur Amplifikation von FoxP3

Template	PBMC cDNS
Primer	FoxP3-Con-for + FoxP3-Con-rev
Temperaturprofil	95°C/10 min– 95°/30 sek–68°C/30 sek–72°C/90 sek –72°C/10 min ----- 35 x -----

2.2.2.1.2 Real-Time Quantitative PCR (RTQ-PCR)

Die Real-Time PCR [Higuchi et al. 1993] ist eine moderne Weiterentwicklung der von Mullis 1983 entwickelten PCR, bei der die Nukleinsäuren in Echtzeit reproduzierbar quantifiziert werden können. Während der RTQ-PCR wird ein Fluoreszenzsignal erzeugt, welches sich proportional zum angereicherten DNA-Produkt verhält und mittels eines speziellen Real-Time-PCR-Cycler erfasst wird. Die Fluoreszenzsignale entstehen entweder sequenzunspezifisch durch Interkalierung (SYBRGreen) in doppelsträngiger DNS oder sie entstehen sequenzspezifisch durch Hybridisierung mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sonden. Mit Hilfe der SYBRGreen bzw. einer Foxp3 spezifischen Sonden Real-Time PCR sollte die Induktion von regulatorischen T-Zellen durch einen Anstieg des mRNA-Niveaus von FoxP3 nachgewiesen werden. Darüber hinaus erfolgte mittels Sonden spezifischen Real-Time PCRs ein Nachweis der Provirusintegration bei der Virusanzucht.

SYBRGreen Real-Time-PCR

SYBRGreen ist ein Cyaninfluoreszenzfarbstoff der sequenzspezifisch in doppelsträngige DNS interkaliert. Es lässt sich mit Licht der Wellenlänge 497 nm maximal anregen und erreicht, gebunden an DNS, bei 521 nm seine maximale Emission [Roche 1999]. Dies führt mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Bei der Verwendung von SYBRGreen fehlt allerdings die Spezifität hinsichtlich des zu untersuchenden Templates, da auch Primer-Dimere oder Nebenprodukte, die sich während der Reaktion bilden, einen Fluoreszenzanstieg verursachen. Dieser ist zunächst nicht von dem des spezifischen Produkts zu unterscheiden. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren oder Nebenprodukten kann erst nach Abschluss der PCR-Reaktion mittels einer Schmelzkurvenanalyse erfolgen. Bei dieser werden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt, bis sie ihrem Schmelzpunkt entsprechend nur noch als Einzelstrang vorliegen. Die damit verbundene Freisetzung von SYBRGreen und somit Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Kleinere Fragmente wie z.B. Primer-Dimere weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt auf als die spezifischen PCR-Produkte, die produktcharakteristische Schmelzkurve des Amplifikats lässt sich daher von der der Artefakte leicht unterscheiden [Bustin et al. 2000].

Die Reaktionsbedingungen einer SYBRGreen Real-Time-PCR in einem 25 µl Reaktionsansatz wurden, sofern nicht anders vermerkt, wie folgt gewählt:

Template	x µl (50-70 ng)
2x Mastermix (Stratagene, La Jolla, USA)	12,5 µl
Reference Dye (Rox, 1:5000)	0,375 µl
Primermix (FoxP3-for + FoxP3-rev)	1 µl (10 pmol)
Nukleasefreies ddH ₂ O	ad 25 µl

Temperaturprofil

95°C/10 min-**95°C/30sek-53°C/60sek-72°C/30sek-72°C/10 min**-ab 56°C (Schmelzkurve)

-----**45x**-----

Sonden Real-Time-PCR

Bei der Sonden Real-Time-PCR werden, im Gegensatz zur SYBRGreen Real-Time-PCR, PCR-Produkte sequenzspezifisch detektiert. Dies erfolgt durch Hybridisierung eines fluorophormarkierten Oligonukleotids an eine Zielsequenz innerhalb des PCR-Produktes, welches auf der Basis von FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) ein detektierbares Fluoreszenzsignal liefert. FRET ist ein von Förster 1948 erstmals beschriebener quantenmechanischer Prozess, bei dem ein strahlungsloser Energietransfer von einem Donor zu einem Akzeptorchromophor erfolgt, wenn das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors hinreichend überlappt und die beiden Farbstoffe sich in ausreichender Nähe befinden (10-100 Å). Bringt man ein Fluorochrom in ausreichende Nähe zu einem zweiten, dessen Anregungsspektrum dem Emissionsspektrum des ersten Fluorchroms entspricht, so wird Energie, statt als Licht einer bestimmten Wellenlänge abgestrahlt, direkt an das zweite Fluorchrom weitergegeben, das daraus durch den Energieverlust Licht einer höheren

Wellenlänge emittiert. Wenn man das Licht der Wellenlänge des ersten Fluorchroms misst, bezeichnet man ihn als Reporter (*to report* = berichten) und Fluorchrom 2 als Quencher (*to quench* = löschen). Bei der Verwendung von TaqMan-Sonden [Livak et al. 1995] zur Erzeugung sequenzspezifischer Fluoreszenzsignale sitzen Reporter und Quencher auf demselben Oligonukleotid, vorzugsweise am 5'- und am 3'-Ende. Solange das Oligonukleotid intakt ist, ist die Lichtstärke des Fluorchroms 1 gering, wird aber der Reporter durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase freigesetzt, steigt die Lichtproduktion bei dieser Wellenlänge an. Je mehr DNS synthetisiert wird, desto mehr Reporter-Moleküle werden freigesetzt und entsprechend steigt die Signalstärke. Da eine Hydrolyse der TaqMan-Sonde durch die Taq-Polymerase nur erfolgen kann, wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Template kommt, wird das Fluoreszenzsignal nur generiert, falls es zu einer Amplifikation der Zielsequenz kommt.

Die Reaktionsbedingungen einer Sonden Real-Time-PCR in einem 25 µl Reaktionsansatz wurden, sofern nicht anders vermerkt, wie folgt gewählt:

Template	x µl
Primer (for + rev)	1 µl Primermix (10 pmol)
Puffer	2,3 µl 10x PCR-Puffer (mit 15 mM MgCl ₂)
dNTPs	0,63 µl (2 mM)
MgCl ₂	1,75 µl
Sonde	0,5 µl
Ampli-Taq-Gold	0,25 µl
Nukleasefreies ddH ₂ O	ad 25 µl

Bedingungen für die FoxP3 Sonden Real-Time PCR:

Template	PBMC cDNA
Primer	FoxP3-Real-for + FoxP3-Real-rev
Sonde	FoxP3 Sonde
Temperaturprofil	95°C/10 min – 95°C/60 sek-55°C/60 sek -72°C/20 sek ----- 40x -----

Bedingungen für die FeLV Sonden Real-Time PCR:

Template	Lysat von infizierten FEA-Zellen
Primer	FeLV RTQ for + FeLV RTQ rev
Sonde	FeLV RTQ Sonde
Temperaturprofil	95°C/10 min – 95°C/45 sek-59°C/60 sek -72°C/30 sek ----- 45x -----

Bedingungen für die KoRV Sonden Real-Time PCR:

Template	Lysat von infizierten 293-Zellen
Primer	KoRV-5-for + KoRV-6-rev
Sonde	KoRV-p15E Sonde
Temperaturprofil	95°C/10 min – 95°C/30 sek-53°C/60 sek -72°C/30 sek ----- 45x -----

Bedingungen für die PERV Sonden Real-Time PCR:

Template	Lysat von infizierten 293-Zellen
Primer	PERV-s-for + PERV-as-rev
Sonde	PERV Sonde
Temperaturprofil	95°C/10 min – 95°C/30 sek-53°C/60 sek -72°C/30 sek ----- 45x -----

Die Quantifizierung des Amplifikats einer Real-Time PCR kann entweder absolut durch Erstellen einer Kalibriergeraden mittels Verdünnungsreihe einer Vergleichs-cDNS oder relativ durch die von Peinnequin et al. 2004 beschriebene $\Delta\Delta C_T$ Methode erfolgen. Der C_t -Wert (*threshold cycle*) drückt die Zyklenzahl aus, bei der initial ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird und steht im logarithmischen Verhältnis zur Ausgangsmenge. Der Unterschied im C_t -Wert von behandelten Proben zu unbehandelten Kontrollproben (ΔC_t -Wert) hängt dabei vom Unterschied in der relativen RNS-Kopienzahl ab. Durch Beziehen der C_t -Werte von umgeschriebenen RNS-Isolaten aus behandelten und unbehandelten PBMCs kann somit eine Aussage über eine erhöhte Ausgangsmenge bzw. Induktion eines Gens wie beispielsweise FoxP3 gemacht werden. Die Konzentrationen der zu untersuchenden cDNS wurden vor der Real-Time PCR photometrisch bestimmt und aufeinander abgeglichen um stets die gleiche Menge an Ausgangstemplate einzusetzen.

2.2.2.1.3 Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR handelt es sich um eine Art Schnelltest zur Detektion von Insert-Fragmenten auf Vektoren nach einer Transformation. Dabei wird für die PCR direkt Zellmaterial von einer Plattenkolonie eingesetzt, um das gesuchte Fragment mit Hilfe der entsprechenden Primer zu amplifizieren. Durch den initialen Denaturierungsschritt kommt es zur Lyse der Bakterien und damit zur Freisetzung der Plasmid-DNS, welche dann als Matrize für die PCR dient.

Zur Durchführung der PCR wurde wenig Zellmaterial von Einzelkolonien mittels einer sterilen Pipettenspitze gepickt und direkt in den vorbereiteten 25 μ l Ansatz einer Standard-PCR suspendiert.

2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um eine Methode, bei der DNS-Stränge nach ihrer Größe getrennt werden um in Anschluss ihre Größe durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe zu bestimmen. Agarose, bestehend aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose, dient als interne Matrix, in dem DNS-Moleküle in einem elektrischen

Feld aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im DNS-Rückgrat zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle in der Gelmatrix hängt von verschiedenen Faktoren wie Molekülgröße, Molekülkonformation, Agarosekonzentration und angelegter Gleichspannung ab. Lineare, doppelsträngige DNS-Fragmente bewegen sich in der Matrix indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes.

Die für die Elektrophorese eingesetzte Agarosekonzentration wurde in Abhängigkeit von dem DNS-Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Trennung der Fragmente erfolgen sollte, gewählt. Zur Trennung von DNS-Fragmenten <500 bp wurden 1,5 % (w/v) und zur Trennung von Plasmiden und DNS-Fragmenten >500 bp 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde dafür in der entsprechenden Konzentration in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und luftblasenfrei in eine vorbereitete Gelkammer [BioRad] gegossen. Die zu untersuchenden Proben wurden 1:10 mit 10x DNS-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Abschätzung der Größe der Fragmente wurden zusätzlich 10 µl des O'Gene Ruler™, DNA Ladder Mix [Fermentas] in eine Nebentasche pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte dann bei 5-8 V/cm², was einer Spannung von ~80 V für ein kleines und ~120 V für ein großes Gel entspricht. Für die Auswertung wurde das Gel anschließend 20 min lang mit einer Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) gefärbt. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff der zwischen die Basen der DNS interkaliert, wodurch sich das Anregungsspektrum des Farbstoffes verändert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung durch ultraviolettes Licht (254 nm) stark erhöht wird. Die abgestrahlte Wellenlänge ist energieärmer und somit im sichtbaren Bereich $E_{\max}=590$ nm, die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorhandenen DNS-Menge. Die Gele wurden mit dem BioRad GelDoc200 digital dokumentiert.

2.2.2.3 Gel-Extraktion

DNS-Fragmente, die durch Restriktionsverdau oder PCR erzeugt worden waren, wurden zunächst durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch UV-Licht sichtbar gemacht. Für die Isolierung der DNS aus dem Gel wurde das JetQuick-Gel-Extraction-Kit von Genomed verwendet, welches auf dem Aufschmelzen der Agarose und dem spezifischen Binden der DNS an eine Matrix basiert. Dazu wurden die entsprechenden Banden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und nach dem Hersteller-Protokoll verfahren. Die Elution erfolgte mit 50 µl und auf 70 °C erwärmtes ddH₂O.

2.2.2.4 Restriktionsverdau

Das Zerschneiden der DNS durch Restriktionsenzyme dient sowohl als präparatives Hilfsmittel für Klonierungszwecke als auch zu analytischen Zwecken, wie beispielsweise die Identifikation von Plasmiden oder als Kontrolle nach Klonierungen durch Identifikation der Restriktionschnittstellen. Restriktionsenzyme sind Nukleasen, die die DNS an spezifischen Stellen durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung im DNS-Rückgrat spalten. Man unterscheidet zwischen 3 Typen von Restriktionsenzymen, in der molekularbiologischen Praxis werden jedoch vorzugsweise die vom Typ II verwendet. Diese schneiden, im Gegensatz zu Restriktionsenzymen vom Typ I und III, innerhalb der meist palindromischen Erkennungssequenz, besitzen keine Methyltransferase-Aktivität und benötigen kein Adenosin-5'-triphosphat (ATP). In Abhängigkeit vom Restriktionsenzym können durch das Schneiden entweder

sogenannte glatte Enden (*blunt ends*) oder klebrige Enden (*sticky ends*) entstehen. Die Enzyme reagieren äußerst sequenzspezifisch und unterliegen individuellen Reaktionsbedingungen. So hat jedes Restriktionsenzym eine spezifische Erkennungssequenz, die unter optimalen Pufferbedingungen und Inkubationstemperatur geschnitten wird. Die Dauer der Inkubation richtet sich nach der Temperatur und den eingesetzten Mengen an DNS und Enzym. Bei optimalen Bedingungen spaltet eine Einheit [1 U] Restriktionsenzym 1 µg DNS in einer Stunde. In dieser Arbeit wurden alle Restriktionsspaltungen bei 37 °C für 2 h mit 5 U Enzym in dem jeweilig optimalen Puffer inkubiert.

Die Reaktionsbedingungen eines Restriktionsverdau in einem 20 µl Reaktionsansatz wurden, sofern nicht anders vermerkt, wie folgt gewählt:

Template	x µl
Puffer	2 µl 10x Puffer
BSA	0,5 µl (optional)
Restriktionsenzym	1 µl (5 U)
Nukleasefreies ddH ₂ O	ad 20µl

Die zu spaltende DNS-Menge hing davon ab, ob eine präparative (1-10 µg) oder eine analytische (2-3 µg) Spaltung erfolgen sollte. Analytische Spaltungen konnten zeitsparend mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden, sofern beide Enzyme ausreichende Kompatibilität zeigten. Im Falle des Doppelverdau wurden je 5 U von beiden Enzymen eingesetzt. Das Ergebnis einer Spaltung konnte auf einem Agarosegel analysiert werden.

2.2.2.5 Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)

Um nach einer Restriktion eines Vektors dessen Religierung zu verhindern, wurde er anschließend mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) behandelt. Mit Hilfe der Phosphatase werden die an dem 5' Ende eines DNS-Fragments verbliebenen Phosphatreste, die für die Ligation benötigt werden, entfernt. Das Insert, das man in den Vektor integrieren möchte, besitzt hingegen noch beide Phosphatreste, eine Ligation mit dem Vektor ist daher noch möglich.

Die Reaktionsbedingungen einer SAP-Behandlung in einem 50 µl Reaktionsansatz wurden, sofern nicht anders vermerkt, wie folgt gewählt:

Template (Vektor nach Gel Extraktion)	50 µl
SAP-Puffer	6 µl
Shrimp Alkaline Phosphatase	2 µl
Nukleasefreies ddH ₂ O	ad 60µl

Das Reaktionsgemisch wurde zunächst für 30 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert und das Enzym anschließend bei 65 °C für 15 min inaktiviert.

2.2.2.6 Ligation

Unter Ligation versteht man das Verknüpfen von DNS-Fragmenten mit Hilfe des Enzyms DNS-Ligase. Die DNS-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die kovalente Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe von überstehenden und stumpfen DNA-Enden. Da Basenpaarung nur zwischen komplementären Sequenzen möglich ist, können von einem Restriktionsenzym erzeugte kohäsive Enden nicht mit denen von einem anderen Enzym erzeugten Enden paaren, es sei denn, dieses andere Enzym erzeugt die gleichen klebrigen Enden. Auf diese Weise können die mit denselben Restriktionsenzymen geschnittene Vektoren und Inserts spezifisch zusammengefügt werden.

Die Reaktionsbedingungen einer Ligation in einem 20 µl Reaktionsansatz wurden, sofern nicht anders vermerkt, wie folgt gewählt:

Template (Vektor und Fragment)	x µl
Puffer	2 µl 2x T4 Ligase Puffer
Ligase	1 µl T4 DNA Ligase (400 U)
Nukleasefreies ddH ₂ O	ad 20µl

Die Insert-DNS sollte gegenüber der Vektor-DNS in einem 3-5 fach molaren Überschuss vorhanden sein. Die Inkubation der Ligation wurde konstant bei 16 °C über Nacht im PCR-Cycler durchgeführt. Bei dieser relativ tiefen Temperatur ist gewährleistet, dass die beiden komplementären Enden Basenpaare ausbilden und die Ligase noch arbeitet.

2.2.2.7 Plasmid-Präparation

Um Plasmide nach einer Transformation aus Bakterien zu isolieren wurden verschiedene Kits verwendet:

Plasmid-Mini-Präparation [E.Z.N.A® Plasmid Miniprep Kit I, PeqLab]

Die Plasmidisolierung mit diesem Kit basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien und der anschließenden Aufreinigung der Plasmid-DNS über eine Anionenaustauscher-Matrix. Es wurde nach dem Hersteller-Protokoll verfahren. Die Elution erfolgte mit 50 µl und auf 70 °C erwärmtes ddH₂O.

Plasmid-Maxi-Präparation [Invisorb® Plasmid Maxi Kit, Invitex]

Die Isolation mit diesem Kit basiert auf dem gleichen Prinzip wie das bei der Plasmid-Mini-Präparation, ein Unterschied besteht jedoch in der maximal einzusetzenden Kulturmenge. Bei der Maxi-Präparation werden bis zu 200 ml einer Übernachtskultur der plasmidtragenden Bakterien eingesetzt, in dieser Arbeit wurden 100 ml eingesetzt. Die Plasmid-Maxi-Präparation erfolgte wie im Hersteller-Protokoll beschrieben, die Plasmid DNS wurde mit 800 µl auf 70 °C erwärmtes ddH₂O eluiert.

2.2.2.8 DNS Präparation aus Hefen („Smash’n Grab“)

Um DNS aus Hefen zu isolieren, wurde nach dem folgendem Protokoll [Hoffman und Winston 1987] gearbeitet, welches auf der Lyse der Zellen, der Trennung von DNS und kontaminierenden Proteinen und der anschließenden Einkonzentrierung der DNS durch eine Ethanol-fällung basiert. Die Zellen einer 10 ml Übernachtskultur wurden durch wiederholtes Zentrifugieren bei 13000 rpm für 1 min in einem 2 ml Eppendorf Tube geerntet. Die Überstände wurden verworfen und die Zellen mit 500 µl ddH₂O gewaschen und erneut bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann im Rücklauf resuspendiert und mit 200 µl Lyse Puffer, 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol [25:24:1] und 200 µl Glaskugeln versetzt. Nach sorgfältigem Vortexen wurde durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit eine Phasentrennung erreicht. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf Tube pipettiert und die DNS durch eine anschließende Ethanol-fällung einkonzentriert.

2.2.2.9 Reinigung und Konzentrierung von DNS

Phenol/Chloroform Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion stellt eine einfache Methode zur DNS-Aufreinigung dar, bei der hauptsächlich zelluläre Proteine und proteinkomplexierte genomische DNS von Plasmid-DNS abgetrennt werden. Sie kann nach endonukleolytischen Spaltungen zum Entfernen der Restriktionsenzyme, nach Ligationen zum Entfernen der Ligase und nach Plasmidpräparationen zum Entfernen restlicher zellulärer Proteine angewendet werden.

Die DNS-haltige Lösung wurde mit gleichem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol [25:24:1, Sigma] versetzt. Kleine Volumina wurden zunächst auf mindestens 100 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Nach intensivem Vortexen wurde durch Zentrifugation bei 14000 rpm und RT für 2 min wieder eine Phasentrennung erreicht. Die Nukleinsäuren bleiben aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen in der oberen wässrigen Phase gelöst, während sich die Proteine zwischen beiden Phasen, in der so genannten Interphase, anordnen. Die obere DNS-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Ethanol-fällung unterzogen.

Ethanol-fällung

DNS-haltige Lösungen wurden zur Einkonzentrierung der DNS, zum Entfernen von Salzen sowie zum Wechsel von Inkubationspuffern mit Ethanol gefällt. Hierfür wurde die DNS-haltige Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt. Nach einer Inkubation für 20 Minuten bei -20 °C wurde die DNS 20 min lang in einer Tischzentrifuge bei 14000 rpm und 4 °C pelletiert. Zum Entfernen des Na-Acetats wurde das DNS-Pellet anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Resuspension des Pellets erfolgte je nach DNS-Menge in 20-200 µl nukleasefreiem Wasser.

2.2.2.10 Isolation von Ribonukleinsäuren (RNS) aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolation von RNS aus humanen PBMCs wurde das RNeasy Kit der Firma Qiagen verwendet. Es basiert auf der Lyse und Homogenisation der Zellen durch einen Guanidin-Isothiocyanat Puffer, der anschließenden Bindung der RNA an eine Silikagelmembran und auf verschiedenen Waschschritten, in denen kontaminierende Substanzen entfernt werden. Es

wurde nach dem Hersteller-Protokoll verfahren, wobei der optionale Schritt des 20-minütigen DNase-Verdau durch die DNaseQ stets durchgeführt wurde. Die Elution erfolgte mit 40 μ l ddH₂O.

2.2.2.11 Sequenzierung

Zur finalen Überprüfung nach einer Klonierung, ob die von transformierten Zellen aufgenommenen Plasmide die richtigen Inserts tragen, wurde die Nukleotidsequenz der mittels einer Präparation isolierten Plasmide analysiert. Die in dieser Arbeit verwendete Sequenziermethode basiert auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger [Sanger et al. 1977], bei der eine PCR mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) durchgeführt wird. Durch den Einbau eines ddNTPs in eine Polynukleotidkette während einer PCR-Reaktion bricht die Polymerisierung ab, da der Polymerase kein freies 3'-OH Ende als Substrat zur Verfügung steht. Statistisch gesehen liegt am Ende einer PCR für jede Base ein entsprechend gekürztes DNS-Stück vor. Die entstandenen unterschiedlich langen Bruchstücke werden dann mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und können aufgrund der verschiedenfarbig fluoreszierenden Farbstoffe analysiert werden. Die beiden letzten Schritte wurden vom hauseigenen Service übernommen, die PCR wurde selbst im Labor durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels des „*edit-sequence*“ Programms der DNA-Star-Software [Laser Gene].

Die Reaktionsbedingungen einer Sequenzier-PCR in einem 10 μ l Reaktionsansatz wurden, sofern nicht anders vermerkt, wie folgt gewählt:

Template	200 ng (Plasmid)
Primer	5 pmol
BigDye (Terminator v 3.1 Nukleotidgemisch, Applied Biosystems)	2 μ l
Puffer	2 μ l 5x Reaction Buffer
Nukleasefreies ddH ₂ O	ad 10 μ l

2.2.2.12 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch bestimmt [BioPhotometer, Eppendorf], wobei die mathematische Beschreibung auch hier über das Lambert-Beersche Gesetz erfolgt. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum im Bereich der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm, kontaminierende Proteine im Bereich der Wellenlänge $\lambda = 280$ nm, weshalb man bei diesen beiden Wellenlängen misst. Durch Vergleich der Extinktionen bei 260 und 280 nm kann die Reinheit der DNS-Lösung abgeschätzt werden. Optimal ist eine Ratio um 1,9, bei Verunreinigungen der DNS-Probe durch z.B. Proteine verkleinert sich dieser Wert.

Zur Messung des DNS-Gehalts von Mini-Präparationen wurde die zu untersuchende Lösung 1:25 verdünnt. Die Schichtdicke der Quartzküvette in der gemessen wurde betrug 10 mm und als Blankwert diente ddH₂O.

2.2.2.13 Reverse Transkription

Ausgehend von einer RNA-Isolation wurde eine Reverse Transkription mit Hilfe des RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits [Fermentas] zur Umschreibung der gewonnenen RNS in DNS durchgeführt. Dabei wird nach Anlagerung von Primern mit Hilfe einer RNS-abhängigen DNS-Polymerase vom 3'-Ende einer messenger RNS (mRNS) eine komplementäre DNS (cDNS) synthetisiert. Bei der RNS-abhängigen DNS-Polymerase handelt es sich um die so genannte Reverse Transkriptase, einem genetisch manipuliertem Enzym, welches ursprünglich aus RNS-Tumroviren isoliert wurde. Bei diesem Enzym ist das RNase-H-aktive Zentrum so durch eine Deletion verändert, dass die RNase-H-Aktivität um den Faktor 10^6 - 10^7 reduziert wird, die Polymerase-Aktivität jedoch voll erhalten bleibt. Das in dieser Arbeit verwendete Kit basiert auf der Moloney-Maus-Leukämievirus-Reverse Transkriptase (M-MuLV RT).

Es wurde stets nach dem Hersteller-Protokoll verfahren. Für die Reverse Transkription wurden die mitgelieferten *random-hexamer* Primer verwendet und die maximale Templatemenge eingesetzt, um eine möglichst große Ausbeute an cDNS zu erhalten. Außerdem wurde von jeder Probe eine -(minus)RT-Kontrolle mitgeführt, anstatt der Reversen Transkriptase wurde ddH₂O hinzupipettiert um später falsch positive Ergebnisse durch DNS-Kontaminationen ausschließen zu können.

Die Reaktionsbedingungen einer Reversen Transkription in einem 20 µl Reaktionsansatz wurden, sofern nicht anders vermerkt, wie folgt gewählt:

Template	12 µl
Primer	1 µl Random Hexamer Primer (0,2 µg/µl)
Puffer	5 µl 5x Reaction Buffer
dNTPs	2 µl (10 mM)
Ribonuklease Inhibitor	1 µl (20 u/µl)
RevertAid™ H Minus M-MuLV RT	1µl (200 u/µl)

Die synthetisierte cDNS wurde bei -20 °C gelagert und bei der Realtime-PCR als Template verwendet.

2.2.2.14 One-Step RT-PCR

Eine One-Step RT-PCR bietet die Möglichkeit RNS-Moleküle zu detektieren, analysieren und amplifizieren ohne eine zusätzliche Reverse Transkription durchzuführen. Bei dieser Methode erfolgen Reverse Transkription und Amplifikation durch PCR mit Gen-spezifischen Primern hintereinander und im selben Gefäß. Dies hilft Kontaminationen durch Verschleppen von DNS-Molekülen, so genanntes „*carry-over*“, zu minimieren und erleichtert das Bearbeiten von mehreren Proben.

In dieser Arbeit wurde das SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq-Kit der Firma Invitrogen verwendet. Es wurde nach dem Hersteller-Protokoll verfahren, der Ansatz jedoch auf 20 µl minimiert.

Die Reaktionsbedingungen einer One-Step RT-PCR in einem 20 µl Reaktionsansatz wurden, sofern nicht anders vermerkt, wie folgt gewählt:

Template	7,5 µl
Puffer	10 µl (2x Reaktionsmix)
RT/Platinum® Taq Mix	0,5 µl

Temperaturprofi

50°/30 min – 94°C/2 min **-94°C/15sek-60°C/30sek-72°C/60 sek** -72°C/10 min – 4°/hold

-----40x-----

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Kopplung von Peptiden

In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe zeigte sich, dass immunsuppressive Peptide mit einem Molekulargewicht unter 4 kDa allein nicht in der Lage sind, Effekte an Zellen des Immunsystems zu induzieren [Denner et. al 1994]. Daher müssen sie an größere Trägermoleküle wie BSA gekoppelt oder selbst zu Polymeren verknüpft werden. Die chemische Kopplung von Proteinen durch quervernetzende Substanzen (auch *crosslinker* genannt), stellt eine klassische Methode zur kovalenten Verknüpfung von Proteinen dar. Die gebräuchlichsten Verfahren beruhen auf der Reaktivität von primären Amino-, Thiol-, Hydroxyl- oder Carboxylgruppen bestimmter Aminosäuren. Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Kopplung von Peptiden beruht auf dem Einsatz eines reaktiven Carbodiimid, dem 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC). Der Crosslinker EDC reagiert mit den Carboxylgruppen der Peptide und bildet ein reaktives Zwischenprodukt, welches mit primären Aminen eine Amidbindung eingehen kann.

Um eine effektive Kopplung zu erreichen wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet: 8 mg zu koppelndes Peptid wurden mit 38,4 mg EDC versetzt und gemischt. Durch die Zugabe von Sulfo-NHS, einem Succinimidanalogon, konnte die Halbwertszeit des reaktiven Esters in den Stundenbereich erhöht werden. Die Ausbeute der bei neutralem pH-Wert ablaufenden Reaktion konnte somit auf 20 % erhöht werden. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend, um die niedermolekularen Fraktionen zu entfernen, 5 Tage gegen 1-fachem PBS „ohne“ bei 4 °C dialysiert (*molecular weight cut off*, MWCO: 10000 Da). Abschließend erfolgte eine Proteinbestimmung der gekoppelten Peptide um die Kopplungseffizienz, durch Vergleich der Konzentrationen vor und nach der Kopplung, zu bestimmen. Außerdem erfolgte eine Untersuchung per SDS-PAGE und Western Blot, unter Verwendung des Serums der Ziege 1, die mit gp41 ISU immunisiert wurde, welches an das Trägermolekül KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) gekoppelt worden war.

Für die Untersuchung zur Immunsuppression wurden Peptide verwendet, die in ihrer Sequenz der immunsuppressiven (ISU-) Domäne von HIV-1 und MuLV bzw. PERV-A entsprachen. Die HPLC-gereinigten Monomere der Peptide [Jerini] hatten ein mittleres Molekulargewicht von 2,3 kDa.

2.2.3.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Es wurden zwei verschiedene Methoden angewandt, um die Konzentration von Proteinlösungen zu bestimmen, zum einen der Bradford Bio-Rad Microassay und zum anderen das BCA Protein Assay Kit von Pierce. Bei beiden Verfahren beruhte die Quantifizierung auf dem Erstellen einer Kalibriergeraden. Dazu wurden parallel zu den zu untersuchenden Proben, BSA [PIERCE] als Standard in den Konzentrationen 200, 400, 600, 800, 1000 und 1200 µg/ml pipettiert. Für jede Messung wurde von jeder Probe ein dreifacher Ansatz durchgeführt, jede Proteinkonzentration stellt also das Mittel einer Dreifachbestimmung dar.

Bradford Bio-Rad Microassay

Diese von Bradford [Bradford et al. 1976] beschriebene Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen beruht auf der Bindung des ionischen Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue* R-250 an basische Aminosäuren, wobei das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Diese Absorptionsänderung wird bei 595 nm photometrisch erfasst und die Proteinkonzentration durch lineare Regressionsanalyse der BSA Kalibriergeraden bestimmt.

Um die Proteinkonzentrationen nach Bradford zu ermitteln, wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet: die Bradford-Stammlösung wurde 1:5 verdünnt, steril filtriert und davon 196 µl pro Well in eine 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Zu der Bradford-Lösung wurde dann 4 µl der zu untersuchenden Probe bzw. BSA als Standard oder PBS als Negativkontrolle pipettiert und gut durchmischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Ermittlung der Proteinkonzentration im ELISA *Reader Spectra Classic* [Tecan] bei 560 nm.

Pierce BCA Protein Assay Kit

Die Proteinbestimmung nach Pierce beruht auf dem Nachweis eines Bicinchoninsäure/Cu⁺-Farbkomplexes, der durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf Cu²⁺-Ionen und anschließender Inkubation mit Bicinchoninsäure entsteht [Smith et al. 1985]. Das wasserlösliche, violette Reaktionsprodukt besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm und ermöglicht so eine photometrische Quantifizierung.

Um den Pierce Protein Assay durchzuführen, wurde zuerst die Gebrauchslösung aus 50 Teilen BCA Reagenz A und einem Teil BCA Reagenz B hergestellt. Von der fertigen Gebrauchslösung wurden 200 µl pro Well einer 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt und 10 µl der zu untersuchenden Probe, BSA in den verschiedenen Konzentrationen oder PBS hinzu pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurden die Proben im ELISA *Reader Spectra Classic* [Tecan] bei 560 nm mit einer Referenz von 492 nm gemessen.

2.2.3.3 Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche Tricin-Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Analyse komplexer Proteinmischungen und ermöglicht den schnellen Nachweis zu identifizierender Proteine und deren Molekulargewicht-Bestimmung [Schagger et al. 1987]. Natrium Dodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, welches durch Anlagerung an Proteine deren Eigenladung überdecken kann (1,4 g SDS bindet an 1 g Protein), so dass die

Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Zur Vorbereitung wurden die Proben mit SDS im Überschuss auf 95 °C erhitzt. Durch Zugabe von reduzierenden Thiolverbindungen wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) wurden die Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen aufgespalten. Wasserstoff- und Disulfidbrücken wurden so zerstört, die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine aufgelöst. So wurde gewährleistet, dass nur die Größe bzw. das Molekulargewicht als Trennkriterium während der Gelelektrophorese wirkt.

In dieser Arbeit wurde stets eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt; bevor die Proben durch das engmaschige Trenngel (pH 8,8, 12 % Acrylamid) liefen, erfolgte eine Fokussierung im weitporigen Sammelgel (pH 6,8, 4 % Acrylamid). Der physiologische pH-Wert im Sammelgel führt zum Aufbau eines Spannungsgradienten zwischen negativ geladenen Chlorid-Ionen und zwitterionischen Glyzin, der die Proteine so beschleunigt, dass sie sich in einer eng begrenzten Zone befinden und in etwa zur gleichen Zeit in das Trenngel einzutreten. Die eingesetzten Gele waren 1,5 mm stark. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes wurde als Massenstandard 10 μ l des PageRuler™ Prestained Protein Ladder [Fermentas] Markers eingesetzt.

Die Trennung erfolgte vertikal bei einer Stromstärke von 30 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel in der Gelapparatur Hoefer SE 250. Die Gele wurden nach der SDS-PAGE 30 min bei Raumtemperatur in Coomassie-Blau Färbelösung geschwenkt und anschließend mehrere Stunden in Entfärbelösung geschwenkt. Zur Dokumentation wurden die Gele mit dem Gel Doc 2000 [BioRad] fotografiert und mit Dry Easy™ Minicellophan [Invitrogen] konserviert. Beim Western Blot wurden die Gele erst nach dem Blotting mit *Coomassie* gefärbt, um zu überprüfen wie viel Protein im Gel verblieben war.

2.2.3.4 Trichloressigsäure-Fällung

Die Fällung von Proteinen aus einer Lösung mittels Trichloressigsäure (TCA) ermöglicht eine Erhöhung der Proteinkonzentration sowie die Entfernung von Kontaminanten aus der Lösung, die den analytischen Lauf während einer SDS-PAGE stören könnten. Es handelt sich hierbei um eine irreversible, sehr effiziente Fällung bei der das Protein denaturiert wird und dient damit vor allem analytischen aber auch präparativen Zwecken. Um eine TCA-Fällung durchzuführen, wurde der Proteinlösung TCA bis zu einer Endkonzentration von 10 % zugegeben. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis und eine Pelletierung des Proteins durch Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 15 min. Das Proteinpellet wurde in PBS „ohne“ oder in entsprechendem Puffer für eine Affinitätschromatographie gelöst.

2.2.3.5 ECL-Entwicklung

Um die Ergebnisse eines Western Blots zu visualisieren, wurde eine quantitative luminometrische Detektion unter Verwendung des ECL™ Western Blotting Detection Kit der Firma Amersham durchgeführt wobei ECL für *enhanced chemiluminescence*, bzw. verstärkte Chemolumineszenz steht. Bei dieser Methode wird Luminol (5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophtalazin-1,4-dion) mit Wasserstoffperoxid durch eine Peroxidase oxidiert. Das oxidierte Produkt befindet sich zunächst in einem angeregten Zustand und fällt dann unter Lichtemission in den Grundzustand zurück, was mit einem lichtempfindlichen Film detektiert werden kann.

Bei einer ECL-Entwicklung nach einem Western Blot wurde wie folgt verfahren: Die beiden Reagenzien des Kits wurden 1:1 gemischt und vorsichtig auf die zu untersuchende Membran pipettiert. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran dann in eine Photokassette [Kodak] gelegt. In der Dunkelkammer wurde anschließend ein Photofilm [Pierce] auf die Membran gelegt um das chemilumiszierende Signal festzuhalten. Die Belichtungszeit richtete sich nach der Stärke des Signals und die Entwicklung des Films erfolgte in der Entwicklungsmaschine Curix 60 von Agfa. Der entwickelte Film wurde schließlich mittels des Gel Doc 2000 [BioRad] digitalisiert.

2.2.3.6 DAB-Färbung

Eine weitere Möglichkeit zur Visualisierung von Proteinbanden auf einer Membran nach einem Western Blot ist die DAB-Färbung: diese Färbung beruht auf der durch eine Peroxidase katalysierte Umsetzung des chromogenen Substrats DAB (Diaminobenzidin) mit Wasserstoffperoxid in ein farbiges Produkt. Die Substratlösung bestand aus 25 mM Tris-HCl Lösung und einer Spatelspitze DAB die anschließend lichtdicht mit Alufolie verschlossen auf einem Magnetrührer gelöst wurde. Die zu untersuchende Membran wurde dann in der Substratlösung unter Zugabe von 100 µl Wasserstoffperoxid geschwenkt bis deutlich farbige Banden erschienen. Um die Reaktion abzustoppen wurde die Membran in ddH₂O überführt und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die Digitalisierung des Ergebnisses erfolgte am Gel Doc 2000 [BioRad].

2.2.3.7 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC)

Während der Klonierung wurden die rekombinanten Proteine mit einem N-terminalen 6xHis-Tag versehen, welcher eine Aufreinigung des zu exprimierenden Proteins über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie ermöglichte. Hierbei beruht die Wechselwirkung auf der Chelatisierung von immobilisierten Nickel-Ionen der Matrix [Pro Bond™ Resin, Invitrogen] durch die Imidazolgruppen der Histidine. Durch Zugabe einer Lösung mit hoher H⁺-Ionenkonzentration erfolgt die kompetitive Verdrängung bzw. Elution des Zielproteins von der Matrix. Aufgrund der unlöslichen Eigenschaften des Zielproteins wurde unter denaturierenden Bedingungen unter der Verwendung von 8 M Harnstoff gearbeitet. Es wurde nach folgendem Protokoll verfahren: eine mit YPM induzierte Kultur des transfizierten Klonen wurde mittels Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min geerntet. Der Überstand wurde für Western Blot Analysen mit TCA gefällt, das Zellpellet in 1 ml Bindepuffer B + 0,3 % SDS pro Gramm Zellgewicht resuspendiert und über Nacht schüttelnd inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 min, um die Zelltrümmer von den gelösten Proteinen zu entfernen. Bevor das Lysat auf die Säule gegeben wurde, wurde sie mit 5-fachem Säulenvolumen Bindepuffer B equilibriert. Nach dem Beladen der Säule folgten drei Waschschritte mit je 5-fachem Säulenvolumen Waschpuffer C, wodurch unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix entfernt wurden. Eluiert wurde mit dem Elutionspuffer D, der aufgrund des niedrigen pH-Wertes bzw. der hohen H⁺-Ionenkonzentration das Protein von der Matrix löste. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt und mit einem Bradford oder PIERCE-Assay die Proteinkonzentrationen bestimmt. Zusätzlich wurden der Durchlauf des Proteins sowie die Waschfraktionen gesammelt.

Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Elutionsfraktionen mittels Western Blot analysiert und im Falle eines positiven Ergebnisses, 48 h lang gegen 5 l PBS „ohne“ bei 4 °C und mit mehrfachem Pufferwechsel in einem Schlauch mit einem MWCO von 12-14 kDa [SERVA] dialysiert.

2.2.3.8 Regeneration der Ni-NTA-Säule

Die Ni-NTA Matrix kann, nach dreimaligem Gebrauch, regeneriert werden. Hierfür wurde die Säule zunächst mit 6-fachem Säulenvolumen einer 0,5 M EDTA-Lösung gewaschen. Darauf folgten zwei weitere Waschschrte, einer mit 5-fachem Säulenvolumen einer 0,5 M NaOH-Lösung und einer mit 5-fachem Säulenvolumen ddH₂O. Die Regeneration der Säule erfolgte durch Beladen mit 5-fachem Säulenvolumen einer NiCl₂-hexahydrate-Lösung. Nach einem weiterem Waschschrte mit 5-fachen Säulenvolumen ddH₂O, wurde die Säule mit 20 % Ethanol bedeckt und konnte so längerfristig bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.2.3.9 Kalte Aceton/Methanol Fällung

Eine Möglichkeit, um Proteine aufzukonzentrieren und Aceton- bzw. Methanol-lösliche Interferenzen wie SDS zu entfernen, ist die kalte Aceton/Methanol-Fällung. Das zu fällende Protein wurde mit vier Volumen Präzipitations-Reagenz versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das Gemisch wurde dann bei 4 °C für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Proteinpellet luftgetrocknet und schließlich in PBS „ohne“ resuspendiert.

2.2.3.10 Analyse N-glykosylierter Proteine

Um die N-Glykosylierungen während post-translationalen Modifikationen in einem eukaryotischen Organismus zu untersuchen, wurde die so genannte Peptid-N-Glycosidase F (PNGase F) verwendet. Es handelt sich hierbei um ein Enzym, welches spezifisch Asparagin-gebundene Glykanketten abspalten kann. Für die Untersuchung wurde zunächst ca. 20 µg des zu untersuchenden Proteins mit 0,1 % (v/v) Denaturierungspuffer versetzt und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Anschließend wurden jeweils 1/10 Volumen des Reaktionspuffers G7 und 10%iges NP-40 (*Nonidet P40*) sowie 5 µl der PNGase F dazu gegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der Reaktion erfolgte im Anschluß mittels Western Blot und SDS-PAGE.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Analyse am Durchflusszytometer

Um die Induktion regulatorischer T-Zellen in humanen PBMCs durch 24-stündige Inkubation mit retroviralen Proteinen nachzuweisen erfolgte eine Analyse der Lymphozytenpopulation Zusammensetzung mittels Durchflusszytometrie.

Bei der Durchflusszytometrie am FACS-Gerät (*fluorescence activated cell sorter*) handelt es sich um ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage hierfür ist die Antigen-Antikörper-Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern an spezifische Zelloberflächenmoleküle (z.B. CD = *cluster of*

differentiation) bzw. Proteinen innerhalb der Zellen. Während einer Messung werden die fluoreszenzmarkierten Zellen durch hydrodynamische Fokussierung einzeln hintereinander an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung durch den monochromatischen Laserstrahl werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau gehoben und fallen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Detektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern bzw. markierten Zellen. Zusätzlich können über die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns, etc.) der Zellen gewonnen werden. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

Die zu untersuchende Lymphozytenpopulation wurde mit Anti-CD4-APC, Anti-CD25-PE und Anti-Foxp3-FITC Antikörpern markiert; zusätzlich erfolgte eine Markierung von unbehandelten PBMCs mit Anti-CD8-APC, Anti-CD8-PE und Anti-CD3-FITC um die entsprechenden Kanäle des FACS-Gerätes einzustellen. Die Markierung von FoxP3 erforderte zusätzlich die Permeabilisierung der Zellmembran, da es sich um ein intrazelluläres Protein handelt.

Zunächst erfolgte jedoch stets eine extrazelluläre Färbung nach folgendem Protokoll: die zu untersuchenden PBMCs wurden mit einer Mehrkanalpipette aus 96-well Platten geerntet und in Eppendorf Tubes überführt. Um die Zellen zu waschen und Mediumreste zu entfernen wurden sie für 5 min bei 250 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 800 µl PBS „ohne“ resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 250 g für 5 min erfolgte eine Resuspendierung in 100 µl PBS „ohne“ und die Färbung der Zellen durch Zugabe von 10 µl der entsprechenden Antikörper. Nach einer lichtgeschützten Inkubation von 30 min bei RT unter leichtem Schütteln, wurden die Zellen nochmals mit 800 µl PBS „ohne“ gewaschen und anschließend in 250 µl 2%igem Formaldehyd in PBS „ohne“ fixiert. In dieser Form konnten die Zellen bei 4 °C und lichtgeschützt bis zu 24 h vor einer FACS-Messung gelagert werden. Sollte eine zusätzliche intrazelluläre Färbung erfolgen, so wurden die Zellen für eine halbe Stunde im Dunkeln bei 4 °C fixiert und anschließend weiter behandelt: nach der Fixierung wurde 750 µl Puffer W zu den Zellen gegeben. Um die Zellen zu permeabilisieren wurden sie für 5 min bei 250g zentrifugiert, in 750 µl Puffer P resuspendiert und für 15 min bei 37 °C im Wasserbad lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurde erneut 750 µl Puffer W zugegeben und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Zur intrazellulären Färbung wurden die Zellen in 100 µl Puffer W resuspendiert und unter Zugabe von 10 µl der entsprechenden Antikörper markiert. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen noch zweimal mit jeweils 800 µl Puffer P gewaschen und schließlich in 250 µl Puffer W resuspendiert. In dieser Form konnten sie ebenfalls bis zu 24 h bei 4 °C lichtgeschützt gelagert werden.

2.2.4.2 Western Blot

Ein Western Blot dient der sensitiven Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. In dieser Arbeit wurde er zum Beispiel zum Nachweis spezifischer transmembraner Hüllproteine verwendet. Dieser Nachweis beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung durch eine SDS-PAGE, anschließender Übertragung auf eine Membran und Detektion mittels kommerzieller Antikörper bzw. spezifischer Seren. Die Übertragung auf die Membran erfolgt aufgrund des Anlegens eines elektrischen Feldes während des Blottens, die negativ geladenen Proteine wandern in Richtung der Anode und werden auf der Membran fixiert. Da die spezifischen Antikörper, die an das zu detektierende Protein binden, mit einer Peroxidase konjugiert sind, lassen sich die Proteine mittels ECL-Detektion oder einer DAB-Färbung visualisieren.

Im Anschluss an eine Auftrennung des zu untersuchenden Proteingemisches nach einer SDS-PAGE wurde so verfahren: zunächst erfolgte eine Äquilibrierung des Trenngels der SDS-PAGE durch 10-minütiges Schwenken des Gels in Transferpuffer. Währenddessen wurde eine *Immobilon™ Transfer Membrane* [Millepore] der Porengröße 0,2 µm exakt auf die Größe des Trenngels zugeschnitten, in Methanol aktiviert und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Zum Schutz des Gels und der Membran wurden sie zum Blotten zwischen 2 Lagen in Transferpuffer durchtränkte Blotpapiere gelegt. Dieses so genannte Blot-Sandwich wurde dann in eine Semi-Dry-Blotkammer [BioRad] gelegt und bei 25 V für 30 min geblottet. Im Anschluss an das Blotten wurde die Membran in Blockierungspuffer überführt und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur darin geschwenkt, um freie Bindungsstellen der Membran mit Protein zu sättigen. Die darauf folgende Inkubation mit dem in Blockierungspuffer verdünnten Primärantikörper erfolgte entweder über Nacht bei 4 °C oder bei Raumtemperatur für 2 h. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in Waschpuffer geschwenkt. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls mit Blockierungspuffer verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte eingeschweißt in Plastikfolien unter steter Rotation, so dass die Membran sorgfältig mit den Antikörpern benetzt wurde. Nach der Sekundärinkubation wurde die Membran wieder dreimal für jeweils 10 min in Waschpuffer geschwenkt und konnte schließlich mittels ECL-Detektion oder DAB-Färbung untersucht werden.

2.2.4.3 IL-10-Zytokin ELISA

Um die IL-10 Zytokin Ausschüttung in Zellkulturüberständen von humanen PBMCs nach 24-stündiger Inkubation mit retroviralen Proteinen zu untersuchen wurde das OptEIA™ Human IL-10 Set von BD Biosciences verwendet. Es wurde nach dem Hersteller-Protokoll verfahren und zum Erstellen einer Kalibriergeraden rekombinantes humanes IL-10 in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Jede Probe wurde im dreifachen Ansatz untersucht. Das Ergebnis konnte aufgrund eines Farbumschlags photometrisch bei 450 nm ermittelt und die Zytokin-Ausschüttung anhand der Kalibriergeraden bestimmt werden.

2.2.4.4 Zytokin-Array

Um einen Überblick über die Zytokinmodulation durch retrovirale Proteine zu untersuchen, wurde der RayBio® Human Cytokine Array VI [Ray Biotech, Inc.] verwendet. Ein Zytokin-Array beruht auf demselben Prinzip wie das von einem *capture* ELISA, jedoch ermöglicht der Array die simultane Bestimmung von bis zu 60 verschiedenen Zytokinen im Zellüberstand. Es wurde stets nach dem Hersteller-Protokoll verfahren. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Detektion.

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n
1	POS	POS	POS	POS	Blank	Angiogenin	BDNF	BLC	BMP-4	BMP-6	CK β 8-1	CNTF	EGF	Eotaxin
2	NEG	NEG	NEG	NEG	Blank	Angiogenin	BDNF	BLC	BMP-4	BMP-6	CK β 8-1	CNTF	EGF	Eotaxin
3	Eotaxin-2	Eotaxin-3	FGF-6	FGF-7	Fit-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM-CSF	I-309	IFN-γ	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
4	Eotaxin-2	Eotaxin-3	FGF-6	FGF-7	Fit-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM-CSF	I-309	IFN-γ	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
5	IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1α	IL-1β	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
6	IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1α	IL-1β	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
7	Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1α	MIP-3α	NAP-2	NT-3	PARC
8	Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1α	MIP-3α	NAP-2	NT-3	PARC
9	PDGF-BB	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1	TGF-β3	TNF-α	TNF-β	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
10	PDGF-BB	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1	TGF-β3	TNF-α	TNF-β	Blank	Blank	Blank	POS	POS

Abb. 2. 2 Übersicht der Zytokine vom RayBio® Cytokine Array VI

Pos=Positivkontrolle, Neg=Negativkontrolle, BDNF=*brain-derived neurotrophic factor*, BLC=*B lymphocyte chemoattractant*, BMP=*bone morphogenetic protein*, ckβ=*beta-chemokine*, CNTF=*ciliary neurotrophic factor*, EGF=*epidermal growth factor*, FGF=*fibroblast growthfactor*, GCP=*granulocyte chemotactic protein*, GDNF=*glial derived neurotrophic factor*, GM-CSF=*granulocyte macrophage colony stimulating factor*, IFN=*interferon*, IGFBP=*insulin-like growth factor binding protein*, IGF=*insulin-like growth factor*, IL=*interleukin*, MCP=*monocyte chemoattractant protein*, M-CSF=*macrophage colony-stimulating factor*, MDC=*macrophage-derived chemokine*, MIG=*monokine induced by interferon gamma*, MIP=*macrophage inflammatory protein*, NAP=*neutrophil activating protein*, NT=*neurotrophin*, PARC=*pulmonary and activation-regulated chemokine*, PDGF-BB=*platelet derived growth factor-BB*, RANTES=*regulated on activation, normal T expressed and secreted*, SCF=*stem cell factor*, SDF=*stromal cell derived factor*, TARC=*thymus activation regulated chemokine*, TGF=*transforming growth factor*, TNF=*tumor necrosis factor*

2.2.4.5 Lymphozyten Proliferationsassays

Alamar Blue Assay

Bei Alamar Blue [Biosource International Inc.] handelt es sich um einen Redoxindikator, der in seiner oxidierten Form als blauer, nichtfluoreszierender und in seiner reduzierten Form als roter fluoreszierender Farbstoff vorliegt [Ahmed et al. 1994]. Durch die metabolische Aktivität vitaler Zellen kommt es zur Reduktion des Farbstoffes, welche sich photometrisch bestimmen lässt: in seiner oxidierten Form hat der Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 600 nm und in seiner reduzierten Form bei 570 nm. Die Proliferation kann also durch Messen bei 570 nm ermittelt werden, da es jedoch zu Überlappungen bei beiden Wellenlängen kommt, empfiehlt es sich, um den Hintergrund zu entfernen, die ΔWerte der beiden Wellenlängen zu bilden. Die resultierende spezifische Absorption reflektiert spezifisch das Maß an Proliferation.

Mit Hilfe diesen Assays sollte die hemmende Wirkung retroviraler Proteine auf die Proliferation muriner Milzzellen untersucht werden. Dafür wurden zunächst je 100 µl einer Zellsuspension mit einer Konzentration von $3,25 \times 10^6$ Zellen/ml pro Well einer 96-Well Platte gegeben. Dazu wurden 50 µl des Mitogens Concanavalin A (Con A, Serva) mit einer Stockkonzentration von 2µg/ml und verschiedenen Konzentrationen des TM-Proteins bzw. Konjugats oder Virus pipettiert. Als Positivkontrolle wurden 100 µl Zellsuspension mit 50 µl Medium anstatt mit einer

Probe versehen, als unstimulierte Negativkontrolle dienten 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Medium. Von jeder Probe und Kontrolle erfolgte ein dreifacher Ansatz. Nach einer Inkubation für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung wurden 20 µl des Alamar Blue Farbstoffes zu jedem Well hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubation unter denselben Bedingungen konnte die Proliferation im ELISA *Reader Spectra Classic* [Tecan] durch Messungen bei 560 nm und 620 nm untersucht werden.

[3H]Thymidin Inkorporations-Assay

Eine andere Möglichkeit, die proliferationshemmende Wirkung retroviraler Proteine zu untersuchen ist der [3H]Thymidin Inkorporations-Assay, bei dem die infolge der Zellaktivierung neu synthetisierte DNS als Maß für die Proliferation herangezogen wird. Eine Quantifizierung erfolgt über die Messung des Einbaus des radioaktiv markierten Basenanalogs [3H]Thymidin.

Für diesen Assay wurden analog zum Alamar Blue Assay pro Well einer 96-Well Platte 100 µl Zellsuspension mit einer Konzentration von $3,25 \times 10^6$ Zellen/ml mit 50 µl Virus oder Konjugat [100 µg/ml] und 50 µl ConA mit einer Stockkonzentration von 2 µg/ml versehen. Die Positiv- und Negativkontrollen entsprachen den Kontrollen beim Alamar Assay. Nach einer Inkubation der Platten für 40 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung wurden die Zellen mit 20 µl radioaktiv markiertem Medium gepulst und nach einer weiteren, 24 stündigen Inkubation im Micro Beta Trilux *Luminescence Counter* [PerkinElmer *precisely*] analysiert.

2.2.5 Zellkulturtechniken

2.2.5.1 Kultivierung und Passagierung

FEA-Zellen

Bei den FEA-Zellen (Feline Embryonale Fibroblasten) handelt es sich um eine adhärent wachsende, aus embryonalen Zellen der Katze generierte stabile Zelllinie. Die Kultivierung erfolgte in T175 Zellkulturflaschen [TPP] und in supplimentierten *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) bis die Zellen konfluent waren. Die fortwährende Kultivierung erforderte Passagierung bzw. Splitten der Zellen alle drei bzw. vier Tage: dazu wurde das Medium vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und die Zellen in 10 ml PBS „ohne“ gewaschen. Nach Verwerfen des PBS „ohne“ wurden die Zellen mit Hilfe eines sterilen Zellschabers von der Zellkulturflaschen-Oberfläche gelöst und in 12 ml DMEM resuspendiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Zellsuspension mit der Pipette erfolgte eine Vereinzelung der Zellen, durch die eine darauf folgende gleichmäßige Verteilung (1:6) auf mehrere Zellkulturflaschen gewährleistet war. Abschließend erfolgte eine Zugabe an DMEM in adäquater Menge. Die FEA-Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung kultiviert.

293-Zellen

Auch die 293-Zellen [ATCC, USA, ECACC Nr.: 85100602], bei denen es sich um eine humane Nierenzellenlinie handelt, wachsen adhärent und werden in DMEM kultiviert. Sie waren durch das humane Adenovirus 5 (HAdV 5) transformiert und immortalisiert worden.

Wie bei den FEA-Zellen erfolgte eine Kultivierung bis zur Konfluenz mit anschließender Passagierung alle drei bzw. vier Tage. Dazu wurde zunächst das Medium vorsichtig abgenommen. Mit 12 ml frischem Medium konnten die Zellen dann mit Hilfe einer Pipette vom Zellkulturflaschenboden runter gewaschen werden. Eine Vereinzelnung der Zellen wurde ebenfalls durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Zellsuspension mittels Pipette erreicht. Nach dem Splitten der Zellsuspension 1:6 erfolgte eine Zugabe von frischem DMEM in adäquater Menge. Die 293-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung kultiviert.

2.2.5.2 Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µl-Aliquots der Zellsuspensionen entnommen und 1:1 mit 0,4%-igem Trypanblau [Sigma-Aldrich] vermischt. Das Gemisch wurde in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert in der in vier geeichten Feldern die Zellen ausgezählt wurden. Trypanblau ist ein negativ geladenes Chromophor, welches unspezifisch mit Proteinen interagiert. Es dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol, reagiert dort mit den intrazellulären Proteinen und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell wodurch eine Unterscheidung zwischen Lebend- und Gesamtzellzahl möglich ist. Die Quersumme der Zellzahlen wird mit den Kammerfaktoren verrechnet, so dass sich die Zellkonzentration nach folgender Formel berechnen lässt:

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

[Z=Dichte der Zellen pro Volumen, N=Quersumme der Zellzahlen, 2=Verdünnungsfaktor Trypanblau, 10⁴= Faktor der Neubauerkammer]

Wurde dieser Wert mit dem Gesamtvolumen der vorhandenen Zellsuspension multipliziert, erhielt man die absolute Zellzahl. Zur Vitalitätsbestimmung wurde die Lebendzellzahl auf die Gesamtzellzahl bezogen.

2.2.5.3 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung ermöglicht das stabile Konservieren von Zellen über mehrere Jahre hinweg.

Als Einfriermedium für die Kryokonservierung dient hitzeinaktiviertes FKS mit 10 % steril filtriertem Dimethylsulfoxid (DMSO), welches durch Herabsetzen des Gefrierpunktes intrazelluläre Eiskristallbildung verhindert. Da es jedoch bei Raumtemperatur toxisch auf die Zellen wirkt, musste das Einfriermedium vorgekühlt sein und während der Zellenpräparation zügig gearbeitet werden. Die Zellen wurden zunächst mit PBS „ohne“ gewaschen und die Lebendzellzahl bestimmt. Um für die Kryokonservierung eine Konzentration von 1 x 10⁷ Zellen/ml zu erhalten, wurden die Zellen bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert und in entsprechendes Volumen Einfriermedium resuspendiert. Jeweils 1 ml von der Zellsuspension wurde dann in ein beschriftetes Kryoröhrchen überführt. Um eine Temperaturabsenkung von ca. 1 °C pro min zu

gewährleisten erfolgte zunächst eine 20-minütige Aufbewahrung der Zellen in einer Polystyrolbox bei 4 °C. Danach wurden sie über Nacht in -80 °C umgesetzt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.5.4 Auftauen

Um das bei Raumtemperatur toxisch wirkende DMSO im Einfriermedium schnell zu verdünnen, wurden für das Auftauen von Kryokonserven große Zentrifugen-Röhrchen mit 50 ml Kultivierungsmedium präpariert und im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt. Erst dann wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff geholt und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Sobald die Zellen vollständig aufgetaut waren, wurden sie sofort in das vorbereitete Medium pipettiert. Nach dem anschließenden Waschschrift durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min und Resuspension in Medium wurden sie in entsprechenden Konzentrationen in Zellkulturflaschen unter Zugabe von frischem Medium pipettiert. Die Anzucht nach einer Kryokonservierung erfolgte zunächst in T25 Zellkulturflaschen [TPP] mit 20 ml Medium. Nach mehreren Tagen Kultivierung konnten sie auf ein größeres Volumen gesplittet werden.

2.2.5.5 Isolierung humaner PBMCs

Aus frisch abgenommenem Blut lassen sich mittels Dichtegradienten-Zentrifugation unter Verwendung von Lymphozytenseparationsmedium (*Ficoll-Isopaque*, PAA Laboratories) die mononukleären Zellen des peripheren Blutes isolieren (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs). Die Lymphozyten und Monozyten sammeln sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und *Ficoll-Isopaque* an. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen.

Es wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet: in große Zentrifugen-Röhrchen mit Filterscheibe [Leucosep] wurde 15 ml *Ficoll-Isopaque* pipettiert und für 1 min bei 2200 rpm zentrifugiert. Bis zu 30 ml mit Heparin versetzten Blutes eines freiwilligen gesunden Spenders wurden vorsichtig in jeweils ein Leucosep-Röhrchen gegeben und für 15 min bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren ergab sich im Leucosep-Röhrchen eine Schichtung der Blutbestandteile; die oberste Schicht, das Blutplasma, wurde abgenommen und verworfen. Unter dem Plasma sammelten sich die Lymphozyten in einem weißen Ring an, der vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues Zentrifugen-Röhrchen überführt wurde. Das Röhrchen wurde mit 40 ml PBS „ohne“ aufgefüllt und für 10 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Das daraus resultierende Zellpellet sollte möglichst keine rötliche Färbung haben, war dies jedoch der Fall so wurde es mit 10 ml 0,86%igem Ammoniumchlorid für 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert um die restlichen Erythrozyten zu entfernen. Es folgten ein weiterer Waschschrift mit PBS „ohne“ und eine Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung. Um die Zellen auf eine gewünschte Konzentration zu bringen, wurden sie erneut mit PBS „ohne“ zentrifugiert und in entsprechendes Volumen supplimentiertes *Rosswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) Medium resuspendiert.

2.2.5.6 Aussaat der humanen PBMCs

Um die Induktion von regulatorischen T-Zellen bzw. die immunsuppressive Wirkung der retroviralen Proteinen zu untersuchen, wurden die frisch isolierten PBMCs wie folgt behandelt: nach der Isolation wurden sie auf eine Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml gebracht. Von dieser Zellsuspension wurden 100 μ l pro Well einer 96-Well Platte [Nunc] pipettiert. Für die Negativkontrollen wurden 100 μ l und für die zu untersuchenden Proben 50 μ l RPMI 1640 hinzugegeben. Schließlich erfolgte eine Zugabe bei den Positivkontrollen von jeweils 50 μ l Virus, TM-Protein oder Konjugat mit einer Stock-Konzentration von je 100 μ g/ml. Um die immunsuppressiven Effekte dosisabhängig zu untersuchen, wurden die Viren bzw. Proteine oder Konjugate entsprechend vorher mit RPMI 1640 ausverdünnt. Für die Real-Time PCR wurden jeweils 3 gleiche Wells und für die FACS-Messungen jeweils 2 gleiche Wells ausgesät.

2.2.5.7 Präparation von murinen Milzzellen

Für die Proliferationsversuche wurden Milzzellen aus Balb/c Mäusen verwendet und wie folgt präpariert: die Tötung der Mäuse mittels Zervikaldislokation und die Entnahme der Milz erfolgte unter einer sterilen Arbeitsbank. Wenn mehrere Mäuse hintereinander getötet wurden, so wurden die Milzen in einer Petrischale mit PBS „ohne“ zwischengelagert. Um die Zellen aus den Milzen zu gewinnen, wurden sie anschließend durch ein Sieb in eine mit RPMI 1640 gefüllte Petrischale gedrückt. Es folgten zwei Waschschriffe im Zentrifugen-Röhrchen durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min und Waschen mit je 50 ml vorgewärmtem RPMI 1640. Anders als bei den humanen PBMCs sollten die Milzzellen nicht frisch verarbeitet, sondern zunächst kryokonserviert werden, um einen möglichst großen Zellpool zu erhalten. Um eine distinkte Zellzahlkonzentration in der Einfriersuspension zu bekommen, wurde die Lebendzellzahl bestimmt, die Zellen für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und in entsprechendes Volumen Einfriermedium resuspendiert.

Bei der Vorbereitung für die entsprechenden Versuche mit den Zellen, wurden die Zellen nach dem Auftauen 20 min lang mit 10 ml 0,86%igem Ammoniumchlorid bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

2.2.6 Virologische Techniken

2.2.6.1 Viruszucht

Die Viren für die entsprechenden Assays wurden durch Infizieren distinkter permissiver Zelllinien, die die Viren im Überstand produzierten, gewonnen. Porzines endogenes Retrovirus (PERV) und Koala Retrovirus (KoRV) wurden mit 293-Zellen und felines Leukämievirus (FeLV) mit FEA-Zellen gezüchtet. Dazu wurden jeweils uninfizierte frisch gesplittete Zellen mit kryokonservierten und aufgetauten Virusstocks infiziert und in entsprechenden Kulturflaschen [TPP] kultiviert. Die Kultivierung bzw. das Splitten der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben. Nach dem ersten Splitten, wurden von jeder Kultur etwa 500 μ l Zellen abgenommen und mittels Lyse und virusspezifischer Real-Time PCR die Provirusintegration bzw. eine erfolgreiche Infektion nachgewiesen. Die Kulturüberstände wurden daraufhin bei jedem Splitten in Zentrifugen-Röhrchen gesammelt und für 20 min bei 4000 rpm und 4 °C

zentrifugiert, um eventuell vorhandene Zellen bzw. Zelltrümmer zu entfernen. Die Überstände wurden dann in PP-Flaschen [Kautex Tetron] vereint und bei -80 °C bis zur Aufreinigung gelagert.

2.2.6.2 Lyse

Vor einer virusspezifischen Real-Time PCR zum Provirusintegrations-Nachweis musste die DNS der zu untersuchenden Zellen durch Lyse zugänglich gemacht werden. Die Lyse der Zellen basierte auf sich wiederholendem Temperaturwechsel: die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann dreimal abwechselnd bei -80 °C für 20 min eingefroren und bei 56 °C im Heizblock ThermoStat^{plus} [Eppendorf] für 15 min aufgetaut. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 200 µl Lysepuffer welcher Proteinase K enthielt, die in der darauf folgenden Inkubation von 3 h bei 56 °C im Heizblock die Proteine, welche die Real-Time PCR inhibieren könnten, verdaute. Die Inaktivierung der Proteinase K wurde durch 20-minütiges Erhitzen der Suspension auf 95 °C im Heizblock erreicht. Das Lysat konnte schließlich für eine Real-Time PCR weiter verwendet oder bei -20 °C eingefroren werden. Mit Hilfe der Lyse konnte so Template für eine PCR ohne aufwendige DNS-Isolation hergestellt werden.

2.2.6.3 Separation von Viruspartikeln

Um die Viruspartikel aus den Kulturüberständen zu gewinnen, wurde wie folgt verfahren: Die bei Raumtemperatur aufgetauten Überstände wurden für 2,5 h bei 18000 rpm und 4 °C in der Ultrazentrifuge L8-70 [Beckmann Coulter, Rotor Typ 19] pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und durch sorgfältiges Abklopfen der Zentrifugenbehälter auf Papier das Rücklaufvolumen minimiert. In diesem Rücklauf konnte sich das Proteinpellet dann über Nacht auf Eis bei 4 °C im Kühlraum wieder lösen. Am nächsten Tag wurden die Behälter mit wenig TSE-Puffer ausgespült und die Proteinpellets vereint, wobei das Endvolumen nicht mehr als 3 ml betragen sollte. Für die darauf folgende Separation über eine Saccharose-Gradient Zentrifugation, wurde ein Gradient in einem Zentrifugenröhrchen [Beckmann Coulter] mit Hilfe eines Gradientenmischers aus 4,5 ml 15 % und 4,5 ml 65 % Saccharose-Lösungen aufgebaut. Auf diesen Gradient wurde das in TSE gelöste Viruspellet gegeben und für 4 h bei 40 000 rpm und 4 °C ohne Bremse ultrazentrifugiert (Rotor SW 41). Nach der Zentrifugation wurde der Gradient in 1 ml Fraktionen gesammelt und der Brechungsindex jeder Fraktion mittels eines Refraktometers [A.Krüss Optronic] bestimmt. Dafür wurden je 10 µl einer Fraktion eingesetzt und gegen ddH₂O gemessen. Dabei galt, dass eine zelluläre Komponente nur bis zu der Stelle im Gradienten sinkt, wo die Dichte der Lösung gleich der ihrigen ist. Die Dichte von Retroviren beträgt ca. 1,16 g/ml, welche der Dichte einer 35%igen (v/v) Saccharoselösung entspricht [Coffin 1997]. Die Fraktionen, die einen Brechungsindex von ca. 35 hatten, und bei denen sich im Gradienten ein weißlicher Ring gebildet hatte, wurden mit PBS „ohne“ in einem Zentrifugenröhrchen auf 12 ml aufgefüllt und erneut für 4 h bei 40000 rpm und 4 °C pelletiert um die Saccharose zu entfernen. Das Pellet wurde schließlich in 200 µl PBS „ohne“ aufgenommen und einer Proteinbestimmung nach PIERCE unterzogen.

Alle Arbeiten zur Präparation der Virus-Partikel erfolgten in einem Sicherheitslabor der Stufe 2 und unter einer sterilen Arbeitsbank, um die Infektionsgefahr zu minimieren.

3. Ergebnisse

3.1 Gewinnung und Charakterisierung retroviraler Proteine

Für die Untersuchung der Treg-Induktion durch retrovirale transmembrane Hüllproteine bzw. durch die ISU (immunsuppressive)-Domäne, mussten diese zunächst synthetisiert, aufgereinigt und charakterisiert werden. Um retroviral bedingte immunsuppressive Wirkmechanismen während einer Infektion besser verstehen zu können, sollten inaktivierte Präparationen von PERV, KoRV und FeLV hergestellt werden und anschließend untersucht werden, ob sie immunmodulatorisch durch die Induktion von Tregs wirken. Da bei diesen Gammaretroviren die ISU-Domäne innerhalb der TM-Sequenz hochkonserviert ist, könnten so erste Rückschlüsse auf den Einfluß dieser Domäne gezogen werden. Erstmals sollte das TM-Protein von HERV-K rekombinant hergestellt werden, um Effekte auf die retroviralen TM-Proteine einzugrenzen und um Relationen zwischen einer eventuell endogenen, retroviralbedingten Treg-Induktion und der malignen Tumorbildung zu untersuchen. Schließlich sollte untersucht werden, ob die hochkonservierte ISU-Domäne immunsuppressiv aufgrund der Induktion von regulatorischen T-Zellen wirkt. Um zu untersuchen, ob sie eine Rolle bei der Immunpathogenese von AIDS spielt, sollte die ISU-Domäne des gp41 von HIV mittels Kopplung von gp41 ISU-Monomeren zu Polymeren möglichst konformationsnativ und somit biologisch aktiv hergestellt werden. Die Charakterisierung der synthetisierten Proteine erfolgte per SDS-PAGE und Western Blot.

3.1.1 Gewinnung und Charakterisierung der Retroviruspräparationen

Es wurden Präparationen der Gammaretroviren PERV, KoRV und FeLV hergestellt, um den Wirkmechanismus der Immunpathogenese retroviraler Infektionen besser verstehen zu können. Vor dem Sammeln der Kulturüberstände für die Aufreinigung wurde mittels Sonden Real-Time PCR die Provirusintegration der infizierten Zellen untersucht (Abb. 3.1). Als Positivkontrolle dienten infizierte Zellen, als Negativkontrolle ein Primerpaar mit Sonde die spezifisch für ein anderes Retrovirus waren (N1), oder Zellen, die mit einem anderen Retrovirus infiziert waren (N2), bzw. nukleasefreies Wasser (N3).

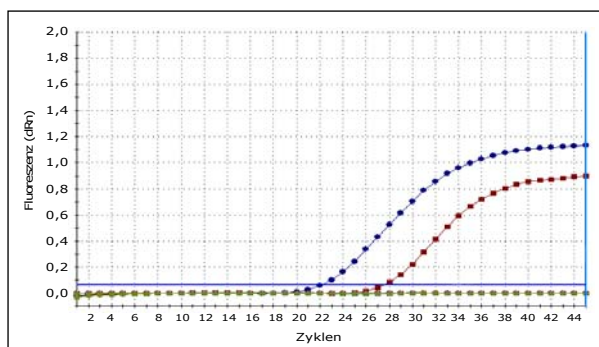


Abb. 3. 1 Real-Time PCR Amplifikationskurven zum Nachweis der Provirusintegration

Blau=Infizierte Zellen, Rot=Positivkontrolle, Grün=Negativkontrolle N1, Grau=Negativkontrolle N2, Beige=Negativkontrolle N3

Anhand der Amplifikationskurven der infizierten Zellen und der Positivkontrolle, die, im Vergleich zu den Negativkontrollen den Treshold bei adäquaten Ct-Werten erreichen, konnte die Provirusintegration nachgewiesen werden. Daraufhin wurden die Zellen über mehrere Wochen kultiviert, bis ausreichend Kulturüberstand für die Separation mittels Saccharose-Gradienten vorhanden war. Im Gradienten bandete PERV bei einem Saccharose-Index von ca. 33-35, was einer Dichte von 1,16 g/ml entsprach, bei den FeLV- und KoRV-Präparationen hingegen war im

Gradienten keine Virusbande sichtbar, weshalb diese Präparationen verworfen und nicht für weitere Untersuchungen verwendet wurden. Um die PERV-Präparation zu überprüfen, wurden im Anschluss die einzelnen Fraktionen des Gradienten per SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abb 3.2).

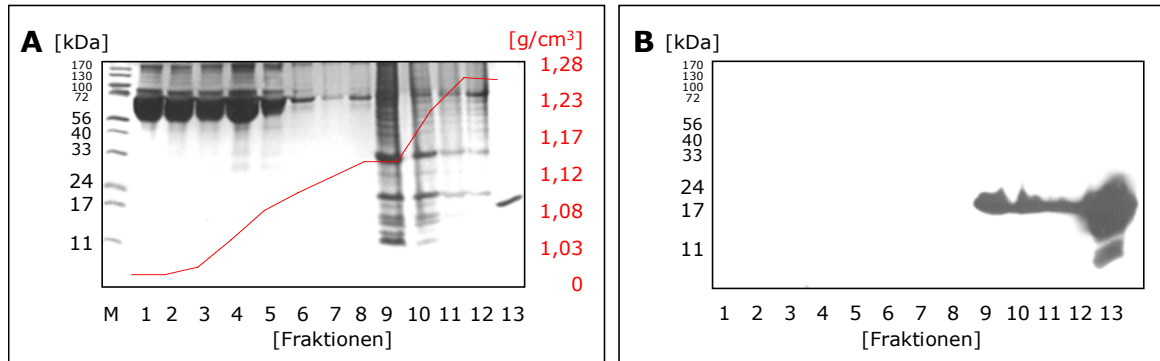


Abb. 3. 2 Darstellung der Saccharose-Gradienten Fraktionen von PERV in der SDS-PAGE (A) und im Western Blot (B)

A) Coomassie-Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel; der Verlauf des Dichtegradienten ist rot markiert
 B) Western Blot Membran mit ECL-Detektion; pAK=Ziege 20 (1:1000), sAK=Anti-Ziege (1:3000)
 M=Page-Ruler™ Prestained Protein Ladder, 1-12=Fraktionen im Saccharose-Gradient, 13=rekombinantes PERV-p15E aus *E. coli*

Bei den 65 kDa Banden, die in den Spuren 2-7 bzw. den Saccharose-Fraktionen 1-6 am deutlichsten ausgeprägt waren, handelte es sich um BSA aus dem Kultivierungsmedium (Abb. 3.2-A). Ab Fraktion 9, die eine Dichte von ca. 1,16 g/ml hatte, konnte ein Bandenmuster detektiert werden. Bei der oberen ausgeprägten Bande handelte es sich vermutlich um das virale Gag-Strukturprotein p27, bei den unteren Banden um die Gag-Proteine p9 bzw. p7. Bei der ebenso ausgeprägten Bande in der Höhe von ca. 17 kDa handelte es sich nicht nur um das p15E sondern möglicherweise auch um α -Hämoglobin aus dem Serum [Denner et al. 2002]. Da das transmembrane p15E nur einen geringen Anteil der viralen Proteine ausmachte, erfolgte die Detektion im Western Blot mittels Serum einer Ziege, die mit bakteriell hergestelltem rekombinanten p15E von PERV immunisiert worden war (Abb. 3.2-B). Entsprechend wurde das rekombinante PERV-p15E als Positivkontrolle für den Western Blot eingesetzt. Anhand des SDS-Gels und der Blot-Membran konnte man sehen, dass die Aufreinigung erfolgreich und die PERV-Präparation für weitere Untersuchungen geeignet war. Durch die Lagerung bei -20 °C und mehrmaligem Auftauen wurde die Virus-Präparation im Anschluss inaktiviert.

3.1.2 Gewinnung und Charakterisierung des rekombinanten transmembranen Hüllproteins des humanen endogenen Retrovirus-K (HERV-K TM)

Um ein transmembranes Hüllprotein in möglichst reiner Form zu erhalten und auf die Treg-Induktion zu untersuchen, wurde das TM-Protein von HERV-K rekombinant hergestellt. Da Lipopolysaccharide (LPS) zytokinmodulatorische Effekte haben, sollte ein endotoxinfreies eukaryotisches Expressionssystem (*H. polymorpha*) für die Herstellung etabliert werden. Die die ISU-Domäne einschließende Ektodomäne des HERV-K TM-Proteins wurde in den Hefevektor pFPMT121-MFa-His₆-TCS kloniert und anschließend die Hefe transformiert. Das in der Hefe

exprimierte Protein wurde über Affinitätschromatographie aufgereinigt, im Western Blot bzw. SDS-PAGE charakterisiert und schließlich für die Untersuchung der Treg-Induktion eingesetzt.

3.1.2.1 Klonierung von HERV-K TM in den Expressionsvektor pFPMT121-MFa-His₆-TCS

Mittels PCR erfolgte eine Amplifikation der HERV-K TM-Sequenz aus der Plasmid-DNS pCK30 und parallel dazu die Restriktion des pFPMT121-MFa-His₆-TCS-Vektors mit *Not* I und *Bgl* II. Das Amplifikat und der Vektor wurden im Agarosegel untersucht, die entsprechenden Banden (HERV-K TM=480 bp, pFPMT121-MFa-His₆-TCS= 6954bp) wurden aus dem Gel geschnitten und aufgereinigt. Das HERV-K TM-Insert wurde daraufhin ebenfalls mit *Not* I und *Bgl* II geschnitten und der Vektor mit SAP dephosphoryliert. Nach einer Aufreinigung des Inserts und des Vektors unter Verwendung eines PCR-Purification Kits erfolgte eine Ligation über Nacht. Am darauf folgenden Tag wurde der Ligationsansatz in kompetente *E. coli* transformiert. Um zu überprüfen, welche Kolonien das Konstrukt trugen, wurde schließlich eine Kolonie-PCR durchgeführt und mittels Agarosegel (Abb. 3.3) visualisiert.

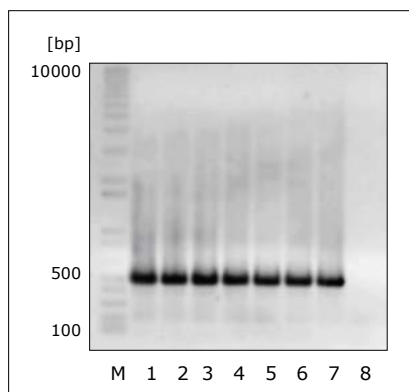


Abb. 3. 3 Kolonie-PCR-Amplifikate der pFPMT121-MFa-His₆-TCS/HERV-K TM Klone im Agarosegel

M=O´ Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 1-7=Klone 1-7, 8=ddH₂O-Kontrolle

Bei allen 7 Klonen konnte man distinkte Banden mit einer Größe von ca. 480 bp sehen, die der HERV-K TM-Sequenz entsprachen. So wurden alle Klone für positiv befunden und im Anschluss sequenziert. Von den 7 Klonen trug lediglich Klon 3 die korrekte HERV-K TM Sequenz (Abb. 3.4). Die Sequenzen der anderen Klone wiesen Mutationen in der Zielsequenz, additive Stoppcodons sowie Leserahmenverschiebungen auf.

```
.KGISMLLFCHFPPTAQITGLLFINTTIIASIAAKEEGVSLDKRPMGSSHHHHHSSGLVPRGSHASGRV
AGVALHSSVQSVNFVNDWQKNSTRLLWNSQSSID QKLANQINDLRQTVIWMGDRLMSLEHRFQLQ
CDWNTSDFCITPQIYNESEHHWDMVRRHLQGREDNLTDISKLKEQIFEASKAHLNLVPGTEA TAGV
ADGLANLNPVTWVKTI GSTT.
```

Abb. 3. 4 Aminosäuresequenz des Klon 3 (pFPMT121-MFa-His₆-TCS/HERV-K TM)

Die Sequenz umfasst folgende Bestandteile: schwarz=MFa, Lila=6x His Tag, Rosa=TCS, Hellblau=HERV-K TM, Dunkelblau=ISU-Domäne

Die Klonierung der HERV-K TM-Sequenz in den pFPMT121-MFa-His₆-TCS-Vektor war somit erfolgreich gewesen. Der insertragende Vektor pFPMT121-MFa-His₆-TCS/HERV-K TM wurde mittels Maxi Präparation amplifiziert und konnte für die Expression in der Hefe verwendet werden.

3.1.2.2 Transfektion, Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung vom HERV-K TM-Protein

Das hergestellte pFPMT121-MFa-His₆-TCS/HERV-K TM Konstrukt wurde mittels Elektroporation in die kompetente Hefe transformiert. Das Screenen der Klone (Abb. 3.5) erfolgte durch Präparation des Hefegenoms mittels Smash´n Grab und anschließender PCR mit HERV-K TM spezifischen Primern. Zum Vergleich wurde ebenso mit untransfizierter Rb11 und einem pFPMT121-MFa-His₆-TCS Klon verfahren.

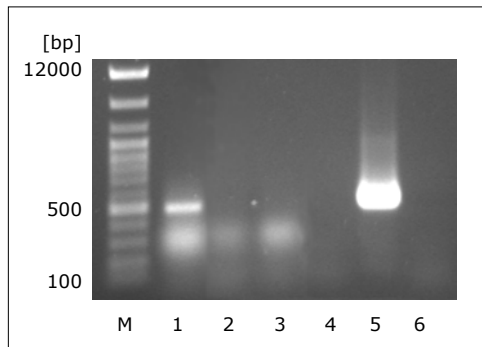
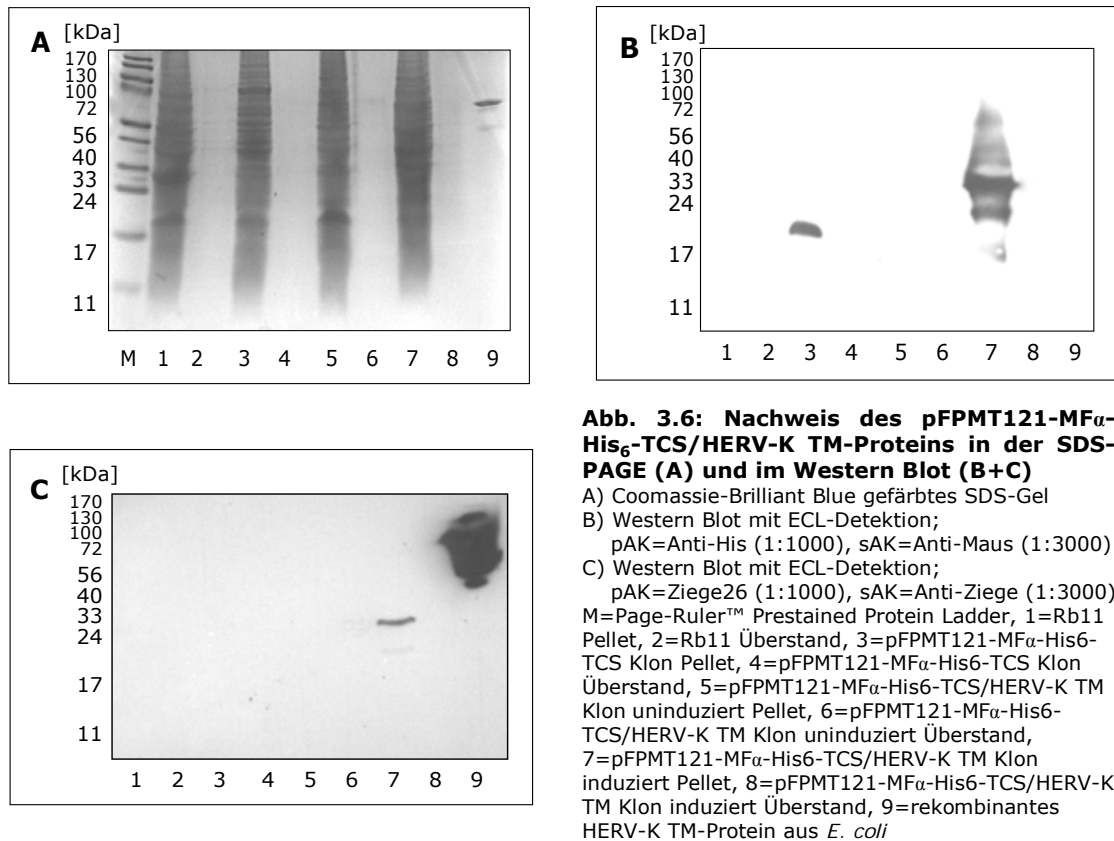


Abb. 3. 5 Nachweis der Smash´n Grab PCR-Amplifikate im Agarosegel

M=O´ Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 1=pFPMT121-MFa-His₆-TCS/HERV-K TM Klon, 2=untransfizierte Rb11, 3=pFPMT121-MFa-His₆-TCS Klon, 4=leer, 5=HERV-K TM Positivkontrolle, 6=ddH₂O-Kontrolle

Bei dem pFPMT121-MFa-His₆-TCS/HERV-K TM Klon und der Positivkontrolle konnten distinkte Banden bei ca. 480 bp gesichtet werden. Im Gegensatz dazu waren bei den anderen Klonen bzw. der ddH₂O-Negativkontrolle keine Banden sehen. Der Klon hatte demnach erfolgreich den Vektor mit der HERV-K TM-Sequenz aufgenommen und wurde für die darauf folgende Proteinexpression verwendet. Zusätzlich konnte durch die PCR gezeigt werden, dass es sich hierbei um kein unspezifisches Produkt bzw. Artefakt des Leervektors oder der untransfizierten Hefe handelt, da diese kein 480 bp großes Amplifikat hatten. Die schwachen Banden bei ca. 300bp stellten genomische DNS dar, die nicht durch die HERV-K TM spezifische PCR amplifiziert worden war.

Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot und SDS-PAGE (Abb. 3.6). Zusätzlich sollte überprüft werden, ob das HERV-K TM-Protein intrazellulär verblieb oder translokalisiert wurde.



Im SDS-Gel (Abb. 3.6-A) konnte man bei den Pellets aller Klone ähnliche Proteinbandenmuster, jedoch kein Protein im Kultivierungsmedium detektieren. Das Muster des pFPMT121-MF α -His $_6$ -TCS/HERV-K TM Klons war äquivalent zu den Mustern der Negativkontroll-Klone, was darauf schließen ließ, dass das Zielprotein nicht ausreichend exprimiert wurde, um es mittels Anfärbung im SDS-Gel mit Coomassie-Brilliant Blue zu detektieren. Der charakteristische Nachweis des Proteins gelang erst im Western Blot: da das Protein für die Aufreinigung mit einem 6fachem His-Tag versehen wurde, konnte es mittels eines spezifischen Anti-His Antikörpers detektiert werden (Abb. 3.6-B). Ebenso erfolgte eine Verifizierung mittels eines Serums der Ziege 26, die mit rekombinantem HERV-K TM-Protein (gp36) aus *E. coli* immunisiert worden war (Abb. 3.6-C) [Büscher et al. 2005]. In Abb. 3.6-B konnte man in der Spur, in der das Pellet des pFPMT121-MF α -His $_6$ -TCS/HERV-K TM Klons aufgetragen wurde, zwei distinkte Banden mit einem Molekulargewicht von 24 und 33 kDa und weitere, schwächere Nebenbanden erkennen. Im Unterschied dazu wies der pFPMT121-MF α -His $_6$ -TCS Klon eine deutliche Bande bei ca. 20 kDa auf was einem Leervektor- bzw. einem „multiple cloning site“-Produkt entsprach. Im Vergleich dazu detektierte das Ziegenserum nur die Positivkontrolle und die 24 und 33 kDa Banden des pFPMT121-MF α -His $_6$ -TCS/HERV-K TM Klons, wodurch bestätigt werden konnte, dass es sich bei dem Protein des pFPMT121-MF α -His $_6$ -TCS Klons nur um ein Artefakt und bei dem Produkt des Zielklons tatsächlich um das HERV-K TM-Protein handelte. Auf der Basis der Sequenzierungsdaten (Abb. 3.4) jedoch hätte das Protein eine Größe von 24 kDa haben müssen. Da es sich bei der Hefe allerdings um ein eukaryotisches Expressionssystem handelte und das TM-Protein laut „NetNGlyc 1.0“-Programm [<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>] vier N-Glykosylierungsstellen aufwies, ist es wahrscheinlich, dass die 33 kDa und schwächeren

Nebenbanden verschiedene Glykosylierungsstufen des Proteins darstellten. Um dies zu untersuchen, sollte im Anschluss an die Aufreinigung das N-Glykosylierungsmuster unter Verwendung der PNGase F analysiert werden.

Die Aufreinigung über die Ni-NTA Affinitätschromatographie gestaltete sich jedoch schwierig, da das rekombinante HERV-K TM-Protein sehr hydrophob ist und es trotz des MFA-Exportsignals nicht aus den Zellen exportiert wurde. Für die Aufreinigung aber war es notwendig, dass das Protein in Lösung vorlag. Trotz der Behandlung mit 8 M Harnstoff- bzw. 6 M Guanidin-Hydrochlorid konnte es nicht gelöst werden. Erst mittels einer Kombination aus 8 M Harnstoff und 0,3 % SDS konnte das Zielprotein in Lösung gebracht und schließlich aufgereinigt werden. Die Aufreinigung wurde im Anschluss per SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abb. 3.7).

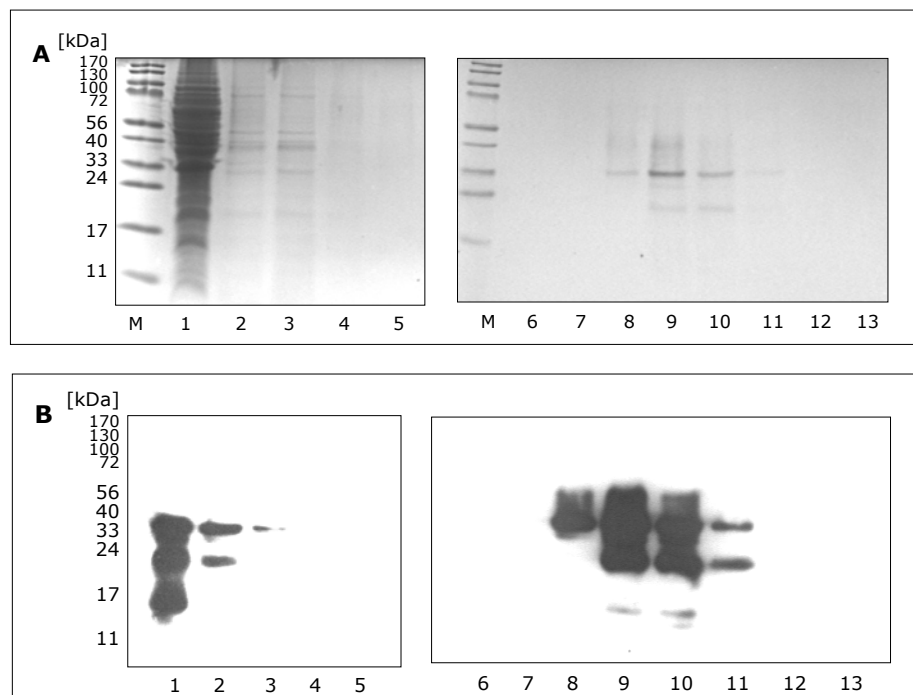


Abb. 3. 7 Darstellung der HERV-K TM-Protein-Aufreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie in der SDS-PAGE (A) und im Western Blot (B)

A) Coomassie-Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel

B) Western Blot mit ECL-Detektion; pAK=Anti-His (1:1000), sAK=Anti-Maus (1:3000)

M=Page-Ruler™ Prestained Protein Ladder, 1=Zellpellet nach Induktion, 2=Ausgangslösung, 3=Durchlauf, 4=Waschfraktion 1, 5=Waschfraktion 2, 6-13=Elutionsfraktionen 4-11

Die SDS-Gel Analyse (Abb. 3.7-A) der Protein-Aufreinigung zeigte Folgendes: Das Zellpellet, sowie die Ausgangslösung und der Durchlauf wiesen ein undefiniertes Bandenmuster auf, welches mit den Waschfraktionen verschwand. Die Elutionsfraktionen wurden einer PIERCE-Proteinbestimmung unterzogen, da der Bradford Assay SDS-sensitiv ist. Es wurden nur die Fraktionen 4-11 aufgetragen, wo sich laut der Bestimmung Protein befand. Im SDS-Gel ab Fraktion 6 konnten distinkte Banden bei ca. 24 und 33 kDa nachgewiesen werden. Dass es sich hierbei um das HERV-K TM-Protein handelte, konnte durch den spezifischen Anti-His Antikörper im Western Blot (Abb. 3.7-B) bestätigt werden. Das Bandenmuster im SDS-Gel aus dem Ausgangsmaterial war in den Elutionsfraktionen 6-9 nicht mehr zu sehen, so dass man davon ausgehen konnte, dass die Aufreinigung des Zielproteins erfolgreich war. Ebenso wurde

ersichtlich, dass eine Aufkonzentrierung stattgefunden hatte: die 24 und 33 kDa-Banden waren in den Elutionsfraktionen stärker vorhanden als in der Ausgangslösung. Die Banden bei 15 kDa entsprachen wahrscheinlich Zerfallsprodukten des Proteins, da diese ebenfalls durch den Anti-His Antikörper detektiert werden konnten.

Vor der Untersuchung des Proteins auf die Treg-Induktion sollte jedoch das N-Glykosylierungsmuster untersucht und das SDS, welches sich noch am Protein befand, entfernt werden, da dieses unerwünschte Effekte auf die Treg-Untersuchung hätte haben können. Dazu wurde es dreimal hintereinander mittels kalter Aceton/Methanolfällung präzipitiert und anschließend mit der PNGase F behandelt und im Western Blot bzw. SDS-PAGE untersucht (Abb.3.8).

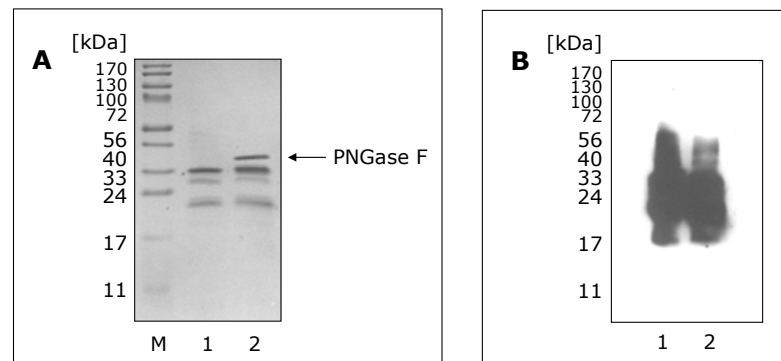


Abb. 3. 8 Analyse des HERV-K TM-Protein N-Glykosylierungsmusters mittels PNGase F in der SDS-PAGE (A) und im Western Blot (B)

A) Coomassie-Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel

B) Western Blot mit ECL-Detektion; pAK=Anti-His (1:1000), sAK=Anti-Maus (1:3000)

M=Page-Ruler™ Prestained Protein Ladder, 1=-PNGase F, 2=+PNGase F

Im SDS-Gel (Abb. 3.8-A) konnte man zunächst keinen Unterschied zwischen dem unbehandelten und dem mit der PNGase F behandelten Protein feststellen. In beiden Fällen sah man jeweils die gleichen HERV-K TM-Protein spezifischen Banden, bei dem behandelten Protein jedoch eine zusätzliche Bande bei ca. 36 kDa, welche der PNGase entsprach. Erst im Western Blot (Abb. 3.8-B) war ein geringer Effekt ersichtlich: das Signal der Banden oberhalb von 33 kDa wurden im Falle des behandelten Proteins schwächer, was darauf schließen ließ, dass die PNGase F einen geringen Anteil des Proteins deglykosyliert hatte.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass das SDS vollständig durch die kalte Methanol/Aceton-Fällung vom Protein entfernt wurde, wurde für die Untersuchung der Treg-Induktion BSA, ein Protein, welches keine immunsuppressiven Effekte haben sollte, mit der gleichen Konzentration SDS behandelt, dreimal gefällt und als adäquate Negativkontrolle eingesetzt, um falsch positive Effekte durch das SDS ausschließen zu können. Abschließend wurden alle Elutionsfraktionen der Aufreinigung gepoolt und mittels SDS-PAGE und Western Blot charakterisiert (Abb.3.9).

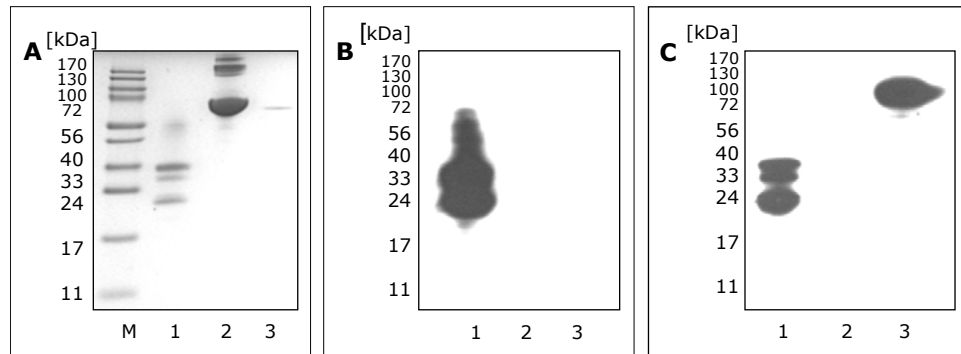


Abb. 3. 9 Charakterisierung des HERV-K TM-Proteins in der SDS-PAGE (A) und im Western Blot (B+C)

A) Coomassie-Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel

B) Western Blot mit ECL-Detektion; pAK=Anti-His (1:1000), sAK=Anti-Maus (1:3000)

C) Western Blot mit ECL-Detektion; pAK=Ziege 26 (1:1000), sAK=Anti-Ziege (1:3000)

M=Page-Ruler™ Prestained Protein Ladder, 1=rekombinantes HERV-K TM-Protein aus *H. polymorpha*, 2=BSA, 3=rekombinantes HERV-K TM-Protein aus *E. coli*

Im SDS-Gel (Abb. 3.9-A) konnten distinkte Banden bzw. aufgrund der N-Glykosylierungen das für das HERV-K TM-Protein charakteristische Bandenmuster erkannt werden. Diese Banden wurden auch in den spezifischen Western Blot Analysen (Abb. 3.9-B/C) mittels His-Antikörper und Ziegen Serum 26 nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente BSA, das nur im SDS-Gel eine deutliche Bande bei ca. 65 kDa aufwies und nicht mit Hilfe der Western Blot Analyse zu detektieren war. Auffällig jedoch war, dass das rekombinante HERV-K TM-Protein aus *E. coli* im Western Blot (Abb. 3.9 C) viel stärker mit dem Ziegen Serum 26 interagierte als das rekombinante HERV-K TM-Protein aus *H. polymorpha*. Eine Erklärung hierfür waren mögliche N-Glykosylierungen in Epitopbereichen des Ziegen Serums 26 und eine daher eingeschränkte Bindung an das rekombinante HERV-K TM-Protein aus dem eukaryotischen Organismus. Daher wurden im Anschluß die Sequenzen der rekombinanten Proteine und die Epitope, an die das Serum bindet, miteinander verglichen (Abb. 3.10) und tatsächlich konnte man eine, laut „NetNGlyc 1.0“-Programm, mögliche N-Glykosylierung in einem Epitopbereich feststellen, welche zur Maskierung dieses Bereiches geführt haben könnten.

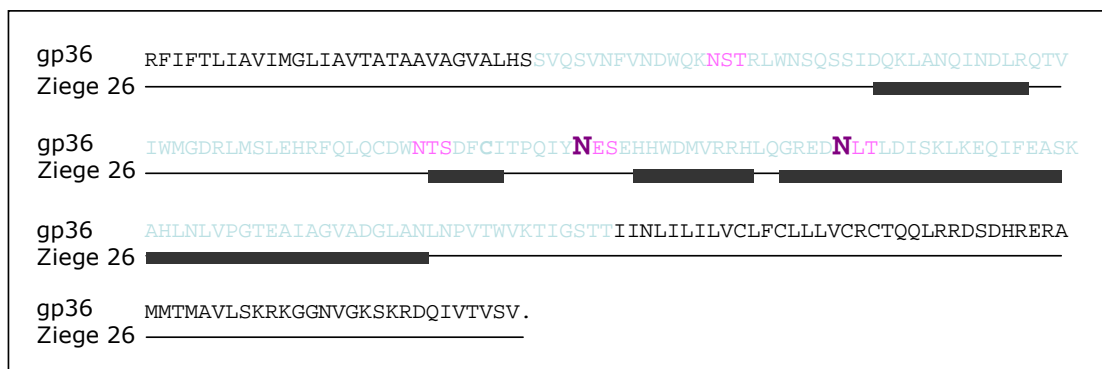


Abb. 3. 10 Darstellung der N-Glykosylierungsstellen und der Epitopbereiche der Ziege 26 in der Sequenz des rekombinanten HERV-K TM-Proteins gp36 aus *E. coli* [Büscher et al. 2006]

Dargestellt ist die Sequenz des rekombinanten gp36 aus *E. coli* mit der die Ziege 26 immunisiert worden war und die dazugehörigen Epitopbereiche (schwarze Balken) die vom Ziegen Serum 26 erkannt werden. Hellblau=pFMT121-MF α -His6-TCS/HERV K TM Klon-Sequenz, Rosa=Asn-Xaa-Ser/Thr-Sequenzen, Lila=Mögliche N-Glykosylierte Asparagine laut „NetNGlyc 1.0“-Programm

Das HERV-K TM-Protein wurde also erfolgreich rekombinant in *H. polymorpha* hergestellt, aufgereinigt sowie charakterisiert und konnte für die Treg-Untersuchung eingesetzt werden.

3.1.3 Gewinnung und Charakterisierung von Peptid-Polymeren

Für Monomere des HIV-Peptids konnte gezeigt werden, dass diese nicht suppressiv auf die Proliferation immunkompetenter Zellen wirkten [Denner et al. 1994]. Um eine biologisch aktive Konformation zu erhalten, wurden die Monomere des HIV-Peptids mittels EDC zu Polymeren gekoppelt. Die durchschnittliche Kopplungseffizienz lag bei 20 % und wurde mittels PIERCE-Proteinbestimmung ermittelt. Die gekoppelten Polymere wurden im Anschluss per Western Blot und SDS-PAGE untersucht (Abb. 3.11).

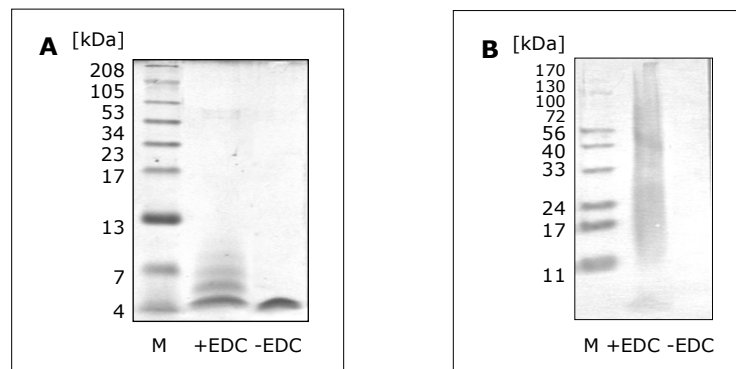


Abb. 3. 11 Darstellung der Kopplung in der SDS-PAGE (A) und im Western Blot (B)

A) Coomassie-Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel

B) Western Blot mit DAB-Färbung; pAK=Ziege 1 (1:2000), sAK=Anti-Ziege (1:3000)

M=MultiMark® Multi-Colored Standard, +EDC=gekoppelt, -EDC=ungekoppelt

Im SDS-Gel wurden im Vergleich zum Ausgangsmonomer verschiedene Kopplungsstufen der Polymere deutlich. Ebenso war ersichtlich, dass der Großteil noch als niedermolekulare Polymere bzw. ungekoppelt vorlag. Die unterpräsentierten hochmolekularen Strukturen konnten erst im Western Blot visualisiert werden. Das spezifische Ziegenserum interagiert nur mit den hochmolekularen Strukturen und nicht mit den niedermolekularen bzw. mit dem ungekoppelten Ausgangsmonomer, was darauf schließen ließ, dass nur die hochmolekularen Polymere die für die Bindung des Antikörpers notwendigen Strukturen aufwiesen. Hinsichtlich der biologischen Aktivität konnte gezeigt werden, dass lediglich die hochmolekularen Fraktionen ab einem Molekulargewicht von 30 kDa IL-10 Ausschüttung induzierten [Behrendt 2005], so dass eine erfolgreiche Kopplung Voraussetzung für die Untersuchung der Treg-Induktion war. Das in Abb. 3.11 abgebildete Konjugat steht exemplarisch für alle in dieser Arbeit hergestellten Konjugate und es wurden ausschließlich Konjugate verwendet, bei denen eine erfolgreiche Kopplung im Western Blot und SDS-PAGE nachgewiesen wurde.

3.2 Untersuchung der Induktion regulatorischer T-Zellen *in vitro*

Im Anschluss an die Synthese und Charakterisierung der retroviralen Proteine sollten diese auf ihr Potential, regulatorische T-Zellen *in vitro* zu induzieren, untersucht werden. Dazu erfolgte eine Charakterisierung der Lymphozytenpopulation anhand der Treg spezifischen Marker CD4, CD25 und FoxP3 mittels Durchflusszytometrie, sowie eine Quantifizierung des FoxP3 Transkriptionslevels durch eine FoxP3 spezifische TaqMan Real-Time PCR. Ebenso sollte ein inhibierender Effekt durch die Untersuchung der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation mit zwei verschiedenen Assays, dem Alamar Blue und dem [3H]Thymidin Inkorporations-Assay, analysiert werden. Schließlich sollte die Zytokinmodulation durch die retroviralen Proteine erfasst werden, da das Zytokinmilieu für die Treg-Induktion eine wichtige Rolle spielt. Dazu wurden ein IL-10 spezifischer *capture* ELISA und ein Zytokin-Array durchgeführt. Für die Untersuchung der Zytokinmodulation und die FoxP3-Messungen wurden humane PBMCs verwendet. Um die Spenderabhängigkeit und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden die Versuche mit 2 verschiedenen Spendern durchgeführt. Für die folgenden Darstellungen wurden die Ergebnisse des Spenders 1 mit PBMCs 1 bzw. des Spenders 2 mit PBMCs 2 abgekürzt. Für die Proliferationsassays jedoch wurden murine PBMCs verwendet, da die humanen PBMCs im Alamar Blue Assay auch unstimuliert stark reagierten. Die FoxP3 Real-Time PCR wurde durch Variieren der Konzentrationen an MgCl₂, Primern, FoxP3-Sonde und Taq Polymerase optimiert und darüber hinaus wurde mittels One-Step RT-PCR ein doppelsträngiges FoxP3 Amplifikat hergestellt, welches als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Um eine Änderung im FoxP3-Transkriptionslevel zu untersuchen, wurde zunächst die RNS aus den mit den viralen Proben inkubierten PBMCs isoliert, mittels RT-PCR umgeschrieben und die cDNS in der TaqMan Real-Time PCR quantitativ auf FoxP3 analysiert.

Um die Ergebnisse miteinander zu vergleichen, wurden die behandelten Zellen für die Real-Time PCR und die FACS-Messungen parallel mit den Proben behandelt und die dazu gehörigen Überstände für die Zytokin-Untersuchungen verwendet.

3.2.1. Untersuchung der Treg-Induktion durch die inaktivierte PERV-Präparation *in vitro*

Für die Untersuchung der Treg-Induktion durch Gammaretroviren *in vitro* wurde die hergestellte inaktivierte PERV-Präparation in dem IL-10 spezifischen ELISA, der FACS-Messung, der FoxP3 Real-Time PCR sowie den Lymphozytenproliferationsassays getestet. Die Überstände der PBMCs zweier Spender, die mit verschiedenen Konzentrationen der PERV-Präparation inkubiert worden sind, wurden zunächst im ELISA auf die IL-10 Sekretion getestet (Abb. 3.12). Es konnte eine relativ hohe und konzentrationsabhängige Sekretion von IL-10 durch die Inkubation mit der Präparation induziert werden. Bei den PBMCs 1 erfolgte zwar im Vergleich zu den PBMCs 2 eine um ca. 20 % verringerte Sekretion, jedoch war die Korrelation zwischen der applizierten Proteinmenge und der Interleukin-Sekretion bei den Spendern analog.

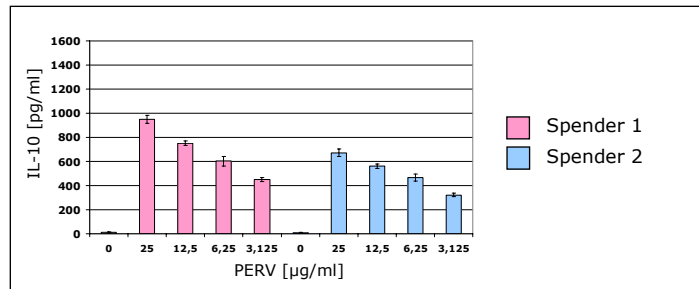


Abb. 3. 12 Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach 24h Inkubation mit der PERV-Präparation

Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs von zwei Spendern nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der inaktivierten PERV-Präparation. Im Vergleich dazu die IL-10 Sekretion un behandelter PBMCs.

Die entsprechenden Zellen wurden anschließend in der FACS-Messung und der Real-Time PCR auf den Treg-spezifischen Marker FoxP3 untersucht. Übereinstimmend mit den Ergebnissen des IL-10 ELISAs konnte man auch in der Untersuchung der Lymphozytenpopulation durch die FACS-Messung einen Unterschied in den Ergebnissen bei den Spendern sehen (Abb. 3.13): bei den PBMCs 1 erfolgte eine Erhöhung in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population um fast 1,2 % durch Inkubation mit der PERV-Präparation. Bei den PBMCs 2 erfolgte im Vergleich dazu eine eher geringe Erhöhung um 0,45 %, was mit den spenderbedingten IL-10 Daten korreliert. Da es sich jedoch bei allen FACS-Daten um Einzelwerte handelte, konnte eine Signifikanz nicht eindeutig beurteilt werden.

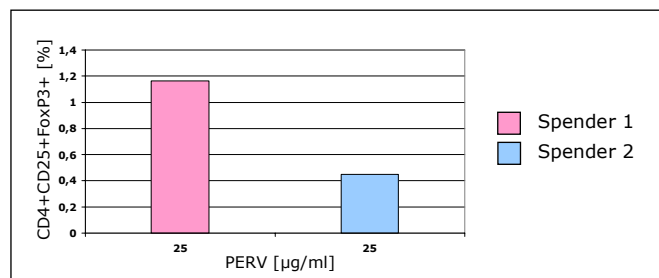


Abb. 3. 13 Prozentualer Anteil an CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Lymphozyten nach 24h Inkubation mit der PERV-Präparation

Induktion in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Lymphozytenpopulation von zwei Spendern nach 24stündiger Inkubation mit einer Konzentration von 25 µg/ml der inaktivierten PERV-Präparation. Dargestellt sind die Werte abzüglich der Werte der un behandelten PBMCs.

Die Ergebnisse der FoxP3 Real-Time PCR stellten sich jedoch gegenteilig dar (Abb. 3.14): während bei den PBMCs 1 die Inkubation mit 25 µg/ml der PERV-Präparation keinen bzw. einen negativen Δ Ct-Wert bewirkte, führte diese Konzentration bei den PBMCs 2 zu einem deutlichen Anstieg des Δ Ct-Werts um 1 Ct.

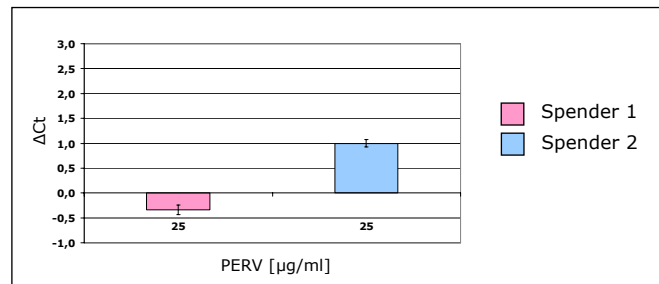


Abb. 3. 14 Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in humanen PBMCs nach 24h Inkubation mit der PERV-Präparation

Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in den PBMCs zweier Spender nach 24-stündiger Inkubation mit einer Konzentration von 25 µg/ml der inaktivierten PERV-Präparation, dargestellt durch die Δ Ct Werte (Ct-Werte der unbehandelten PBMCs abzüglich der Ct-Wertes der behandelten PBMCs).

Abschließend wurde der Einfluss der PERV-Präparation in den zwei verschiedenen Lymphozytenproliferationsassays untersucht (Abb. 3.15). Bei beiden Assays konnte man im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine Inhibition der murinen Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der inaktivierten PERV-Präparation feststellen. Im [3H]Thymidin Inkorporations-Assay konnte man sogar einen gegenteiligen Effekt, eine Induktion bzw. Stimulation der Proliferation erkennen. Es wurde jedoch auch in beiden Assays deutlich, dass die Präparation selbst bei einer hohen Konzentration von 25 µg/ml nicht toxisch auf die Zellen wirkte.

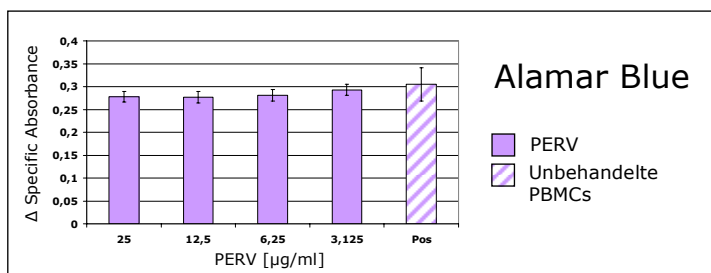
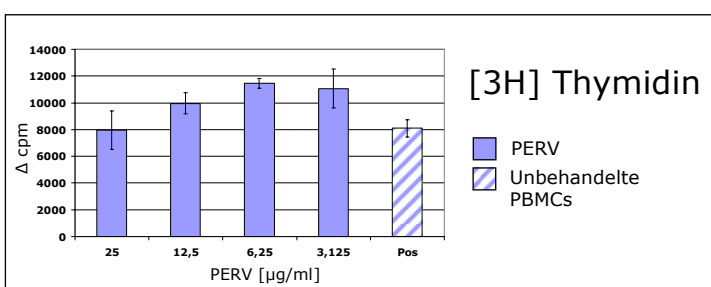


Abb. 3. 15 Einfluß der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation nach 24h Stunden Inkubation mit der PERV-Präparation im Alamar Blue und [3H] Thymidin Inkorporations-Assay



Einfluß der Mitogen-induzierten Proliferation muriner Lymphozyten nach 24stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der inaktivierten PERV-Präparation. Im Vergleich dazu die Mitogen-induzierte Proliferation von stimulierten unbehandelten murinen Lymphozyten. Dargestellt sind die Werte abzüglich der unstimulierten Zellen.

Die Untersuchungen des Einflusses der PERV-Präparation auf die PBMCs ergab folgendes: durch Inkubation mit der Präparation wurde die IL-10 Sekretion humaner PBMCs stimuliert. Jedoch konnte kein signifikanter Nachweis im Anstieg des Treg spezifischen Markers FoxP3 gezeigt werden, weder in der FACS-Analyse noch in der FoxP3 spezifischen Real-Time PCR. Zusätzlich zeigte die Präparation keine inhibierende sondern eher eine stimulierende Wirkung auf die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation. Aufgrund der Ergebnisse wurde eine Konzentrationsabhängigkeit und somit eine minimale Konzentration, bei der eine Wirkung eintritt, nicht näher untersucht.

3.2.2. Untersuchung der Treg-Induktion durch das rekombinante HERV-K TM-Protein *in vitro*

Analog zu den Untersuchungen der PERV-Präparation wurde auch das rekombinante HERV-K TM-Protein zunächst im IL-10 ELISA getestet (Abb. 3.16). Für diesen Versuch wurden dieselben Spender und auch die gleichen Konzentrationen des Proteins eingesetzt wie bei der Viruspräparation. Im Vergleich zu dieser fand jedoch bei beiden Spendern eine etwas höhere, aber ebenso konzentrationsabhängige Ausschüttung an IL-10 im Überstand der mit dem HERV-K TM-Protein inkubierten Zellen statt. Selbst bei der niedrigsten Konzentration von 3,125 µg/ml wurde eine Sekretion von ca. 750 pg/ml IL-10 bewirkt. Die unbehandelten PBMCs und das mit SDS präparierte BSA dagegen bewirkten eine minimale Ausschüttung von ca. 10 pg/ml IL-10 in allen verwendeten Konzentrationen, weshalb unspezifische Effekte durch das SDS ausgeschlossen werden konnten.

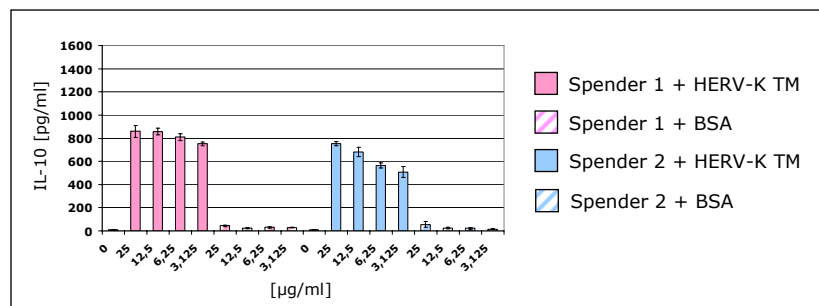


Abb. 3. 16 Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach 24h Inkubation mit BSA und dem rekombinanten HERV-K TM-Protein

Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs von zwei Spendern nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (1:2 Verdünnungsreihe) des mit SDS präparierten BSAs und des rekombinanten HERV-K TM-Proteins. Im Vergleich dazu die IL-10 Sekretion unbehandelter PBMCs.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei der Untersuchung der Zellen in der FACS-Messung und in der FoxP3 Real-Time PCR erzielt werden: während die mit HERV-K TM-Protein behandelten Zellen einen Populationszuwachs an CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen um bis zu 1,1 % aufwiesen, führte das BSA mit SDS zu einem Zuwachs dieser Population um maximal 0,45 % (Abb 3.17). Jedoch konnte in beiden Fällen kein konzentrationsabhängiger Effekt in der Treg-Induktion detektiert werden. Die prozentualen Anteile der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population schwankten bei den PBMCs beider Spendern und nahmen trotz einer geringeren zugegeben Menge an HERV-K TM-Protein zu.

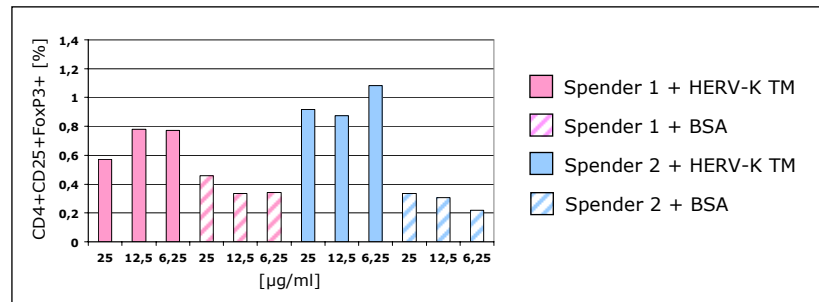


Abb. 3. 17 Prozentualer Anteil an CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Lymphozyten nach 24h Inkubation mit BSA und dem rekombinanten HERV-K TM-Protein

Induktion in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Lymphozytenpopulation von zwei Spendern nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (1:2 Verdünnungsreihe) des mit SDS präparierten BSA und des rekombinanten HERV-K TM-Proteins. Dargestellt sind die Werte abzüglich der Werte der unbehandelten PBMCs.

Folgende Ergebnisse ergaben die Analysen des Transkriptionslevels von FoxP3 durch die spezifische Real-Time PCR (Abb 3.18): bei Spender 2 konnte man zwar einen Anstieg um ca. 1 Δ Ct-Wert durch Inkubation mit dem HERV-K TM-Protein erkennen, jedoch fand keine Abnahme der Δ Ct-Werte korrelierend zu den abnehmenden applizierten Proteinmengen statt. Ein Vergleich mit der BSA-Kontrolle, die bei einer Konzentration von 25 µg/ml ebenfalls eine Erhöhung um einen Δ Ct-Wert zur Folge hatte, ergab, dass dieser Wert nicht eindeutig auf das HERV-K TM-Protein zurückgeführt werden konnte. Bei den PBMCs 1 konnte zwar, auch im Vergleich zur BSA-Kontrolle, eine geringe konzentrationsabhängige Induktion im Expressionslevel von FoxP3 gezeigt werden, jedoch war diese im Vergleich zu den unbehandelten PBMCs nicht signifikant erhöht.

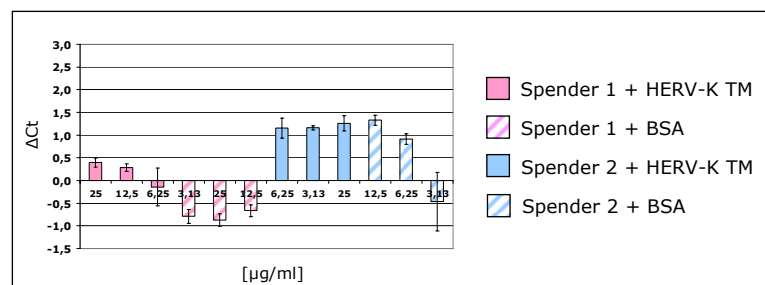


Abb. 3. 18 Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in humanen PBMCs nach 24h Inkubation mit BSA und dem rekombinanten HERV-K TM-Protein

Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in den PBMCs zweier Spender nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (1:2) des mit SDS präparierten BSA und des rekombinanten HERV-K TM-Proteins, dargestellt durch die Δ Ct Werte (Ct-Werte der unbehandelten PBMCs abzüglich der Ct-Wertes der behandelten PBMCs).

Um ein minimale Wirkkonzentration zu detektieren, sollte in einem Folgeversuch das Protein statt 1:2, 1:10 ausverdünnt werden. Die Ergebnisse des zweiten IL-10 ELISAs (Abb 3.19) zeigten, dass in beiden Spendern durch das HERV-K TM-Protein eine konzentrationsabhängige IL-10 Sekretion der PBMCs erfolgte und dass sich das Wirkungsminimum zwischen den beiden Konzentrationen 2,5 und 0,25 µg/ml befinden musste.

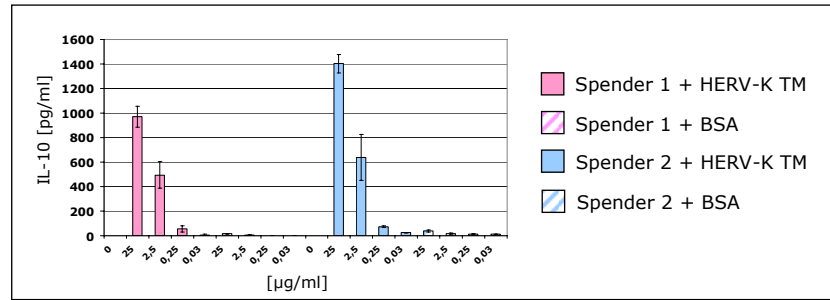


Abb. 3. 19 Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach 24h Inkubation mit höher verdünntem BSA und rekombinanten HERV-K TM-Protein

Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs von zwei Spendern nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (1:10 Verdünnungsreihe) des mit SDS präparierten BSA und des rekombinanten HERV-K TM-Proteins. Im Vergleich dazu die IL-10 Sekretion unbehandelter PBMCs.

Analog zu den Ergebnissen des IL-10 ELISAs zeigte die zweite FACS-Messung (Abb 3.20), dass es einen konzentrationsabhängigen und, im Vergleich zur BSA-Kontrolle, eindeutigen prozentualen Anstieg in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population durch Inkubation mit dem HERV-K TM-Protein bei beiden Spendern gab. Auch in diesem Versuch deutete sich ein Wirkungsminimum an, welches bei 0,25 µg/ml an applizierten HERV-K TM-Protein lag und mit den Ergebnissen des IL-10 ELISAs konform ging. Bei dieser Konzentration konnte noch eine Erhöhung um 0,7-0,85 % in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population nachgewiesen werden, während bei der adäquaten BSA-Kontrolle keine Erhöhung dieser Population stattfand, weshalb Effekte durch das SDS ausgeschlossen werden konnten.

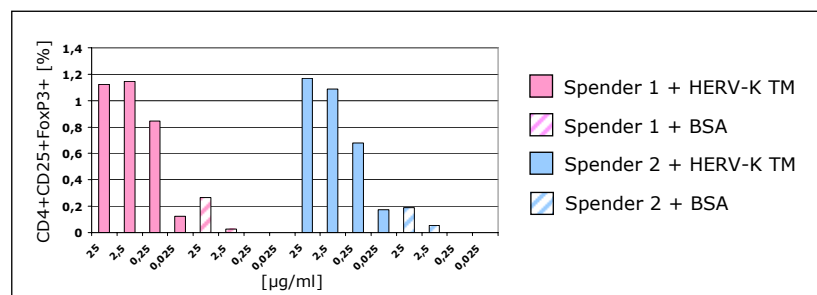


Abb. 3. 20 Prozentualer Anteil an CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Lymphozyten nach 24h Inkubation mit höher verdünntem BSA und rekombinanten HERV-K TM-Protein

Induktion in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Lymphozytenpopulation von zwei Spendern nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (1:10 Verdünnungsreihe) des mit SDS präparierten BSA und des rekombinanten HERV-K TM-Proteins. Dargestellt sind die Werte abzüglich der Werte der unbehandelten PBMCs.

Durch die FoxP3 Real-Time PCR Ergebnisse des Folgeversuchs jedoch konnte, wie im ersten Versuch, keine eindeutige Induktion im FoxP3-Transkriptionslevel mittels Inkubation mit dem HERV-K TM-Protein nachgewiesen werden (Abb 3.21). Alle Δ Ct-Werte der HERV-K TM-Proben schwankten stark und wiesen keinen deutlichen Unterschied zu den Δ Ct-Werten der BSA-Kontrollen auf. Es konnte keine Dosisabhängigkeit festgestellt werden, bei Spender 1 ergab eine applizierte HERV-K TM-Proteinkonzentration von 0,25 µg/ml sogar den höchsten Δ Ct-Wert von ca. 2,2. Und im Gegensatz zu den Ergebnissen des IL-10 ELISAs und der FACS-Messung, wo

beide Spender ähnlich reagierten, waren die FoxP3 Transkriptionslevel in der Real-Time PCR bei den Spendern völlig unterschiedlich, obwohl die RNS der Zellen isoliert wurde, deren Überstand im IL-10 ELISA getestet wurden.

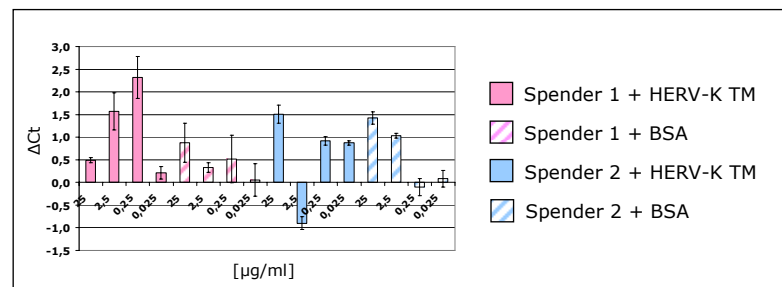


Abb. 3. 21 Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in humanen PBMCs nach 24h Inkubation mit höher verdünntem BSA und rekombinanten HERV-K TM-Protein

Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in den PBMCs zweier Spender nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (1:10) des mit SDS präparierten BSA und des rekombinanten HERV-K TM-Proteins, dargestellt durch die ΔCt Werte (Ct-Werte der unbehandelten PBMCs abzüglich der Ct-Wertes der behandelten PBMCs).

Analog zur PERV-Präparation wurden auch für das HERV-K TM-Protein inhibierende Effekte auf die Mitogen-induzierte murine Lymphozytenproliferation analysiert. Für einen Vergleich wurden die Ergebnisse des Alamar Blue Assays gegenüber denen des [3H]Thymidin Inkorporations-Assays gestellt (Abb. 3.22). In beiden Assays konnte, im Vergleich zu unbehandelten PBMCs, eine durch Inkubation mit dem rekombinanten HERV-K TM-Protein konzentrationsabhängige Inhibition der Lymphozytenproliferation nachgewiesen werden. Ebenso wurde ersichtlich, dass das BSA, trotz des SDS, keinen signifikanten Einfluß auf die Proliferation hatte. Allerdings wurde auch ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Assays deutlich: während eine HERV-K TM-Proteinkonzentration von 3,125 $\mu\text{g/ml}$ im [3H]Thymidin Inkorporations-Assay noch eine deutliche Inhibition zur Folge zeigte, hatte diese Konzentration im Alamar Blue Assay keine Wirkung auf die Proliferation. Durch die Ergebnisse des [3H]Thymidin Assay wurde jedoch klar, dass das Wirkungsminimum sich unterhalb einer Dosis von 3,125 $\mu\text{g/ml}$ befinden musste.

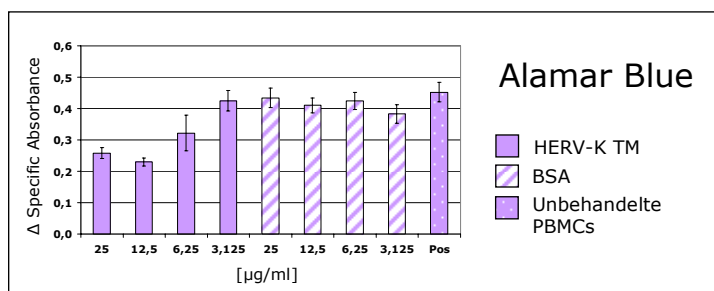
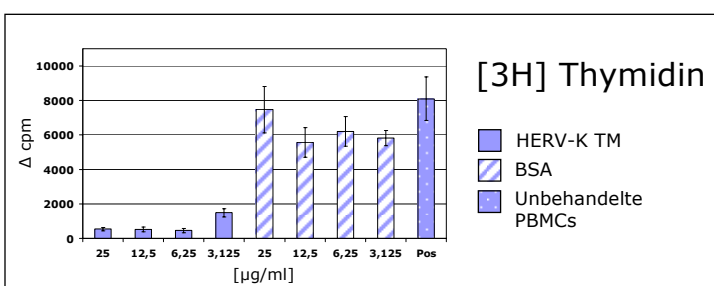


Abb. 3. 22 Inhibition der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation nach 24h Stunden Inkubation mit BSA und dem rekombinanten HERV-K TM-Protein im Alamar Blue und [3H] Thymidin Inkorporations-Assay



Inhibition der Mitogen-induzierten Proliferation muriner Lymphozyten nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des mit SDS präparierten BSAs und des rekombinanten HERV-K TM-Proteins. Im Vergleich dazu die Mitogen-induzierte Proliferation von stimulierten unbehandelten murinen Lymphozyten. Dargestellt sind die Werte abzüglich der unstimulierten Zellen.

Um den Einfluss des HERV-K TM-Proteins auf die Zytokinproduktion humaner PBMCs zu untersuchen, wurde ein Zytokin-Array (Abb.3.23) durchgeführt. Damit wurde überprüft, welche Zytokine durch Inkubation der PBMCs mit dem HERV-K TM-Protein induziert werden. Bei den PBMCs 1 erfolgte durch die Inkubation mit 12,5 µg/ml des rekombinanten HERV-K TM-Proteins, im Vergleich zu den unbehandelten PBCMs bzw. der BSA-Kontrolle eine Ausschüttung verschiedener Zytokine: es konnten verstärkt IL-6, IL-1α und MCP-1 aber auch IL-10, sowie, anhand sehr schwacher Spots erkennbar, TGF-β im Überstand der PBMCs detektiert werden. Bei Spender 2 konnte man nur eine Induktion von IL-6 und MCP-1 sehen, allerdings zeigte die Mediumkontrolle technische Probleme bei dieser Analyse. Die Sekretion von IL-10 und TGF-β deutete auf einen anti-inflammatorischen Effekt hin, während IL-1α [Oppenheim et al. 1984] und MCP-1 [Leonard & Yoshiruma 1990] eher pro-inflammatorisch wirken. Letztes wurde jedoch auch bei der BSA-Kontrolle im Falle des Spenders 2 ausgeschüttet, was auf einen unspezifischen Effekt durch das SDS hinwies. IL-6 schließlich, welches sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken kann [Ulich et al. 1991], konnte in schwachen Spots auch schon bei der BSA-Kontrolle nachgewiesen werden, wurde aber verstärkt und zeigte die größte Erhöhung.

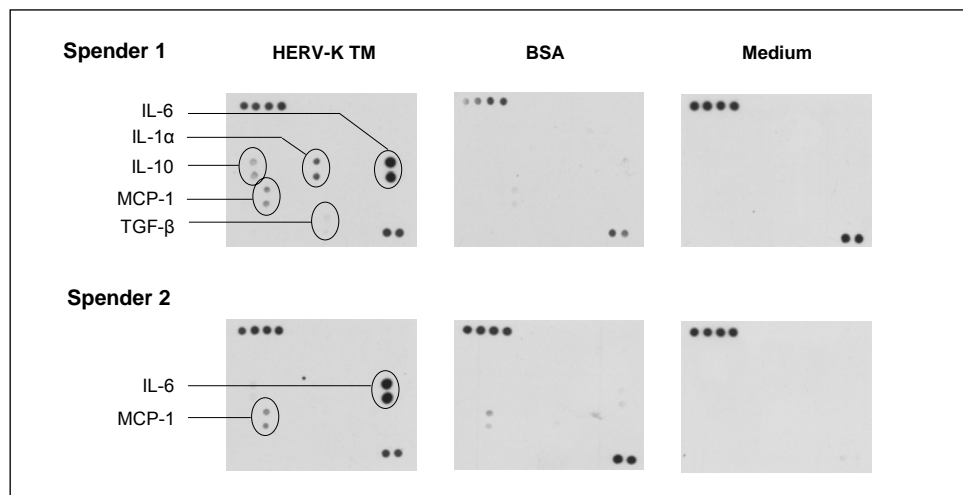


Abb. 3. 23 Modulation der Zytokinsekretion (RayBio® Cytokine Array VI) humaner PBMCs nach 24h Inkubation mit BSA und dem rekombinanten HERV-K TM-Protein

Modulation der Zytokinsekretion humaner PBMCs von zwei Spendern nach 24-stündiger Inkubation mit 12,5 µg/ml BSA bzw. rekombinatem HERV-K TM-Protein unter der Verwendung des RayBio® Cytokine Arrays VI; IL=Interleukin, MCP=monocyte chemoattractant protein, TGF=tumor necrosis factor

Die Untersuchung der Treg-Induktion durch Inkubation humaner bzw. muriner PBMCs mit dem rekombinanten HERV-K TM-Protein aus *H. polymorpha* ergab folgendes: es konnte eine hohe IL-10 Sekretion und ein Anstieg der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population um mehr als 1% demonstriert werden. Außerdem wurde in beiden Proliferationsassay gezeigt, dass das HERV-K TM-Protein inhibierend auf die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation wirkte. Diese Ergebnisse waren weitestgehend spenderunabhängig, aber zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit und es konnte ein Wirkungsminimum zwischen den Konzentrationen 2,5-0,25 µg/ml eingegrenzt werden. Zusätzlich konnte mittels des Zytokin-Arrays die Stimulation weiterer Zytokine gezeigt werden. Aufgrund der adäquaten BSA-Kontrolle, die in den Wiederholungsversuchen keine Induktion der IL-10 Sekretion bzw. keinen Anstieg der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population zur Folge hatte und auch

nicht inhibierend auf die Lymphozytenpopulation wirkte, konnten unspezifische Effekte durch das SDS ausgeschlossen werden. Die Real-Time PCR Analyse des FoxP3-Transkriptionlevels jedoch lieferte für das HERV-K TM-Protein sowie für das BSA analog zu den Untersuchungen der PERV-Präparation keine reproduzierbaren und, im Vergleich zu den anderen Untersuchungen, widersprüchlichen Ergebnisse.

3.2.3 Untersuchung der Treg-Induktion durch das Peptid-Heteropolymer K137 *in vitro*

Aus einer Reihe von Homo- bzw. Heteropolymere der ISU-Domänen verschiedener Retroviren, wurde ein HIV/PERV ISU-Heteropolymer ausgewählt (K137), welches in der Lage war, die IL-10 Sekretion humaner PBMCs zu induzieren. Dieses wurde nochmals im IL-10 ELISA auf Spender- und Konzentrationsabhängigkeit untersucht (Abb. 3.24).

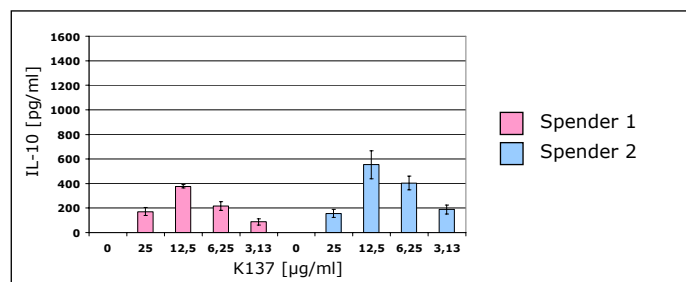


Abb. 3. 24 Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach 24h Inkubation mit K137

Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs von zwei Spendern nach 24stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Peptid-Heteropolymers K137. Im Vergleich dazu die IL-10 Sekretion unbehandelter PBMCs.

Bei beiden Spendern fand jeweils eine ähnlich hohe Sekretion an IL-10 in Dosis-Abhängigkeit des applizierten Polymers K137 statt. Während die unbehandelten PBMCs kein IL-10 ausschütteten, bewirkte das K137 eine geringe Sekretion des Interleukins. Jedoch war die, im Vergleich zur nächst höheren Konzentration, geringere Ausschüttung bei 25 µg/ml ein Hinweis darauf, dass das Konjugat bei dieser Konzentration toxisch auf die Zellen wirkte und im Vergleich zu den Untersuchungen der PERV-Präparation und des HERV-K TM-Proteins, bewirkte das K137 nur eine geringe Sekretion an IL-10.

Für die FACS- und Foxp3 Real-Time PCR-Untersuchungen wurden daraufhin die Zellen verwendet, die mit den nicht toxisch wirkenden K137-Konzentrationen inkubiert worden sind und IL-10 Sekretion aufwiesen. In der FACS-Analyse (Abb. 3.25) dieser Zellen konnte bei beiden Konzentrationen einen geringer Anstieg der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population um 0,6 % nachgewiesen werden. Beide Spender wiesen vergleichbare Werte auf, jedoch war keine konzentrationsabhängige Abnahme des Effektes zu erkennen. Bei Spender 2 erfolgte sogar bei geringerer Konzentration des K137 eine leichte Zunahme in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population.

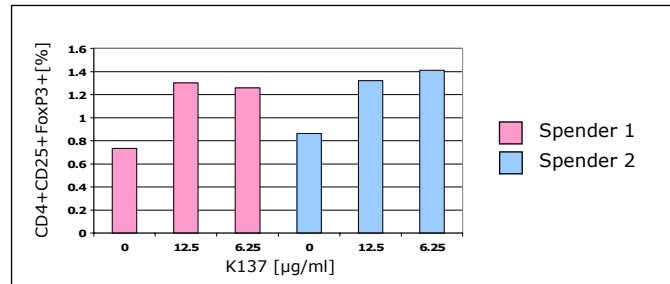


Abb. 3. 25 Prozentualer Anteil an CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Lymphozyten nach 24h Inkubation mit K137

Induktion in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Lymphozytenpopulation von zwei Spendern nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des Peptid-Heteropolymers K137. Im Vergleich dazu die CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Lymphozytenpopulation unbehandelter PBMCs.

Die Ergebnisse der FoxP3-Transkriptionsleveluntersuchung mittels Real-Time PCR (Abb. 3.26) stimmten mit denen der FACS-Analyse überein: die Δ Ct-Werte waren leicht aber nicht signifikant erhöht. Jedoch wurde kein konzentrationsabhängiger Anstieg in den Δ Ct-Werten ersichtlich. Im Gegenteil, die Δ Ct-Werte nahmen trotz der Exposition mit geringerer Menge an K137 um ca. 0,5 Ct-Werte zu.

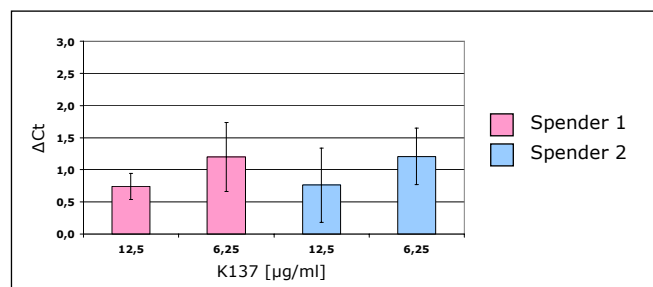


Abb. 3. 26 Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in humanen PBMCs nach 24h Inkubation mit K137

Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in den PBMCs zweier Spender nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des Peptid-Heteropolymers K137, dargestellt durch die Δ Ct Werte (Ct-Werte der unbehandelten PBMCs abzüglich der Ct-Wertes der behandelten PBMCs).

Schließlich sollte unter Verwendung der beiden unterschiedlichen Proliferationsassays überprüft werden, ob das Peptid-Homopolymer inhibierend auf die Mitogen-induzierte Proliferation muriner Lymphozyten wirkte. In beiden Assays wurde deutlich, dass, im Vergleich zu den unbehandelten PBMCs, in Korrelation zu den verschiedenen Konzentrationen an appliziertem Protein eine Hemmung in der Lymphozytenproliferation erfolgte (Abb. 3.27). Außerdem wurde durch den Alamar Blue Assay, wie im IL-10 ELISA deutlich, dass das K137 bei einer Konzentration von 25 µg/ml toxisch auf die Zellen wirkte.

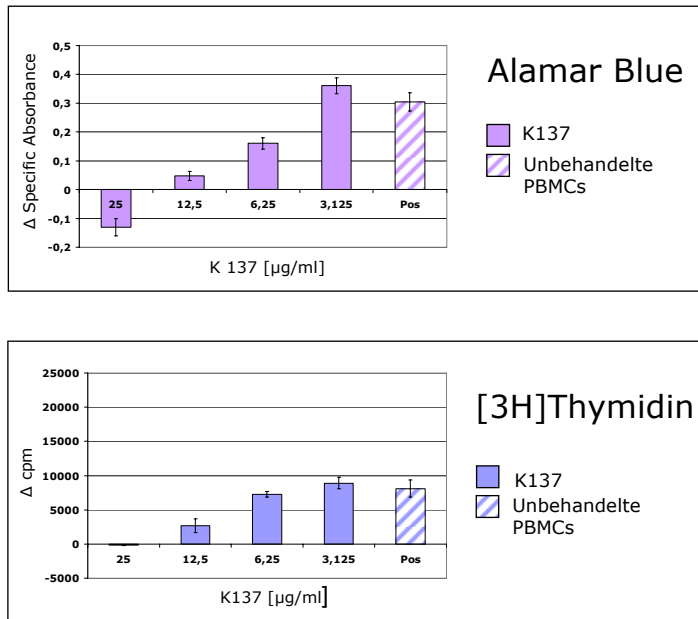


Abb. 3. 27 Inhibition der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation nach 24h Stunden Inkubation mit K137 im Alamar Blue und [3H] Thymidin Inkorporations-Assay

Inhibition der Mitogen-induzierten Proliferation muriner Lymphozyten nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des Peptid-Heteropolymers K137. Im Vergleich dazu die Mitogen-induzierte Proliferation von stimulierten unbehandelten murinen Lymphozyten. Dargestellt sind die Werte abzüglich der unstimulierten Zellen.

Die Untersuchung der Treg-Induktion durch das Peptid-Homopolymer K137 zeigten, dass es bei 24-stündiger Inkubation mit den PBMCs eine geringe Sekretion an IL-10, ebenso einen geringen Anstieg in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population sowie im FoxP3-Transkriptionslevel bewirkte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es inhibierend auf die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation wirkte. In diesen Versuchen konnte teilweise eine konzentrationsabhängige Wirkung demonstriert werden und dass die Effekte weitgehend spenderunabhängig waren. Eine minimale Wirkkonzentration des K137 lag bei ca. 6,25 µg/ml.

4. Diskussion

4.1 Induktion von regulatorischen T-Zellen durch die inaktivierte PERV-Präparation

Einige retrovirale Infektionen sind begleitet von schweren Immunsuppressionen, die meist fatal für den betroffenen Wirt verlaufen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Gammaretroviren PERV, KoRV und FeLV in der Lage sind, durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen dem Immunsystems des Wirtes zu entgehen bzw. dieses zu supprimieren und sich zu vermehren. Infektionen mit KoRV und FeLV sind durch schwere Immunsuppressionen charakterisiert und PERV stellt im Hinblick auf die Xenotransplantation eine potentielle Gefahr dar. Da die transmembranen Hüllproteine dieser Retroviren homologe Sequenzen aufweisen, kann man erste Hinweise auf den Einfluss und Funktion der retroviralen TM-Proteine sowie der hochkonservierten ISU-Domäne sammeln.

4.1.1 Herstellung von retroviralen Präparationen

Präparationen dieser Retroviren sollten mittels infizierter Zelllinien und Separation mit Hilfe der Saccharose-Gradientenzentrifugation erstellt werden und auf die Fähigkeit, Tregs zu induzieren, überprüft werden. Im Hinblick auf die Isolierung der Viruspartikel wurden die infizierten Zellen über mehrere Wochen in Kultur gehalten werden, da für den Separationsprozess ein großes Volumen an Kulturüberstand notwendig war. Die Untersuchung der Separation mittels Saccharose-Gradienten zeigte jedoch, dass nicht alle Präparationen erfolgreich waren: während die PERV-Präparation im Gradienten bei einer Dichte von 1,16 g/ml bandete, konnte man bei den KoRV- und FeLV-Präparationen jeweils keine distinkte Bande erkennen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die mit KoRV und FeLV infizierten Zellen die Virusproduktion wahrscheinlich schon nach kurzer Zeit einstellten bzw. keine Durchinfektion stattgefunden hat. Da die Virusproduktion für die Zelle ein schwächender Prozess darstellt, hatten die nicht-infizierten Zellen wahrscheinlich einen entscheidenden Wachstumsvorteil gegenüber den infizierten Zellen. In den gesammelten Kulturüberständen befanden sich so wenig Retroviruspartikel, dass keine Bande bei einer Dichte von 1,16 g/ml zu detektieren war. Diese Präparationen waren nicht für weitere Untersuchungen geeignet, da für die Experimente der Treg-Untersuchung eine hohe Konzentration an Viruspartikeln nötig ist. Die PERV-Präparation hingegen entsprach allen Kriterien eines porzinen endogenen Retrovirus: die Bande im Saccharose-Gradienten bei 1,16 g/ml, die charakteristischen Gag-Banden im SDS-Gel sowie der Nachweis des PERV-spezifischen p15E-Proteins im Western Blot (Abb. 3.2). Da die Virus-Präparation bei -20 °C gelagert und zwischendurch mehrmals aufgetaut wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass die Partikel inaktiviert und daher nicht mehr infektiös waren. Diese Präparation wurde daraufhin für die Untersuchung, ob Retroviren in der Lage sind, immunmodulatorisch durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen zu wirken, eingesetzt.

4.1.2 Funktionalität der inaktivierten PERV-Präparation

Die Untersuchung der inaktivierten PERV-Präparation zeigte, dass sie konzentrationsabhängig die IL-10 Sekretion humaner PBMCs stimulierte (Abb. 3.12) und spenderabhängig bezüglich der Wirkintensität einen Anstieg um bis zu 1 % in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population induzierte (Abb. 3.13). Die Ergebnisse der FoxP3-Transkriptionsleveluntersuchung mittels Real-Time PCR jedoch waren nicht eindeutig bzw. beim Vergleich der beiden Spender widersprüchlich zu den Ergebnissen des ELISAs und der FACS-Messung (Abb. 3.14). Zusätzlich konnte keine Inhibition, sondern eine Stimulation der Mitogen-induzierten Proliferation von murinen Lymphozyten gezeigt werden (Abb. 3.15). Letzteres jedoch wurde schon 1985 von Denner et al. untersucht und beschrieben, dass Retroviren bei geringen Konzentrationen eher immunaktivierend bzw. stimulierend als hemmend auf die Proliferation immunkompetenter Zellen wirken, da die enthaltenen Glykoproteine einen Mitogen-induzierenden Effekt besitzen. Um inhibierende Effekte durch die PERV-Präparation zu erhalten, müssten wahrscheinlich in einem weiteren Versuch höhere Konzentrationen eingesetzt werden. Für die gering unterschiedlichen Ergebnisse mit den humanen PBMCs gibt es mehrere Interpretationsansätze: schon in vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe wurde ersichtlich, dass die Assays in Bezug auf die Aktivität und Sensitivität der isolierten PBMCs große Unterschiede in Abhängigkeit vom Spender und Zeitpunkt der Blutabnahme zeigten [Behrendt et al. 2005]. Die Zusammensetzung und der Zustand der isolierten PBMCs sind auf den jeweiligen Immunstatus des Spenders zurückzuführen, der jedoch schwer erfassbar ist. Selbst unbemerkte Krankheiten des Spenders oder der Kontakt mit einer erkrankten Person können zu einer Aktivierung des Immunsystems und dadurch zu einer Ausschüttung diverser Zytokine führen, die *in vitro* einen starken Einfluss auf die sensitiven Assays haben. Ansätze zur Standardisierung der Ausgangs-PBMCs für die *in vitro* Assays stellen z.B. die Analyse der isolierten PBMCs mittels Durchflusszytometrie oder der Einsatz einer standardmäßig etablierten Zelllinie dar. Somit könnten spenderabhängige Schwankungen vermindert bzw. eliminiert werden und die Effekte allein auf die Inkubation mit dem betreffenden retroviralen Protein zurückzuführen werden.

Die Ergebnisse der Real-Time PCR zur Analyse des FoxP3-Transkriptionslevels sind äußerst kritisch zu betrachten: wichtig für die Evaluierung eines Transkriptom durch die Real-Time PCR ist die Normalisierung mittels eines Referenzgens. Um Variationen in der RNS/cDNS-Ausgangsmenge und der Reversen Transkriptase-Aktivität auszugleichen, müssen die während einer Real-Time PCR erfassten Ct-Werte bezüglich eines Zielgens auf die Ct-Werte eines Referenzgens normalisiert werden. Da das Referenzgen unter den experimentellen Konditionen nicht variieren soll, werden üblicherweise sogenannte *housekeeping*-Gene (HGK) verwendet, die ubiquitär und funktionell homogen verbreitet sind [Bustin & Nolan 2004]. Vor der Foxp3 spezifischen TaqMan Sonden Real-Time PCR, die mit dieser Arbeit etabliert werden sollte, wurde eine SYBRGreen Real-Time PCR verwendet, um das FoxP3 Transkriptionslevel zu untersuchen. Bei den Untersuchungen mittels SYBRGreen Real-Time PCR stellte sich jedoch heraus, dass durch Inkubation mit den retroviralen Proteinen nicht nur eine Induktion von FoxP3 sondern auch der Housekeeping-Gene erfolgte, so dass eine Normalisierung auf diese Art und Weise leider unmöglich war. Darüber hinaus gab es immer wieder Kontaminationen in der -(minus)RT-Kontrolle, so dass eine spezifischere Sonden Real-Time PCR eingeführt werden sollte. Da die Verwendung von *housekeeping*-Genen nicht möglich war, sollte die Sonden Real-Time PCR

durch den Einsatz gleicher Mengen an cDNS normalisiert werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass die photometrische Bestimmung der cDNS nicht zuverlässig war und es entsprechend zu Schwankungen in den FoxP3 Real-Time PCR Ergebnissen kam. Alle Real-Time PCR Ergebnisse dieser Arbeit müssen daher kritisch betrachtet werden und bedürften einer korrekten Normalisierung. Dies wäre durch den Einsatz einer so genannten „Alien RNS“, einer externen, gespikten RNS-Kontrolle deren Konzentration bekannt ist, möglich. Dieses soll zukünftig untersucht und etabliert werden. Fontenot et al. [2003] berichten von einer möglichen FoxP3 Regulation auf post-translationaler statt auf transkriptioneller Ebene, welches, abgesehen von den starken Schwankungen, die Divergenz zwischen dem experimentell erfassten FoxP3 Genotyp und Phänotyp erklären könnte. Darüber hinaus sind die für Transkriptionsfaktoren kodierenden mRNS relativ instabil [Ross 1995], weshalb eine FoxP3-mRNS Detektion mittels Real-Time PCR zusätzlich erschwert wird.

Unter Berücksichtigung der spenderbedingten Schwankungen, der nicht verwendbaren FoxP3 Real-Time PCR Ergebnisse sowie der Erfahrung, dass die Präparation wahrscheinlich erst höher konzentriert eingesetzt inhibierend auf die Lymphozytenproliferation wirkt, kann im Hinblick auf die Treg-Induktion durch die Inkubation mit der PERV-Präparation geschlossen werden, dass wahrscheinlich eine geringe Population an regulatorischen T-Zellen induziert wurde. Die hohe IL-10 Sekretion ist ein distinkter Beleg für einen immunsuppressiven Effekt und stellt das geeignete Milieu für die Induktion der Tregs dar. Ebenso konnte durch die FACS-Messung bei den PBMCs 1 ein deutlicher Anstieg in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population gezeigt werden (Abb. 3.13), was dafür spricht, dass die nTreg-Population sich erhöht hat. Ungeklärt ist allerdings, ob die natürlich vorhandenen nTregs sich vermehrten oder ob sie aus naiven CD4⁺ Zellen aufgrund der Stimulation durch die Präparation, hervorgegangen sind. Im Falle von Spender 2 könnten auch aTregs induziert worden sein, da bei diesem eine hohe IL-10 Ausschüttung (Abb. 3.12) aber nur ein leichter Anstieg in der nTreg-Population stattfand. Eventuell wurden Tr1-Zellen im Zuge der „infektiösen Toleranz“ induziert, die sich durch eine hohe Ausschüttung von IL-10 auszeichnen aber nicht den nTreg-Phänotyp aufweisen. Allerdings könnten die geringen Anstiege in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population auch experimentelle Schwankungen darstellen, weshalb eine Signifikanzgrenze mittels mehrerer Messreihen definiert werden müsste.

Inwieweit das TM-Protein an den eben beschriebenen Wirkungen beteiligt ist, ist jedoch unklar. Da das TM-Protein im Vergleich zu den Gag-Proteinen eines Retrovirus mengenmäßig unterrepräsentiert ist, ist dies eine mögliche Erklärung dafür, dass selbst eine hohe Konzentration der PERV-Präparation nur eine geringe Induktion von Tregs zur Folge hatte. Hinzu kommt, dass die Aufreinigung der Präparation nicht vollständig erfolgreich war und sich darin, wie in Abb. 3.2 zu sehen ist, noch zelluläre Proteine befanden, die die Präparation kontaminierten.

Ebenso zeigten Versuche, in denen das p15E-Protein der PERV-Präparation im SDS-Gel prozentual abgeschätzt wurde, dass von 3124 µg/ml Gesamtvirus nur etwa 30 µg/ml, also ca. 0,96% dem p15E entsprachen. Und tatsächlich kommen laut Chertova et al. 2002 im Falle von HIV-1 z.B. auf 1200-2500 gag Moleküle pro Virion nur ca. 21-45 SU- bzw. TM-Moleküle (~1,7%).

4.2 Induktion von regulatorischen T-Zellen durch das rekombinante HERV-K TM-Protein

4.2.1 Herstellung des rekombinanten HERV-K TM-Proteins in *H. polymorpha*

Zur Überprüfung, ob die TM-Proteine auch in Abwesenheit der restlichen retroviralen Proteine in der Lage sind, immunsuppressiv durch die Induktion von Tregs zu wirken, wurde ein retrovirales TM-Protein rekombinant hergestellt und aufgereinigt. Dazu wurde ein eukaryotisches Expressionssystem verwendet, weil Lipopolysaccharide (LPS) die Zytokinsekretion von PBMCs und somit die Treg-Untersuchung beeinflussen könnten. Als Expressionssystem wurde der Organismus *H. polymorpha* gewählt, da die Produktion mittels Hefen im Vergleich zu anderen eukaryotischen Expressionssystemen geeignet bzw. erprobt ist und Proteine im großen Maßstab hergestellt werden können („*scale up*“), was im Hinblick auf die Treg-Experimente von besonderem Interesse war. Darüber hinaus werden die Zielproteine weitgehend konformations-nativ produziert, was für die Funktionalität des Proteins besonders wichtig ist, da die Proteine im eukaryotischen Organismus während der post-translationalen Modifikationen N-glykosyliert werden. Die Oligosaccharidketten haben, wie in Abschnitt 1.1.4 beschrieben, relevante biologische Funktionen und sind somit essentiell für die korrekte Konformation und Aktivität eines Proteins. Die Analyse der Glykosylierungsmuster mittels PNGase F (Abb. 3.18) wurde möglicherweise durch das SDS am Protein gehindert, so dass ein Vergleich zwischen den Wirkungen eines glykosylierten mit denen eines nicht-glykosylierten Protein nicht gezogen werden konnte. Versuche, das SDS am Protein mittels photometrischer Bestimmung bei einer Wellenlänge von 651 nm zu quantifizieren [Puchades et al. 1999], schlugen fehl.

Als herzustellendes Protein wurde das TM-Protein des humanen endogenen Retrovirus-K, das gp36, gewählt, da die Sequenz zur Verfügung stand und gezeigt werden konnte, dass HERV-K in malignen Tumoren überexprimiert vorliegt [Büscher et al. 2005, 2006]. Um Rückschlüsse auf *in vivo* Funktionen des TM-Proteins eines endogenen Retrovirus ziehen zu können, inwiefern es immunmodulatorisch in das Wirtssystem einzugreifen und so das Tumorstadium zu unterstützen vermag und ob dieser immunmodulatorische Mechanismus auf der Induktion von regulatorischen T-Zellen beruht, sollte *in vitro* untersucht werden.

Während dieser Diplomarbeit konnte zum ersten Mal ein rekombinantes retrovirales TM-Protein in einem eukaryotischen Expressionssystem in ausreichender Menge für die Untersuchung der Treg-Induktion hergestellt werden. Die Erzeugung eines rekombinanten Proteins mittels des *H. polymorpha* Expressionssystems hat sich somit als besonders günstig und reproduzierbar herausgestellt und könnte für die endotoxinfreie Produktion weiterer retroviraler TM-Proteine verwendet werden.

Das rekombinant hergestellte und aufgereinigte HERV-K TM konnte anhand spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Dieses wurde für die Überprüfung, ob retrovirale TM-Proteine in der Lage sind immunsuppressiv über die Induktion von regulatorischen T-Zellen zu wirken und somit das Tumorstadium zu favorisieren, eingesetzt.

4.2.2 Funktionalität des rekombinanten HERV-K TM-Proteins

Bei den Untersuchungen mit dem rekombinanten TM-Protein von HERV-K zeigte sich, dass es konzentrationsabhängig bei den humanen PBMCs eine hohe IL-10 Sekretion (Abb. 3.16+3.19), einen Anstieg in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population (Abb. 3.17+3.20) sowie eine Inhibition der Mitogen-induzierten Proliferation muriner Lymphozyten induzierte (Abb. 3.22). Darüber hinaus konnte die mittels des HERV-K TM-Protein stimulierte Ausschüttung weiterer anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-6 und in geringer Menge TGF- β , gezeigt werden (Abb. 3.23). Die Ergebnisse der FoxP3 Transkriptionslevel-Untersuchung (Abb. 3.18+3.21) jedoch können, wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, aufgrund der notwendigen Normalisierung der Real-Time PCR nicht verwertet werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen der PERV-Präparation, konnte gezeigt werden, dass das rekombinante TM-Protein bei geringeren Konzentrationen höhere Treg-spezifische Wirkungen induzieren kann. Eine minimale Konzentration des HERV-K TM-Proteins, bei der noch Wirkungen auftraten, aber unspezifische Effekte durch das SDS ausgeschlossen werden konnten, konnte zwischen den eingesetzten Konzentrationen 2,5-0,25 $\mu\text{g/ml}$ eingegrenzt werden.

Analog zu den Untersuchungen mit der Retrovirus-Präparation führte auch bei den Untersuchungen mit dem rekombinanten TM-Protein eine gewisse Spender- und Tagesabhängigkeit zu gering unterschiedlichen Ergebnissen. Einer der Spender zeigte einen höheren Anstieg in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population oder eine höhere IL-10 Sekretion als der andere Spender. Ebenso auffällig war, dass die CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population im ersten Versuch bei gleichen Konzentrationen einen geringeren Anstieg zur Folge hatte als im darauf folgenden Versuch (Abb. 3.17+3.20). Entsprechend könnten die IL-10 Daten gedeutet werden, bei denen im Folgeversuch eine viel höhere Sekretion stattfand als im ersten, obwohl die PBMCs der gleichen Spender verwendet wurden (Abb. 3.16+3.19). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um einen experimentellen Fehler handelt, da der Anstieg bei beiden Spendern gleich ist. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um einen experimentellen Fehler oder eine echte Spender- bzw. Tagesabhängigkeit handelte, müsste eine Messreihe mit verschiedenen Spendern innerhalb mehrerer Wochen durchgeführt werden. Dennoch sind Tendenzen in den Ergebnissen erkennbar, die auf eine Induktion von regulatorischen T-Zellen durch die Inkubation mit dem rekombinanten HERV-K TM-Protein schließen lassen. Die hohe IL-10 Sekretion sowie der Anstieg in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population sind ein Hinweis darauf, dass nTregs induziert worden sind. Analog zu den PERV-Ergebnissen ist jedoch auch beim HERV-K TM-Protein strittig, ob es zur Expansion bestehender nTregs oder zur Umwandlung von naiven CD4⁺ Zellen zu nTregs kommt. Zusätzlich ist eine Induktion von aTregs durch die nTregs nicht ausgeschlossen, da sie sich ebenfalls durch eine hohe IL-10 Sekretion auszeichnen. Die Änderung im FoxP3 Transkriptionslevel durch Inkubation mit dem HERV-K TM-Protein sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Ergebnisse des Zytokin-Arrays sind kritisch zu betrachten: da jedes Zytokin nach unterschiedlichen Zeitintervallen ausgeschüttet wird und individuell mehr oder weniger schnell an seinen Zielrezeptor bindet und dementsprechend mehr oder weniger im Überstand akkumuliert, müsste man die Kinetik und Biologie der einzelnen Zytokine näher untersuchen. So haben Rodel et al. [2004] zeigen können, dass es zu einer maximalen Sekretion von TGF- β durch Stimulation innerhalb der ersten 4-8 h und anschließend erst wieder nach 24-30 h kommt. Daher könnte es

sein, dass TGF- β nach 24 h Inkubation nicht frei im Überstand der stimulierten Zellen vorhanden war und es daher nur schwach detektiert werden konnte. Ein weiteres Indiz dafür, dass TGF- β Sekretion induziert wurde, ist der Nachweis von MCP-1 im Zytokin-Array, welches durch die Ausschüttung von TGF- β stimuliert werden kann [Matagrano et al. 2003]. Da TGF- β ebenso eine Schlüsselrolle bei der Treg-Induktion spielt bzw. von Tregs ausgeschüttet wird wie das IL-10, stellt der TGF- β Nachweis im Array durch die Inkubation mit dem rekombinanten HERV-K TM-Protein einen weiteren Anhaltspunkt dafür dar, dass regulatorische T-Zellen induziert worden sind. Um jedoch einen eindeutigen Beweis hierfür zu erhalten, müsste ein TGF- β spezifischer *capture* ELISA eingeführt werden, der die Kinetik der TGF- β Sekretion berücksichtigt. Ebenso müsste ein IL-2 spezifischer ELISA zur Untersuchung der IL-2 Ausschüttung herangezogen werden, da dieses in Anwesenheit von Tregs herunterreguliert wird und somit einen weiteren Marker für die Treg-Induktion darstellt. Abgesehen davon konnte durch diesen Assay gezeigt werden, dass das rekombinante HERV-K TM-Protein mit den PBMCs interagiert und im Allgemeinen zytokinmodulatorische Wirkungen induziert.

Für HERV-K konnte also eine Induktion von regulatorischen T-Zellen durch das TM-Protein gezeigt werden und geht mit den Ergebnissen von Mangeney et al. 2005 konform, die bereits zeigen konnten, dass die TM-Proteine von endogenen Retroviren (ERV) in Tumoren Tregs induzieren können, um somit dem Immunsystem zu entgehen. Um die Induktion der Tregs während retroviraler exogener Infektionen auf die TM-Proteine näher zu untersuchen, wäre es unbedingt nötig, die TM-Proteine weiterer Retroviren, wie beispielsweise das p15E von FeLV oder KoRV, rekombinant herzustellen und deren Wirkung auf humane PBMCs zu untersuchen. Fraglich bleibt der Mechanismus der Induktion, da bisher nicht geklärt ist, inwieweit die retroviralen TM-Proteine mit Rezeptoren auf CD4⁺ Lymphozyten interagieren können. Kizaki et al. haben bereits 1991 für das p15E von FeLV spezifische Interaktionen mit humanen PBMCs nachweisen können und schlossen so auf dessen mögliche Involvierung in der Immundysfunktion während einer retroviralen Infektion. Darüber hinaus gehend beschreiben Quintana et al. 2005 eine Ko-Interaktion des konservierten gp41 Fusionspeptides (FP) von HIV-1 mit CD4- und TZR-Molekülen auf T-Lymphozyten während des Fusionsprozesses, welches zur Inhibition der Antigen-spezifischen T-Zell Aktivierung führt. Von der Arbeitsgruppe um Quintana konnte *in vitro* demonstriert werden, dass das FP mit dem TZR ko-präzipitiert und die Antigen-spezifische T-Zell Proliferation sowie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine inhibiert. Da jedoch das in dieser Arbeit erstellte HERV-K TM-Protein ohne FP-Sequenz kloniert bzw. erstellt wurde, ist ein Interagieren des TM-Proteins unabhängig von der FP-Domäne wahrscheinlich. Diese Interaktionen vermögen durch CD4- bzw. TZR-Kostimulation vorhandene nTregs zur Proliferation anzuregen oder die Differenzierung naiver CD4⁺ Zellen in nTregs zu induzieren.

In dieser Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass das TM-Protein von HERV-K in der Lage ist, regulatorische T-Zellen *in vitro* zu induzieren. Da es in einer sehr reinen Form vorhanden war, war auch nur wenig Protein notwendig, um spezifische Wirkungen zu induzieren. Die Problematik der Konformationsnativität und die dadurch bedingte biologische Aktivität trotz N-Glykosylierungen durch den wirtsfremden eukaryotischen Organismus, wirft die Frage auf, ob die Effektivität bei humanen N-Glykosylierungen entsprechend höher wäre. Dazu müsste künftig eine humane Zelllinie zur Produktion des HERV-K TM-Proteins oder eine transfizierte humane

Zelllinie, die das TM-Protein auf der Oberfläche präsentiert, für die Treg-Untersuchungen herangezogen werden.

Die vorhandenen Daten lassen den Schluss zu, dass durch die Induktion von Tregs und der damit verbundenen Immundysfunktion die Expression des TM-Proteins von HERV-K das Tumorstadium favorisieren kann. Um dies auch für die HIV-Pathogenese zu untersuchen, ist es unbedingt notwendig, das gp41 auf sein Potential, regulatorische T-Zellen zu induzieren, zu untersuchen. Dieses müsste, wie das TM-Protein von HERV-K, rekombinant in *H. polymorpha* hergestellt werden und ebenso auf die Treg-Induktion untersucht werden.

4.3 Induktion von regulatorischen T-Zellen durch das Peptid-Heteropolymer

K137

4.3.1 Herstellung von biologisch aktiven ISU Peptid-Polymeren mittels EDC-Kopplung

Die Ergebnisse der Inkubation der humanen PBMCs mit der PERV-Präparation und dem rekombinanten HERV-K TM-Protein lassen darauf schließen, dass regulatorische T-Zellen während retroviraler Infektionen durch die Interaktion des TM-Proteins mit spezifischen Rezeptoren der PBMCs induziert werden könnten. Da es sich bei der ISU-Domäne um einen hochkonservierten Bereich der retroviralen TM-Proteine handelt und sich bereits als immunsuppressiv erwiesen hat [Ruegg et al. 1988, Denner et al. 1994], liegt es nahe, dass diese schließlich zur Induktion der Tregs führen kann. Um dies zu untersuchen, sollte die ISU-Domäne synthetisch und möglichst konformationsnativ hergestellt werden, was sich als recht problematisch gestaltete: frühere Untersuchungen der ISU-Domäne auf ihre immunsuppressive Aktivität haben gezeigt, dass die synthetisch erstellten ISU-Peptide nur dann biologisch aktiv waren, wenn sie an ein größeres Trägermolekül wie BSA oder Dextran gekoppelt waren [Denner et al. 1994]. Diese immunsuppressiv aktiven BSA- bzw. Dextran-Konjugate waren allerdings nicht reproduzierbar. Um eventuelle störende Einflüsse durch das Fremdmolekül zu verringern, ist man dazu übergegangen, die ISU-Peptide untereinander mittels EDC zu Homopolymeren zu koppeln [Behrendt 2005]. Diese Methode ist jedoch kritisch zu betrachten, da die Konformation der hochpolymerisierten Peptide einen großen Einfluss auf die biologische Aktivität hat. So konnte gezeigt werden, dass eine charakteristische Konformation der Peptide aufgrund der Ausbildung von spezifischen Raumstrukturen Voraussetzung für die immunsuppressive Wirkung sein könnte [Monell & Strand 1994]. Diese Raumstrukturen beinhalten vor allem bestimmte Schleifen- bzw. Loopstrukturen, deren Präsenz mit zunehmenden Vernetzungsgrad steigt, weshalb hochmolekulare Strukturen wohl eher biologisch aktiv als niedermolekulare sind. Allerdings gibt es keine Möglichkeit, diese während des Kopplungsprozesses zu kontrollieren, da es nicht nur zur Verknüpfung der primären Amino- und Carboxylgruppen sondern auch zur ungerichteten Vernetzung durch weitere funktionelle Gruppen der Monomere kommen kann, so dass die Wahrscheinlichkeit, dass eine native Konformation eingenommen wird, relativ gering ist. Da jedoch aufgrund von sterischen und energetischen Gründen favorisierte aber auch unmögliche Konformationsänderungen auftreten, erwiesen sich nur ca. 70 % der HIV/MuLV-ISU Heteropolymere als aktiv. Die einzige Qualitätskontrolle der Konjugate, die möglich war, war die Untersuchung im SDS-Gel und im Western Blot um eine erfolgreiche Kopplung und die

Ausbildung der notwendigen hochmolekularen Strukturen nachzuweisen sowie die Induktion von IL-10. So wurden für die Untersuchung der Induktion von regulatorischen T-Zellen nur die ISU-Konjugate verwendet, die im Western Blot hochmolekulare Strukturen aufwiesen (Abb. 3.11) und IL-10 induzierten.

4.3.2. Funktionalität des gp41 ISU Peptid-Heteropolymers K137

Frühere Versuche dieser Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass einige der erfolgreich gekoppelten ISU Homo- bzw. Heteropolymere immunsuppressiv wirkten [Denner et al. 1998], sie inhibierten die Proliferation immunkompetenter Zellen und stimulierten die IL-10 Sekretion humaner PBMCs. Um zu überprüfen, ob die ISU-Domäne in der Sequenz der retroviralen TM-Proteine immunmodulatorisch durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen wirken, sollte ein erfolgreich gekoppeltes HIV/MuLV ISU-Heteropolymer auf das Potential, Tregs zu induzieren, untersucht werden. Das Peptid-Heteropolymer K137, ein Pool aus Hetero-Konjugaten, welche die IL-10 Sekretion humaner PBMCs induzierten, wurde für diese Untersuchung eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass es konzentrationsabhängig und weitgehend spenderunabhängig die Sekretion geringer Mengen an IL-10 und einen geringen Anstieg in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population induziert. Außerdem hemmte es in den Versuchen ebenso konzentrationsabhängig die Mitogen-induzierte Proliferation muriner Lymphozyten. Aufgrund der fraglichen Normalisierung der Real-Time PCR sind die leichten Erhöhungen im FoxP3 Transkriptionslevels jedoch kritisch zu betrachten.

Im Vergleich zu den Untersuchungen mit der PERV-Präparation und dem rekombinanten HERV-K TM-Protein, sind die ELISA- und FACS-Ergebnisse für den Nachweis der Treg-Induktion durch Inkubation mit dem K137 weniger markant; das Wirkungsminimum des K137 befand sich bei einer viel höheren Konzentration als bei dem rekombinanten TM-Protein. Gezeigt werden konnte jedoch, dass die ISU-Domäne auch in Abwesenheit der restlichen TM-Sequenz eine leichte Induktion von Tregs bewirken kann. Was abgesehen von der Frage, welche Subpopulation an Tregs induziert wird, die Problematik aufwirft, inwiefern die ISU-Domäne in den retroviralen TM-Proteinen in der Lage ist, mit den PBMCs zu interagieren. Eine Erklärung hierfür könnte die hohe Homologie zwischen der ISU-Domäne von MuLV und der A-Helix Region von IFN- α sowie zwischen der ISU-Domäne von HIV-1 und der D-Helix Region von IFN- α darstellen (Abb.4.1).

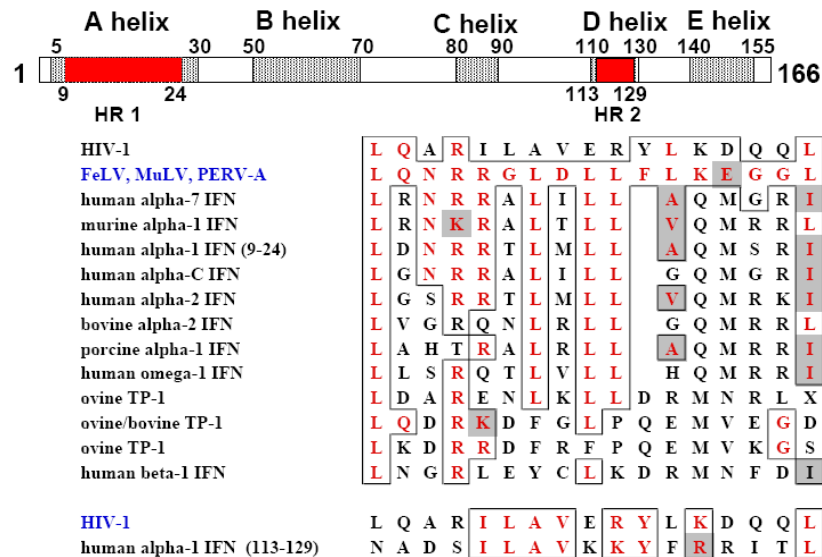


Abb. 4. 1 Aufbau der IFN- α Sequenz und Sequenzvergleich von ISU-Peptiden mit humanen IFN- α [Denner et al. 1998]

HR=Helikale Region, FeLV=felines Leukämievirus, MuLV=murines Leukämievirus, PERV=porzines endogenes Retrovirus, IFN=Interferon
 Übereinstimmungen sind in rot und konservative Austausche in grau dargestellt

IFN- α gehört zu den Typ I Interferonen, die verschiedene Aufgaben haben, wie z.B. den Schutz von Lymphozyten vor Apoptose [Marrack et al. 1999], die Suppression der Zellproliferation [Cataldi et al. 1992], das Hochregulieren von MHC Klasse-I-Molekülen [Morris & Zvetkova 1997], sowie die Modulation der Ig Produktion [Pene et al. 1988, Finkelman et al. 1990]. Darüber hinaus hat die Arbeitsgruppe um Ito et al. [2001] zeigen können, dass IFN- α die IL-10 Produktion bei dendritischen Zellen (DZ) induzieren kann, welche, wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, für die Reifung der naiven Vorläuferzellen verantwortlich sind [Steinman et al. 1991]. Die Funktionalität und Immunogenität von IFN- α hängt vor allem von strukturellen und physiologischen Aspekten ab [Kontsek et al. 1999]. Eine 3-D Strukturanalyse des Zytokins zeigte, dass es aus 5 Helices (A, B, C, D und E) und 4 Loops, welche die Helices verbinden, aufgebaut ist [Uzé et al. 1994] (Abb.4.1 und 4.2).

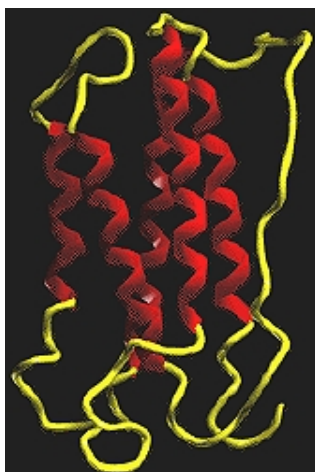


Abb. 4. 2 Theoretische 3D-Struktur von Interferon-alpha

[aus: <http://www.iit.edu/~ipro345s06/>]

Untersuchungen zu Interaktionen des IFN- α mit dem IFN- α Rezeptor (IFNAR) haben gezeigt, dass vier Rezeptor-Bindedomänen des IFN- α Moleküls nach außen präsentiert werden, die mit mindestens zwei Rezeptormolekülen interagieren. Uzé et al. gehen davon aus, dass es sich bei den vier Domänen um Bereiche in der A-Helix, dem AB-Loop, der C- sowie der D-Helix handelt. Dadurch, dass das Heteropolymer K137 Analogien zur A- und D-Helix besitzt, könnte es sein, dass eine relativ native Konformation und damit Mimikry von IFN- α erreicht wird, so dass eine Bindung an den IFN- α Rezeptor möglich sein könnte. Eine Bestätigung der IFN- α Mimikry durch Bereiche in den retroviralen TM-Proteinen *in vivo* könnte die Beobachtung darstellen, dass HIV-1 infizierte Patienten erhöhte IFN- α und $-\beta$ Antikörpertiter aufweisen. Es konnten Antikörper induziert werden, die aufgrund eines gemeinsamen immunologischen Epitops kreuzreaktiv mit der gp41 ISU-Domäne sowie mit IFN- α und $-\beta$ interagieren konnten [Chen et al. 1999]. Darüber hinaus zeigten Levings et al. [2001], dass eine Kombination von IL-10 und IFN- α die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in immunsuppressiv aktive Tr1-Zellen induziert. Durch das Imitieren von IFN- α , Binden an den spezifischen Rezeptor und Induzieren der IFN- α Signalkette, die unter anderem immunsuppressive Effekte wie die Suppression der Zellproliferation oder die Induktion von Tr1-Zellen haben, könnte die ISU-Domäne transmembraner Hüllproteine immunmodulatorisch während einer Infektion wirken. Bisher konnte dies experimentell jedoch nicht bestätigt werden.

Daneben haben Eick et al. [2000] von HIV-1 abgeleitete synthetische Peptide auf die Effekte auf TZR untersucht, und konnten zeigen, dass ein Peptid, welches die ISU-Domäne beinhaltet, als so genanntes Superantigen (SAG) fungieren kann. Superantigene sind spezifisch an der Expansion und Deletion bestimmter TZR verantwortlich, welche zur Familie der variablen $-\beta$ Kette (V β) gehören. Durch Binden der SAGs an die V β Kette des TZR sind sie in der Lage T-Zellen zu stimulieren bzw. zu deletieren und so zu einer Amplifikation bzw. Suppression der Immunantwort zu führen. Eick et al. [2000] postulieren eine CD4⁺ T-Zell spezifische SAG-Aktivität des Peptides, welches die ISU-Domäne enthält und bei Bindung an den TZR durch eine lokale Erhöhung der Zytokinproduktion zu immunmodulatorischen Effekten führen kann. Dies würde neben einer Induktion von Tr1-Zellen durch Mimikry von IFN- α auch eine leichte Erhöhung der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population durch Inkubation mit dem K137 erklären, da eine Interaktion mit dem TZR vorhandene nTregs zur Proliferation oder die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in nTregs induzieren könnte. Allerdings beinhaltet das als SAG fungierend identifizierte Peptid neben der ISU-Domäne auch Bereiche des Cystein-Cystein-Loops, so dass ein Effekt durch die ISU-Domäne allein nicht belegt wurde. Im Vergleich zu dem rekombinanten HERV-K TM-Protein sind ebenso die Treg-spezifischen Charakteristika weniger ausgeprägt, so dass die immunmodulatorischen Eigenschaften der retroviralen TM-Proteine nicht auf die hochkonservierte ISU-Domäne reduziert werden konnten. Wahrscheinlich ist jedoch, dass, im Gegensatz zum rekombinanten HERV-K TM-Protein, durch den Syntheseprozess keine native Konformation der ISU-Domäne erreicht wurde, so dass über die Wirkung der ISU-Domäne keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. Um die Wirkung der hochkonservierten Domäne näher zu untersuchen müsste ein HERV-K TM-Protein Δ ISU-Konstrukt rekombinant hergestellt werden, um zu überprüfen, ob die Deletion der ISU-Domäne zur Beeinträchtigung der Treg-Induktion führen kann.

4.4 Alamar Blue vs [3H]Thymidin-Vergleich der beiden Proliferationsassays

Ein Bestandteil dieser Diplomarbeit war es, den neuen Alamar Blue Proliferationsassay mit dem konventionellen [3H]Thymidin Inkorporations-Proliferationsassay zu vergleichen. Es gibt einige entscheidende Vorteile des Alamar Blue Assays, weswegen es von Interesse war, diesen zu etablieren und künftig für Proliferationsversuche einzusetzen. Einer dieser Vorteile ist die Vermeidung von radioaktiven Stoffen, deren Entsorgung kompliziert und kostenaufwendig ist. Während der Untersuchungen hat sich gezeigt, dass beide Assays für die Untersuchungen geeignet waren, es haben sich jedoch auch signifikante Unterschiede herausgestellt: bei der Inkubation mit dem HERV-K TM-Protein z.B. wurde ersichtlich, dass der [3H]Thymidin Assay viel sensitiver als der Alamar Blue Assay war. So wurde durch eine relativ geringe Konzentration des TM-Proteins von 3,125 µg/ml eine stark inhibierende Wirkung im [3H]Thymidin Inkorporations-Assay deutlich, während sich im Alamar Blue Assay bei dieser Konzentration keine Inhibition der Proliferation zeigte. Dies ist damit zu erklären, dass nicht nur proliferierende sondern auch lebende bzw. wachsende Zellen Metabolite ausstoßen, die im Alamar Blue Assay als Proliferationskriterium herangezogen werden. Auf der anderen Seite haben Proliferationsanalysen mit stimulierenden retroviralen Partikeln gezeigt, dass der Alamar Blue Assay auch ein Sättigungsmaximum besitzt. Da die Absorptionen von zwei Wellenlängen voneinander abgezogen werden und die Extinktion einen Maximalwert von 1 hat, kann die Differenz diesen Wert nicht überschreiten. Stimulierende Wirkungen auf die Proliferation, die im [3H]Thymidin Inkorporations-Assay durch den quasi unendlichen Einbau von [3H]Thymidin deutlich wird, können so also nicht nachgewiesen werden. Dieser Assay wird höchstens durch das frei vorhandene [3H]Thymidin limitiert. Tatsächlich wurde in einem Vergleichsversuch deutlich, dass die stimulierenden retroviralen Partikel im Alamar Blue Assay den Höchstwert von $\Delta\text{Specific Absorbance}=1$ annahmen und im Vergleich zu unbehandelten PBMCs keinen Unterschied zeigten, während sie im [3H]Thymidin Inkorporations-Assay zu einer Proliferationssteigerung um ca. 30% führten. Der konventionelle Assay eignet sich somit also eher, um einerseits schwach inhibierende und andererseits stimulierende Effekte zu detektieren sowie um Wirkungsminima zu identifizieren.

Der Alamar Blue Assay ist im Vergleich zum [3H]Thymidin Assay zwar nicht so sensitiv und weist Limitationen bezüglich der Detektion stimulierender Wirkungen auf, eignet sich aber als simpler und günstiger Schnelltest, um proliferationsinhibierende Effekte zu untersuchen.

4.5 Ausblick

Diese Arbeit gibt einen ersten Hinweis darauf, dass die TM-Proteine von Retroviren während einer Infektion Tregs induzieren, immunsuppressiv und damit auf den Infektionsverlauf unterstützend wirken. Um dies eindeutig zu belegen, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, wie die Normalisierung der Real-Time PCR mittels einer „Alien RNS“ um einen Anstieg im FoxP3 Transkriptionslevel nachzuweisen. Weiterhin sollte eine Spenderreihe durchgeführt bzw. eine standardisierte Zelllinie etabliert und eine Signifikanzgrenze ermittelt werden, sowie weitere Treg spezifische Marker, wie die erhöhte Sekretion von TGF- β bzw. das verringerte IL-2 mittels spezifischer ELISAs oder ELISpots untersucht werden. Zusätzlich müsste geklärt werden, welche Art von Tregs induziert werden bzw. ob die Erhöhung der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population durch die Expansion bzw. Proliferation vorhandener nTregs oder durch eine echte Induktion der Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu nTregs erfolgt. Das Sortieren mittels FACS bzw. MACS, um die natürlich vorhandene Population an nTregs zu depletieren ist jedoch nicht möglich, da der bisher einzige nTreg spezifische Marker FoxP3 intrazellulär vorhanden ist und eine Markierung daher zur Zerstörung der zu untersuchenden Zellen führen würde. Deswegen müsste ein weiterer nTreg spezifischer Marker, der auf der Oberfläche präsentiert wird, identifiziert und für das Sortieren herangezogen werden. Um die Wirkungen des HERV-K TM-Proteins für die TM-Proteine für alle Retroviren zu generalisieren, müssten die TM-Proteine weiterer Retroviren rekombinant hergestellt werden. Als Alternative zum Hefeexpressionssystem wäre ein humanes Zellexpressionssystem, da die Proteine aufgrund der unterschiedlichen N-Glykosylierungen konformationsnativer und daher vermutlich biologisch aktiver hergestellt werden. Für die TM-Proteine der Gammaretroviren PERV, FeLV oder KoRV, deren TM-Sequenz keine N-Glykosylierungsstellen aufweisen, wäre dies jedoch unerheblich und könnten mittels *H. polymorpha* rekombinant hergestellt werden.

Um die Rolle der ISU-Domäne bei der Treg-Untersuchung näher zu untersuchen, müssten ISU-Deletionskonstrukte rekombinant erstellt werden sowie monoklonale Antikörper, die die Epitope der ISU-Domäne binden, um eventuell vermindert eintretende Effekte zu analysieren. Um die Beweiskette vom inaktivierten Viruspartikel über das TM-Protein bis hin zur ISU-Domäne zu festigen, könnten Deletionsmutanten eines Retrovirus erstellt werden. So könnte man z.B inaktivierte HIV-Partikel, rekombinantes gp41 sowie die ISU-Domäne von gp41 synthetisieren, um zu ermitteln, welches der retroviralen Proteine für die Treg-Induktion während einer HIV-Infektion verantwortlich ist. Allerdings sind die Deletionsviren nicht infektiös, wie von der Arbeitsgruppe Dubay et al. 1992 bereits gezeigt worden ist, so dass die Anzucht unmöglich ist. Schließlich müssten die induzierten regulatorischen T-Zellen funktionell näher untersucht werden. Dazu müssten die Kulturüberstände der mit den retroviralen Proteinen behandelten PBMCs auf unbehandelte PBMCs übertragen werden, um zu überprüfen, inwieweit deren Proliferation inhibiert wird und welche Konzentration an Protein notwendig ist, um inhibierende Effekte zu induzieren um so ein mögliches Wirkungs- bzw. Signifikanzminimum zu identifizieren.

5. Zusammenfassung

Retrovirale Infektionen sowie retroviral bedingte Tumorentwicklungen sind häufig begleitet von schweren, meist lethal verlaufenden Immunsuppressionen. Bisher ist der Mechanismus der induzierten Immundysfunktion allerdings weitgehend ungeklärt. Aufgrund des hohen Konservierungsgrades der an dem Fusionsprozess beteiligten transmembranen Hüllproteine liegt es nahe, dass diese eine distinkte Rolle bei der induzierten Fehlfunktion des Immunsystems spielen und tatsächlich konnten erste Hinweise erbracht werden, dass die retroviralen TM-Proteine immunsuppressive Wirkungen *in vitro* haben. Anfang des letzten Jahrzehnts wurde eine neue Population an suppressiv aktiven T-Zellen identifiziert, die so genannten CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen, für die eine Beteiligung an retroviral bedingten Immundysfunktionen nachgewiesen werden konnte. Um den Mechanismus der Immunsuppression zu untersuchen, wurden unterschiedliche retrovirale Proteine hergestellt und auf ihr Potential, regulatorische T-Zellen *in vitro* zu induzieren, überprüft, um so Rückschlüsse auf *in vivo* Funktionen während einer Infektion bzw. der Tumorigenese ziehen zu können.

Exemplarisch für ein Gammaretrovirus wurde eine mittels Saccharose-Gradienten separierte PERV-Präparation hergestellt, welche in der Lage war, *in vitro* die IL-10 Sekretion von humanen PBMCs zu stimulieren und eine Erhöhung in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population zu induzieren. Um diese Wirkungen zu spezifizieren, wurde das TM-Protein von HERV-K erstmals rekombinant in einem eukaryotischen Expressionssystem endotoxinfrei hergestellt und ebenso *in vitro* untersucht. Dieses zeigte im Vergleich zur Virus-Präparation höhere, dosisabhängige Treg-spezifische Wirkungen, wie eine starke IL-10 Sekretion, einen Anstieg in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population und eine Induktion weiterer antiinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TGF- β humaner PBMCs sowie eine Inhibition der Mitogen-induzierten Proliferation muriner Lymphozyten. Die TM-Proteine verschiedener Retroviren enthalten einen hochkonservierten Bereich, für den, unabhängig von den restlichen viralen Proteinen, immunsuppressive Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, die so genannte ISU-Domäne. Diese wurde synthetisch mittels Kopplung hergestellt und darauf überprüft, ob sie gesondert in der Lage ist, regulatorische T-Zellen zu induzieren. Ein Heteropolymer, synthetisiert aus Monomeren der ISU-Domänen von HIV und MuLV, hat, analog zu den Untersuchungen der Viruspräparation und des TM-Proteins, *in vitro* konzentrationsabhängig die IL-10 Sekretion humaner PBMCs, eine geringe Erhöhung in der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Population, sowie eine Inhibition der Proliferation muriner Lymphozyten induziert.

Durch den Nachweis, dass die TM-Proteine von Retroviren *in vitro* Tregs induzieren können, wurde ein erster Hinweis auf eine *in vivo* Induktion und somit ein Beitrag zum Verständnis der Immunpathogenese während einer retroviralen Infektion bzw. einer endogen retroviral bedingten Tumorentwicklung erbracht.

6. Literaturverzeichnis

Aandahl E.M., Michaelsson J., Moretto W.J., Hecht F.M., Nixon D.F.: Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens.

J Virol. (2004 Mar); 78(5):2454-9.

Abbas A.K.: The control of T cell activation vs. tolerance.

Autoimmun Rev. (2003 May); 2(3):115-8.

Adorini L., Giarratana N., Penna G.: Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells.

Semin Immunol. (2004 Apr); 16(2):127-34.

Ahmad S., Choudhry M.A., Shankar R., Sayeed M.M.: Transforming growth factor-beta negatively modulates T-cell responses in sepsis.

FEBS Lett. (1997 Feb 3); 402(2-3):213-8.

Ahmed S. A., Gogal R. M., Walsh J. E.: A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay.

J. Immun. Meth. 170 (1994), 211-224.

Akbari O., Stock P., DeKruyff R.H., Umetsu D.T.: Role of regulatory T cells in allergy and asthma.

Curr Opin Immunol. (2003 Dec); 15(6):627-33.

Andrews J.M., Gardner M.B.: Lower motor neuron degeneration associated with type C RNA virus infection in mice: neuropathological features.

J Neuropathol Exp Neurol. (1974 Apr); 33(2):285-307

Antony P.A., Paulos C.M., Ahmadzadeh M., Akpınarli A., Palmer D.C., Sato N., Kaiser A., Heinrichs C., Klebanoff C.A., Tagaya Y., Restifo N.P.: Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo.

J Immunol. (2006 May 1); 176(9):5255-66.

Asseman C., Mauze S., Leach M.W., Coffman R.L., Powrie F.: An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation.

J Exp Med. (1999 Oct 4); 190(7):995-1004.

Baltimore D.: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses.

Nature. (1970 Jun 27); 226(5252):1209-11.

Barrat F.J., Cua D.J., Boonstra A., Richards D.F., Crain C., Savelkoul H.F., de Waal-Malefyt R., Coffman R.L., Hawrylowicz C.M., O'Garra A.: In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines.

J Exp Med. (2002 Mar 4); 195(5):603-16.

Battaglia M., Stabilini A., Roncarolo M.G.: Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells.

Blood. (2005 Jun 15); 105(12):4743-8. Epub 2005 Mar 3.

Becker C., Stoll S., Bopp T., Schmitt E., Jonuleit H. : Regulatory T cells: present facts and future hopes.

Med Microbiol Immunol (Berl). (2006 Sep); 195(3):113-24. Epub 2006 May 20.

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

Belkaid Y., Piccirillo C.A., Mendez S., Shevach E.M., Sacks D.L.: CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity.

Nature. (2002 Dec 5); 420(6915):502-7.

- Benbernou N., Esnault S., Shin H.C., Fekkar H., Guenounou M.: Differential regulation of IFN-gamma, IL-10 and inducible nitric oxide synthase in human T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway.
Immunology. (1997 Jul);91(3):361-8.
- Benit L., Dessen P., Heidmann T.: Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes.
J Virol. (2001 Dec); 75: 11709-11719.
- Bernstein H.B., Tucker S.P., Hunter E., Schutzbach J.S., Compans R.W.: Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is modified by O-linked oligosaccharides.
J Virol. (1994 Jan);68(1):463-8.
- Bettelli E., Dastrange M., Oukka M.: Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. (2005 Apr 5);102(14):5138-43. Epub 2005 Mar 24.
- Beyer M., Schultze J.L.: Regulatory T cells in cancer.
Blood. (2006 Apr 6).
- Bluestone J.A., Abbas A.K.: Natural versus adaptive regulatory T cells.
Nat Rev Immunol. (2003 Mar);3(3):253-7.
- Bosch B.J., van der Zee R., de Haan C.A., Rottier P.J.: The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex.
J Virol. (2003 Aug);77(16):8801-11.
- Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of Proteins utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem. (1976 May 7), 72:248-54.
- Brasseur R., Cornet B., Burny A., Vandenbranden M., Ruyschaert J.M. : Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment.
AIDS Res Hum Retroviruses. (1988 Apr);4(2):83-90.
- Brightbill H.D., Plevy S.E., Modlin R.L., Smale S.T.: A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages.
J Immunol. (2000 Feb 15);164(4):1940-51.
- Brunkow M.E., Jeffery E.W., Hjerrild K.A., Paepfer B., Clark .LB., Yasayko S.A., Wilkinson J.E., Galas D., Ziegler S.F., Ramsdell F.: Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.
Nat Genet. (2001 Jan);27(1):68-73.
- Buscher K., Trefzer U., Hofmann M., Sterry W., Kurth R., Denner J.: Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines.
Cancer Res. (2005 May 15);65(10):4172-80.
- Buscher K., Hahn S., Hofmann M., Trefzer U., Ozel M., Sterry W., Lower J., Lower R., Kurth R., Denner J.: Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines.
Melanoma Res. (2006 Jun);16(3):223-34
- Bustin S.A.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.
J. Mol. Endocrinol (2000); 25:169-193.
- Bustin SA, Nolan T.: Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.
J Biomol Tech. (2004 Sep);15(3):155-66.

Cataldi A., Santavenere E., Vitale M., Trubiani O., Lisio R., Tulipano G., Di Domenicantonio L., Zamai L., Miscia S.: Interferon affects cell growth progression by modulating DNA polymerases activity.

Cell Prolif. (1992 May);25(3):225-31.

Cavani A., Nasorri F., Prezzi C., Sebastiani S., Albanesi C., Girolomoni G.: Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses.

J Invest Dermatol. (2000 Feb);114(2):295-302.

Cederbom L., Hall H., Ivars F.: CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells.

Eur J Immunol. (2000 Jun);30(6):1538-43.

Chai J.G., Xue S.A., Coe D., Addey C., Bartok I., Scott D., Simpson E., Stauss H.J., Hori S., Sakaguchi S., Dyson J.: Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance.

Transplantation. (2005 May 27);79(10):1310-6.

Chan D.C., Fass D., Berger J.M., Kim P.S.: Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.

Cell. (1997 Apr 18);89(2):263-73.

Chen Y.H., Wu W., Yang J., Sui S.F., Sun J., Dierich M.P.: Antibodies against human IFN-alpha and -beta recognized the immunosuppressive domain of HIV-1 gp41 and inhibit gp41-binding to the putative cellular receptor protein p45.

Immunol Lett. (1999 Aug 3);69(2):253-7.

Chen S.S., Lee S.F., Wang C.T.: Cellular membrane-binding ability of the C-terminal cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane protein gp41.

J Virol. (2001 Oct);75(20):9925-38.

Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N., McGrady G., Wahl S.M.: Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3.

J Exp Med. (2003 Dec 15);198(12):1875-86.

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

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

Cheng L.E., Ohlen C., Nelson B.H., Greenberg P.D.: Enhanced signaling through the IL-2 receptor in CD8+ T cells regulated by antigen recognition results in preferential proliferation and expansion of responding CD8+ T cells rather than promotion of cell death.

Proc Natl Acad Sci U S A. (2002 Mar 5);99(5):3001-6. Epub 2002 Feb 26.

Cheng H., Maria M. Anderson, F. Claire Hankenson, Lily Johnston, Chitra V. Kotwaliwale, Julie Overbaugh: Envelope Determinants for Dual-Receptor Specificity in Feline Leukemia Virus Subgroup A and T Variants

J. Virology, (February 2006), p. 1619-1628, Vol. 80, No. 4.

Chertova E., Bess Jr J.W. Jr, Crise B.J., Sowder II R.C., Schaden T.M., Hilburn J.M., Hoxie J.A., Benveniste R.E., Lifson J.D., Henderson L.E., Arthur L.O.: Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus.

J Virol. (2002 Jun);76(11):5315-25.

Cianciolo G.J., Matthews T.J., Bolognesi D.P., Snyderman R.: Macrophage accumulation in mice is inhibited by low molecular weight products from murine leukemia viruses.

J Immunol. (1980 Jun);124(6):2900-5.

- Ciinciolo G.J., Copeland T.D., Oroszlan S., Snyderman R.: Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins.
Science. (1985 Oct 25);230(4724):453-5.
- Clerici M., Stocks N.I., Zajac R.A., Boswell R.N., Lucey D.R., Via C.S., Shearer G.M.: Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging.
J Clin Invest. (1989 Dec);84(6):1892-9.
- Clerici M., Shearer G.M.: A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection.
Immunol Today. (1993 Mar);14(3):107-11.
- Cobbold S., Waldmann H.: Infectious tolerance.
Curr Opin Immunol. (1998 Oct);10(5):518-24.
- Coutinho A., Caramalho I., Seixas E., Demengeot J.: Thymic commitment of regulatory T cells is a pathway of TCR-dependent selection that isolates repertoires undergoing positive or negative selection.
Curr Top Microbiol Immunol. (2005);293:43-71.
- Curotto de Lafaille M.A., Lino A.C., Kutchukhidze N., Lafaille J.J.: CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion.
J Immunol. (2004 Dec 15);173(12):7259-68.
- Daftarian P.M., Kumar A., Kryworuchko M., Diaz-Mitoma F.: IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha.
J Immunol. (1996 Jul 1); 157(1):12-20.
- Dalglish A.G., Beverley P.C., Clapham P.R., Crawford D.H., Greaves M.F., Weiss R.A.: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.
Nature. (1984 Dec 20-1985 Jan) 2;312(5996):763-7.
- Dash B., McIntosh A., Barrett W., Daniels R.: Deletion of a single N-linked glycosylation site from the transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 stops cleavage and transport of gp160 preventing env-mediated fusion.
J Gen Virol. (1994 Jun);75 (Pt 6):1389-97.
- Debnath A.K.: Progress in identifying peptides and small-molecule inhibitors targeted to gp41 of HIV-1
Expert Opin Investig Drugs. (2006 May);15(5):465-78.
- Dedera D.A., Gu R.L., Ratner L.: Role of asparagine-linked glycosylation in human immunodeficiency virus type 1 transmembrane envelope function.
Virology. (1992 Mar);187(1):377-82.
- Degelmann A., Muller F., Sieber H., Jenzelewski V., Suckow M., Strasser A.W., Gellissen G. : Strain and process development for the production of human cytokines in *Hansenula polymorpha*.
FEMS Yeast Res. (2002 Aug);2(3):349-61.
- de la Rosa M., Rutz S., Dorninger H., Scheffold A.: Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function.
Eur J Immunol. (2004 Sep);34(9):2480-8.
- Del Prete G., De Carli M., Almerigogna F., Giudizi M.G., Biagiotti R., Romagnani S.: Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production.
J Immunol. (1993 Jan 15);150(2):353-60.
- Delves P.J., Roitt M.: The immune system. Second of two parts.
N Engl J Med. (2000 Jul 13) ;343(2):108-17.

Denner J., Wunderlich V., Bierwolf D.: Suppression of human lymphocyte mitogen response by disrupted primate retroviruses of type C (baboon endogenous virus) and type D (PMFV). *Acta Biol Med Ger.* (1980);39(11-12):K19-26.

Denner J., Wunderlich V., Sydow G.: Suppression of human lymphocyte mitogen response by retroviruses of type D. I. Action of highly purified intact and disrupted virus. *Arch Virol.* (1985);86(3-4):177-86.

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

Denner J. How does HIV induce AIDS? The virus protein hypothesis. *J Hum Virol.* (2000 Mar-Apr);3(2):81-2

Denner J., Norley S., Kurth R.: The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *AIDS.* (1994 Aug);8(8):1063-72.

Denner J., Persin C., Vogel T., Hausteiner D., Norley S., Kurth R.: The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* (1996 Aug 15);12(5):442-50.

Denner J.: Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci.* (1998 Dec 30);862:75-86.

Denner J., Specke V., Tacke S.J., Özel M.: Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs): Diagnostic assays, adaption to human cells and infection experiments with small animals and non-human primates *Transplantationsmedizin* (2002); 14. Jahrg.; 171-183.

Dercamp C., Chemin K., Caux C., Trinchieri G., Vicari A.P.: Distinct and overlapping roles of interleukin-10 and CD25+ regulatory T cells in the inhibition of antitumor CD8 T-cell responses. *Cancer Res.* (2005 Sep 15);65(18):8479-86.

de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., de Vries J.E.: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* (1991 Nov 1);174(5):1209-20.

Dieckmann D., Bruett C.H., Ploettner H., Lutz M.B., Schuler G.: Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med.* (2002 Jul 15);196(2):247-53.

Ding L., Linsley P.S., Huang L.Y., Germain R.N., Shevach E.M.: IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol.* (1993 Aug 1);151(3):1224-34.

Dittmer U., He H., Messer R.J., Schimmer S., Olbrich A.R., Ohlen C., Greenberg P.D., Stromnes I.M., Iwashiro M., Sakaguchi S., Evans L.H., Peterson K.E., Yang G., Hasenkrug K.J.: Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity.* (2004 Mar);20(3):293-303.

Dubay J.W., Roberts S.J., Brody B., Hunter E.: Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity. *J Virol.* (1992 Aug);66(8):4748-56.

Ehrenstein M.R., Evans J.G., Singh A., Moore S., Warnes G., Isenberg D.A., Mauri C.: Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med.* (2004 Aug 2);200(3):277-85. Epub 2004 Jul 26.

- Eick A., Larned J., Jason J.: Effects of HIV-1 peptides on T-cell receptor variable beta chain families.
Hum Immunol. (2000 Oct);61(10):993-1000.
- Enk A.H., Katz S.I.: Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10.
J Immunol. (1992 Jul 1);149(1):92-5.
- Enzmann V., Faude F., Kohen L., Wiedemann P. : Secretion of cytokines by human choroidal melanoma cells and skin melanoma cell lines in vitro.
Ophthalmic Res. (1998);30(3):189-94.
- Fallarino F., Grohmann U., Hwang K.W., Orabona C., Vacca C., Bianchi R., Belladonna M.L., Fioretti M.C., Alegre M.L., Puccetti P.: Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.
Nat Immunol. (2003 Dec);4(12):1206-12. Epub 2003 Oct 26.
- Fan T., Day N.K., Luangwedchakarn V., Chang Y., Ikehara S., Lerner D.L., Haraguchi S. : The phosphorylation of phospholipase C-gamma1, Raf-1, MEK, and ERK1/2 induced by a conserved retroviral peptide.
Peptides. (2005 Nov);26(11):2165-74. Epub 2005 Jun 22.
- Fargeas C., Wu C.Y., Nakajima T., Cox D., Nutman T., Delespesse G.: Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes.
Eur J Immunol. (1992 Aug);22(8):2173-6.
- Fehervari Z., Sakaguchi S.: CD4+ Tregs and immune control.
J Clin Invest. (2004 Nov);114(9):1209-17.
- Finnegan C.M., Berg W., Lewis G.K., DeVico A.L.: Antigenic properties of the human immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein during cell-cell fusion.
J Virol. (2002 Dec);76(23):12123-34.
- Finkelman F.D., Holmes J., Katona I.M., Urban J.F. Jr., Beckmann M.P., Park L.S., Schooley K.A., Coffman R.L., Mosmann T.R., Paul W.E.: Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection.
Annu Rev Immunol. (1990);8:303-33.
- Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y.: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.
Nat Immunol. (2003 Apr);4(4):330-6. Epub 2003 Mar 3.
- Freed E.O., Myers D. J., Risser R.: Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160.
J. Virol. (1989) 63:4670-4675.
- Fuss I.J., Boirivant M., Lacy B., Strober W.: The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis.
J Immunol. (2002 Jan 15);168(2):900-8.
- Gallo S.A., Finnegan C.M., Viard M., Raviv Y., Dimitrov A., Rawat S.S., Puri A., Durell S., Blumenthal R.: The HIV Env-mediated fusion reaction.
Biochim Biophys Acta. (2003 Jul 11);1614(1):36-50.
- Garba M.L., Pilcher C.D., Bingham A.L., Eron J., Frelinger J.A.: HIV antigens can induce TGF-beta(1)-producing immunoregulatory CD8+ T cells.
J Immunol. (2002 Mar 1);168(5):2247-54.
- Garcia-Lora A., Algarra I., Collado A., Garrido F.: Tumour immunology, vaccination and escape strategies.
Eur J Immunogenet. (2003 Jun);30(3):177-83.
- Geissler E, Theile M. : Virus-induced gene mutations of eukaryotic cells.
Hum Genet. (1983);63(1):1-12

Gorelik L., Flavell R.A.: Transforming growth factor-beta in T-cell biology.
Nat Rev Immunol. (2002 Jan);2(1):46-53.

Govinden R., Bhoola K.D.: Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta.
Pharmacol Ther. (2003 May);98(2):257-65.

Granucci F., Vizzardelli C., Pavelka N., Feau S., Persico M., Virzi E., Rescigno M., Moro G., Ricciardi Castagnoli P.: Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis.
Nat Immunol. (2001 Sep);2(9):882-8.

Grohmann U., Orabona C., Fallarino F., Vacca C., Calcinaro F., Falorni A., Candeloro P., Belladonna M.L., Bianchi R., Fioretti M.C., Puccetti P.: CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo.
Nat Immunol. (2002 Nov);3(11):1097-101. Epub 2002 Sep 30.

Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J.E., Roncarolo M.G. : A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis.
Nature. (1997 Oct 16);389(6652):737-42.

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

Haraguchi S., Good R.A., James-Yarish M., Cianciolo G.J., Day N.K. : Induction of intracellular cAMP by a synthetic retroviral envelope peptide: a possible mechanism of immunopathogenesis in retroviral infections.
Proc Natl Acad Sci U S A. (1995 Jun 6);92(12):5568-71.

Harrell R.A., Cianciolo G.J., Copeland T.D., Oroszlan S., Snyderman R. : Suppression of the respiratory burst of human monocytes by a synthetic peptide homologous to envelope proteins of human and animal retroviruses.
J Immunol. (1986 May 15);136(10):3517-20.

Harris D.T., Cianciolo G.J., Snyderman R., Argov S., Koren H.S.: Inhibition of human natural killer cell activity by a synthetic peptide homologous to a conserved region in the retroviral protein, p15E.
J Immunol. (1987 Feb 1);138(3):889-94.

Hasenkrug K.J.: CD4+ regulatory T cells in chronic viral infection.
Novartis Found Symp. (2003);252:194-9; discussion 199-210.

Hebebrand L.C., Mathes L.E., Olsen R.G.: Inhibition of concanavalin A stimulation of feline lymphocytes by inactivated feline leukemia virus.
Cancer Res. (1977 Dec);37(12):4532-3.

Hebebrand L.C., Olsen R.G., Mathes L.E., Nichols W.S.: Inhibition of human lymphocyte mitogen and antigen response by a 15,000-dalton protein from feline leukemia virus.
Cancer Res. (1979 Feb);39(2 Pt 1):443-7.

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

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions.
Biotechnology 10 (1993), 413-417.

Hoffman C.S., Winston F. A. : ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli.
Gene. (1987);57(2-3):267-72.

Hori S., Nomura T., Sakaguchi S.: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.
Science. (2003 Feb 14);299(5609):1057-61. Epub 2003 Jan 9.

Huseby D., Barklis R.L., Alfadhli A., Barklis E.: Assembly of Human Immunodeficiency Virus Precursor Gag Proteins.
J. Biol. Chem. (2005 May 6), Vol. 280, Issue 18, 17664-17670.

Huston PD: The biology of the immune system.
JAMA. (1997 Dec 10) ;278(22):1804-14.

Ichihara F., Kono K., Takahashi A., Kawaida H., Sugai H., Fujii H.: Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers.
Clin Cancer Res. (2003 Oct 1);9(12):4404-8.

Inagaki A., Ishida T., Ishii T., Komatsu H., Iida S., Ding J., Yonekura K., Takeuchi S., Takatsuka Y., Utsunomiya A., Ueda R.: Clinical significance of serum Th1-, Th2- and regulatory T cells-associated cytokines in adult T-cell leukemia/lymphoma: high interleukin-5 and -10 levels are significant unfavorable prognostic factors.
Int J Cancer. (2006 Jun 15);118(12):3054-61.

Ito T., Amakawa R., Inaba M., Ikehara S., Inaba K., Fukuhara S. : Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs.
J Immunol. (2001 Mar 1);166(5):2961-9

Jarnicki A.G., Lysaght J., Todryk S., Mills K.H.: Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF-beta-Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4+ and CD8+ Regulatory T Cells.
J Immunol. (2006 Jul 15);177(2):896-904.

Jonuleit H., Schmitt E., Kakirman H., Stassen M., Knop J., Enk A.H.: Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells.
J Exp Med. (2002 Jul 15);196(2):255-60.

Kanki P.J., Hopper J.R., Essex M.: The origins of HIV-1 and HTLV-4/HIV-2.
Ann N Y Acad Sci. (1987);511:370-5.

Katz R.A., Skalka A.M.: The retroviral enzymes.
Annu Rev Biochem. (1994); 63:133-73.

Kekow J., Wachsman W., McCutchan J.A., Cronin M., Carson D.A., Lotz M.: Transforming growth factor beta and noncytopathic mechanisms of immunodeficiency in human immunodeficiency virus infection.
Proc Natl Acad Sci U S A. (1990 Nov);87(21):8321-5.

Kinter A.L., Hennessey M., Bell A., Kern S., Lin Y., Daucher M., Planta M., McGlaughlin M., Jackson R., Ziegler S.F., Fauci A.S.: CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status.
J Exp Med. (2004 Aug 2);200(3):331-43. Epub 2004 Jul 26.

Kish D.D., Gorbachev A.V., Fairchild R.L.: CD8+ T cells produce IL-2, which is required for CD(4+)CD25+ T cell regulation of effector CD8+ T cell development for contact hypersensitivity responses.
J Leukoc Biol. (2005 Sep);78(3):725-35. Epub 2005 Jul 6.

Kitani A., Chua K., Nakamura K., Strober W.: Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells.
J Immunol. (2000 Jul 15);165(2):691-702.

- Kizaki T., Mitani M., Cianciolo G.J., Ogasawara M., Good R.A., Day N.K.: Specific association of retroviral envelope protein, p15E, with human cell surfaces.
Immunol Lett. (1991 Apr);28(1):11-8.
- Klatzmann D., Champagne E., Chamaret S., Gruest J., Guetard D., Hercend T., Gluckman J.C., Montagnier L. : T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV.
Nature. (1984 Dec 20-1985 Jan 2);312(5996):767-8
- Kleinerman E.S., Lachman L.B., Knowles R.D., Snyderman R., Cianciolo G.J. : A synthetic peptide homologous to the envelope proteins of retroviruses inhibits monocyte-mediated killing by inactivating interleukin 1.
J Immunol. (1987 Oct 1);139(7):2329-37.
- Kronquist K.E., Lennarz W.J. : Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins by lipid-linked saccharides: a study of potential exogenous acceptor proteins.
J Supramol Struct. (1978);8(1):51-65.
- Kontsek P., Liptakova H., Kontsekova E. : Immunogenicity of interferon-alpha 2 in therapy: structural and physiological aspects.
Acta Virol. (1999 Feb);43(1):63-70.
- Lee S.F., Wang C.T., Liang J.Y., Hong S.L., Huang C.C., Chen S.S.: Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41.
J Biol Chem. (2000 May 26);275(21):15809-19.
- Lee C.G., Kang H.R., Homer R.J., Chupp G., Elias J.A.: Transgenic Modeling of Transforming Growth Factor- β 1: Role of Apoptosis in Fibrosis and Alveolar Remodeling.
Proc Am Thorac Soc. (2006 Jul);3(5):418-23.
- Leonard C. K., Spellman M. W., Riddle L., Harris R. J., Thomas J. N., Gregory T. J.: Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells.
J. Biol. Chem. 265 (1990):10373-10382.
- Leonard E.J., Yoshimura T.: Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1).
Immunol Today. (1990 Mar);11(3):97-101
- Letterio J.J., Roberts A.B.: Regulation of immune responses by TGF-beta.
Annu Rev Immunol. (1998);16:137-61.
- Levings M.K., Sangregorio R., Galbiati F., Squadrone S., de Waal Malefyt R., Roncarolo M.G.: IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells.
J Immunol. (2001 May) 1;166(9):5530-9.
- Levings M.K., Gregori S., Tresoldi E., Cazzaniga S., Bonini C., Roncarolo M.G.: Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells.
Blood. (2005 Feb 1);105(3):1162-9. Epub 2004 Oct 12.
- Li Y, Rey-Cuille MA, Hu SL.: N-linked glycosylation in the V3 region of HIV type 1 surface antigen modulates coreceptor usage in viral infection.
AIDS Res Hum Retroviruses. (2001 Nov 1);17(16):1473-9.
- Livak K.J., Food S.J.A., Marmaro J., Giustu W., Deetz K. (1995): Oligonukleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods and Applications 4, 357-362.
- Liyanage U.K., Moore T.T., Joo H.G., Tanaka Y., Herrmann V., Doherty G., Drebin J.A., Strasberg S.M., Eberlein T.J., Goedegebuure P.S., Linehan D.C.: Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma.
J Immunol. (2002 Sep 1);169(5):2756-61.

- Lichterfeld M., Kaufmann D.E., Yu X.G., Mui S.K., Addo M.M., Johnston M.N., Cohen D., Robbins G.K., Pae E., Alter G., Wurcel A., Stone D., Rosenberg E.S., Walker B.D., Altfeld M.: Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells.
J Exp Med. (2004 Sep 20);200(6):701-12.
- Lotz M., Seth P.: TGF beta and HIV infection.
Ann N Y Acad Sci. (1993 Jun 23);685:501-11.
- Lowenthal J.W., Zubler R.H., Nabholz M., MacDonald H.R.: Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes.
Nature. (1985 Jun 20-26);315(6021):669-72.
- Löwer R., Löwer J., Kurth R.: The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (1996):5177-84.
- Lund F.E., Garvy B.A., Randall T.D., Harris D.P.: Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease.
Curr Dir Autoimmun. (2005);8:25-54.
- Mahic M., Yaqub S., Johansson C.C., Tasken K., Aandahl E.M.: FOXP3+CD4+CD25+ Adaptive Regulatory T Cells Express Cyclooxygenase-2 and Suppress Effector T Cells by a Prostaglandin E2-Dependent Mechanism.
J Immunol. (2006 Jul 1);177(1):246-54.
- Malboeuf C.M., Isaacs S.J., Tran N.H., Kim B.: Thermal effects on reverse transcription: improvement of accuracy and processivity in cDNA synthesis.
Biotechniques. 2001 May;30(5):1074-8, 1080, 1082, passim.
- Malek T.R., Yu A., Vincek V., Scibelli P., Kong L.: CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2.
Immunity. (2002 Aug);17(2):167-78.
- Mallet F., Prudhomme S.: Retroviral inheritance in man.
J Soc Biol. (2004);198(4):399-412.
- Maloy K.J., Salaun L., Cahill R., Dougan G., Saunders N.J., Powrie F.: CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms.
J Exp Med. (2003 Jan 6);197(1):111-9.
- Mangenev M., Heidmann T.: Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A. (1998 Dec 8);95(25):14920-5.
- Mangenev M., de Parseval N., Thomas G., Heidmann T.: The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties.
J Gen Virol. (2001 Oct);82(Pt 10):2515-8.
- Mangenev M., Pothlichet J., Renard M., Ducos B., Heidmann T.: Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo.
Cancer Res. (2005 Apr 1);65(7):2588-91.
- Marrack P., Kappler J., Mitchell T. : Type I interferons keep activated T cells alive.
J Exp Med. (1999 Feb 1);189(3):521-30.
- Matagrano LB, Magida JA, McGee DW. : Transforming growth factor-beta1 enhances the secretion of monocyte chemoattractant protein-1 by the IEC-18 intestinal epithelial cell line.
In Vitro Cell Dev Biol Anim. (2003 Mar-Apr);39(3-4):183-6.
- Mayer J., Meese E.: Human endogenous retroviruses in the primate lineage and their influence on host genomes.
Cytogenet Genome Res. (2005;110(1-4)):448-56.

- McCune J. M., Rabin L. B., Feinberg M. B., Lieberman M., Kosek J. C., Reyes G. R., Weissman I. L.: Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human *Immunodeficiency virus*. (1988) 53:55-67.
- Mellor A.L., Munn D.H.: IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. (2004 Oct);4(10):762-74.
- Michaelsson J., Mold J.E., McCune J.M., Nixon D.F.: Regulation of T cell responses in the developing human fetus. *J Immunol*. (2006 May 15);176(10):5741-8.
- Miedema F.: Immunological abnormalities in the natural history of HIV infection: mechanisms and clinical relevance. *Immunodef Rev*. (1992);3(3):173-93.
- Miertus S., Tomasi J., Mazzanti G., Chiellini E.E., Solaro R., Chiellini E.: Modelling of the 3-D structure of IFN-alpha-k and characterization of its surface molecular properties. *Int J Biol Macromol*. (1997 Apr);20(2):85-95.
- Mitani M., Cianciolo G.J., Snyderman R., Yasuda M., Good R.A., Day N.K. : Suppressive effect on polyclonal B-cell activation of a synthetic peptide homologous to a transmembrane component of oncogenic retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1987 Jan);84(1):237-40.
- Mitsui T., Miyake Y., Takeya H., Osada H., Kataoka T.: RKTS-33, an epoxy-cyclohexenone derivative that specifically inhibits Fas ligand-dependent apoptosis in CTL-mediated cytotoxicity. *Biosci Biotechnol Biochem*. (2005 Oct); 69(10):1923-8.
- Monell C.R., Strand M. : Structural and functional similarities between synthetic HIV gp41 peptides and defensins. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994 Jun;71(3):315-24.
- Morgan D.A., Ruscetti F.W., Gallo R.: Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*. (1976 Sep 10);193(4257):1007-8.
- Morris A., Zvetkova I. : Cytokine research: the interferon paradigm. *J Clin Pathol*. (1997 Aug);50(8):635-9.
- Moses H.L., Serra R. : Regulation of differentiation by TGF-beta. *Curr Opin Genet Dev*. (1996 Oct);6(5):581-6.
- Mosmann T.R.: Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol*. (1994); 56:1-26.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Salki R., Horn G., Ehrlich H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. (1986); 51 Pt 1:263-73.
- Nelson B.H.: IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol*. (2004 Apr 1);172(7):3983-8.
- Nixon D.F., Aandahl E.M., Michaelsson J.: CD4+CD25+ regulatory T cells in HIV infection. *Microbes Infect*. (2005 Jun);7(7-8):1063-5. Epub 2005 Apr 15.
- North R.J., Awwad M.: Elimination of cycling CD4+ suppressor T cells with an anti-mitotic drug releases non-cycling CD8+ T cells to cause regression of an advanced lymphoma. *Immunology*. (1990 Sep);71(1):90-5.
- Obara K., Bilim V., Suzuki K., Kobayashi K., Hara N., Kasahara T., Nishiyama T., Takahashi K.: Transforming growth factor-beta1 regulates cell growth and causes downregulation of SMemb/non-muscle myosin heavy chain B mRNA in human prostate stromal cells. *Scand J Urol Nephrol*. (2005);39(5):366-71.

- Ogasawara M., Cianciolo G.J., Snyderman R., Mitani M., Good R.A., Day N.K. : Human IFN-gamma production is inhibited by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope protein. *J Immunol.* (1988 Jul 15);141(2):614-9.
- Oostendorp R.A., Meijer C.J., Scheper R.J.: Immunosuppression by retroviral-envelope-related proteins, and their role in non-retroviral human disease. *Crit Rev Oncol Hematol.* (1993 Jun);14(3):189-206.
- Oppenheim J.J., Charon J.A., Luger T.A.: Evidence for an in vivo inflammatory role of interleukin 1 (IL 1). *Transplant Proc.* (1982 Sep);14(3):553-5.
- Ormandy L.A., Hillemann T., Wedemeyer H., Manns M.P., Greten T.F., Korangy F.: Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* (2005 Mar 15);65(6):2457-64.
- Palladino M.A., Morris R.E., Starnes H.F., Levinson A.D.: The transforming growth factor-betas. A new family of immunoregulatory molecules. *Ann N Y Acad Sci.* (1990);593:181-7.
- Peinniquin A., Mouret C., Birot O., Alonso A., Mathieu J., Clarençon D., Agay D., Chancerelle Y., Multon E. : Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.* (2004); 5: 3.
- Pene J., Rousset F., Briere F., Chretien I., Bonnefoy J.Y., Spits H., Yokota T., Arai N., Arai K., Banchereau J.: IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1988 Sep);85(18):6880-4.
- Piccirillo C.A., Shevach E.M.: Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol.* (2001 Aug 1);167(3):1137-40.
- Pinter A., Honnen W.J.: O-linked glycosylation of retroviral envelope gene products. *J Virol.* (1988 Mar);62(3):1016-21.
- Powell M.J., Thompson S.A.J., Tone Y., Waldmann H., Tone M.: Posttranscriptional Regulation of IL-10 Gene Expression Through Sequences in the 3'-Untranslated Region *J Immunol* (2000), 165: 292-296.
- Probst H.C., Lagnel J., Kollias G., van den Broek M.: Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance. *Immunity.* (2003 May);18(5):713-20.
- Puchades M., Westman A., Blennow K., Davidsson P.: Removal of sodium dodecyl sulfate from protein samples prior to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* (1999);13(5):344-9.
- Quintana F.J., Gerber D., Kent S.C., Cohen I.R., Shai Y.: HIV-1 fusion peptide targets the TCR and inhibits antigen-specific T cell activation. *J Clin Invest.* (2005 Aug);115(8):2149-58. Epub 2005 Jul 7.
- Reitter J.N., Desrosiers R.C.: Identification of replication-competent strains of simian immunodeficiency virus lacking multiple attachment sites for N-linked carbohydrates in variable regions 1 and 2 of the surface envelope protein. *J Virol.* (1998 Jul);72(7):5399-407.
- Riemann M., Endres R., Liptay S., Pfeffer K., Schmid R.M.: The IkappaB protein Bcl-3 negatively regulates transcription of the IL-10 gene in macrophages. *J Immunol.* (2005 Sep 15);175(6):3560-8.
- Roche. LightCycler Operator`s Manual. (1999)

- Rodel F., Schaller U., Schultze-Mosgau S., Beuscher H.U., Keilholz L., Herrmann M., Voll R., Sauer R., Hildebrandt G.: The induction of TGF-beta(1) and NF-kappaB parallels a biphasic time course of leukocyte/endothelial cell adhesion following low-dose X-irradiation.
Strahlenther Onkol. (2004 Apr);180(4):194-200.
- Romagnani S.: Th1/Th2 cells
Inflamm Bowel Dis. (1999 Nov); 5(4):285-94.
- Roncarolo M.G., Bacchetta R., Bordignon C., Narula S., Levings M.K.: Type 1 T regulatory cells.
Immunol Rev. (2001 Aug);182:68-79.
- Rosenberg E.S., LaRosa L., Flynn T., Robbins G., Walker B.D.: Characterization of HIV-1-specific T-helper cells in acute and chronic infection.
Immunol Lett. (1999 Mar);66(1-3):89-93.
- Ross J.: mRNA stability in mammalian cells.
Microbiol Rev. (1995 September); 59(3): 423-450.
- Ruegg C.L., Monell C.R., Strand M.: Identification, using synthetic peptides, of the minimum amino acid sequence from the retroviral transmembrane protein p15E required for inhibition of lymphoproliferation and its similarity to gp21 of human T-lymphotropic virus types I and II.
J Virol. (1989 Aug);63(8):3250-6.
- Ruegg C.L., Monell C.R., Strand M.: Inhibition of lymphoproliferation by a synthetic peptide with sequence identity to gp41 of human immunodeficiency virus type 1.
J Virol. (1989 Aug);63(8):3257-60.
- Runyan C.E., Poncelet A.C., Schnaper H.W.: TGF-beta receptor-binding proteins: Complex interactions.
Cell Signal. (2006 May 23).
- Sackett K., Shai Y.: How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain.
J Mol Biol. (2003 Oct 10); 333(1):47-58.
- Sadlack B., Merz H., Schorle H., Schimpl A., Feller A.C., Horak I.: Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene.
Cell. (1993 Oct 22);75(2):253-61.
- Sakaguchi S., Fukuma K., Kuribayashi K., Masuda T.: Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease.
J Exp Med. (1985 Jan 1);161(1):72-87.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M.: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.
J Immunol. (1995 Aug 1);155(3):1151-64.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Shimizu J., Yamazaki S., Sakihama T., Itoh M., Kuniyasu Y., Nomura T., Toda M., Takahashi T.: Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance.
Immunol Rev. (2001 Aug);182:18-32.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A. (1977); 74(12):5463-7.
- Schagger H., von Jagow G.: Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa
Anal Biochem. (1987 Nov 1); 166 (2): 368-79.

- Schneider-Schaulies S., Dittmer U.: Silencing T cells or T-cell silencing: concepts in virus-induced immunosuppression.
J Gen Virol. (2006 Jun);87(Pt 6):1423-38.
- Schorle H., Holtschke T., Hunig T., Schimpl A., Horak I.: Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting.
Nature. (1991 Aug 15);352(6336):621-4.
- Schubert L.A., Jeffery E., Zhang Y., Ramsdell F., Ziegler S.F.: Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation.
J Biol Chem. (2001 Oct 5);276(40):37672-9. Epub 2001 Aug 1.
- Schultz M., Clarke S.H., Arnold L.W., Sartor R.B., Tonkonogy S.L.: Disrupted B-lymphocyte development and survival in interleukin-2-deficient mice.
Immunology. (2001 Oct);104(2):127-34.
- Shevach E.M., McHugh R.S., Piccirillo C.A., Thornton A.M.: Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells.
Immunol Rev. (2001 Aug);182:58-67.
- Shimizu J., Yamazaki S., Sakaguchi S.: Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity.
J Immunol. (1999 Nov 15);163(10):5211-8.
- Shimizu J., Yamazaki S., Takahashi T., Ishida Y., Sakaguchi S.: Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance.
Nat Immunol. (2002 Feb);3(2):135-42. Epub 2002 Jan 22.
- Shnaper S., Sackett K., Gallo S.A., Blumenthal R., Shai Y. :The C- and the N-terminal regions of glycoprotein 41 ectodomain fuse membranes enriched and not enriched with cholesterol, respectively.
J Biol Chem. (2004 Apr 30);279(18):18526-34. Epub 2004 Feb 23
- Smith K.A.: Interleukin-2: inception, impact, and implications.
Science. (1988 May 27);240(4856):1169-76.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid.
Anal. Biochem. 150: 76-85.
- Smyth M.J., Takeda K., Hayakawa Y., Peschon J.J., van den Brink M.R., Yagita H.: Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy.
Immunity. (2003 Jan);18(1):1-6.
- Sohn J.-H., Choi E.-S., Kim C.-H., Agaphonov M. O., Ter-Avanesyan M. D., Rhee J.-S., Rhee S.-K.: A Novel Autonomously Replicating Sequence (ARS) for Multiple Integration in the Yeast *Hansenula polymorpha* DL-1
J. of Bacterology (Aug. 1996), p. 4420–4428.
- Stassen M., Fondel S., Bopp T., Richter C., Muller C., Kubach J., Becker C., Knop J., Enk A.H., Schmitt S., Schmitt E., Jonuleit H.: Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells.
Eur J Immunol. (2004 May);34(5):1303-11.
- Steinman R.M.: The dendritic cell system and its role in immunogenicity.
Annu Rev Immunol. (1991);9:271-96.
- Steinman R.M., Hawiger D., Nussenzweig M.C.: Tolerogenic dendritic cells.
Annu Rev Immunol. (2003);21:685-711. Epub 2001 Dec 19.

- Suzuki H., Kundig T.M., Furlonger C., Wakeham A., Timms E., Matsuyama T., Schmits R., Simard J.J., Ohashi P.S., Griesser H.: Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta.
Science. (1995 Jun 9);268(5216):1472-6.
- Tacke S.J., Kurth R., Denner J.: Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation?
Virology. (2000 Mar 1);268(1):87-93.
- Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W., Sakaguchi S.: Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4.
J Exp Med. (2000 Jul 17);192(2):303-10.
- Taoufik Y., Lantz O., Wallon C., Charles A., Dussaix E., Delfraissy J.F.: Human immunodeficiency virus gp120 inhibits interleukin-12 secretion by human monocytes: an indirect interleukin-10-mediated effect.
Blood. (1997 Apr 15);89(8):2842-8.
- Temin H.M., Mizutani S.: RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus.
Nature. (1970 Jun 27); 226(5252):1211-3.
- Tommasini A., Ferrari S., Moratto D., Badolato R., Boniotto M., Pirulli D., Notarangelo L.D., Andolina M.: X-chromosome inactivation analysis in a female carrier of FOXP3 mutation.
Clin Exp Immunol. (2002 Oct);130(1):127-30.
- Tone M., Powell M.J., Tone Y., Thompson S.A., Waldmann H.: IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3.
J Immunol. (2000 Jul 1);165(1):286-91.
- Ulich T.R., Yin S., Guo K., Yi E.S., Remick D., del Castillo J.: Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation
Am J Pathol. (1991 May);138(5):1097-101.
- Uze G., Di Marco S., Mouchel-Vielh E., Monneron D., Bandu M.T., Horisberger M.A., Dorques A., Lutfalla G., Mogensen K.E.: Domains of interaction between alpha interferon and its receptor components.
J Mol Biol. (1994 Oct 21);243(2):245-57.
- Vahlenkamp T.W., Tompkins M.B., Tompkins W.A.: Feline immunodeficiency virus infection phenotypically and functionally activates immunosuppressive CD4+CD25+ T regulatory cells.
J Immunol. (2004 Apr 15);172(8):4752-61.
- Valzasina B., Piconese S., Guiducci C., Colombo M.P.: Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent.
Cancer Res. (2006 Apr 15);66(8):4488-95.
- Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H.L., Hafler D.A.: Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis.
J Exp Med. (2004 Apr 5);199(7):971-9.
- Virelizier J.L.: Mechanisms of immunodepression induced by viruses: possible role of infected macrophages.
Biomedicine. (1975 Jul);22(4):255-61
- Wang K.S., Frank D.A., Ritz J.: Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4.
Blood. (2000 May 15);95(10):3183-90.
- Wanidworanun C., Strober W.: Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis.
J Immunol. (1993 Dec 15);151(12):6853-61.

- Weiner H.L.: Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases.
Immunol Today. (1997 Jul);18(7):335-43.
- Weiner H.L.: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells.
Microbes Infect. (2001 Sep);3(11):947-54.
- Weiss L., Donkova-Petrini V., Caccavelli L., Balbo M., Carbonneil C., Levy Y.: Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients.
Blood. (2004 Nov 15);104(10):3249-56. Epub 2004 Jul 22.
- Weissenhorn W., Dessen A., Harrison S.C., Skehel J.J., Wiley D.C.: Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41.
Nature. (1997 May) 22;387(6631):426-30.
- Wildin R.S., Ramsdell F., Peake J., Faravelli F., Casanova J.L., Buist N., Levy-Lahad E., Mazzella M., Goulet O., Perroni L., Bricarelli F.D., Byrne G., McEuen M., Proll S., Appleby M., Brunkow M.E.: X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy.
Nat Genet. (2001 Jan);27(1):18-20.
- Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C.: Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution.
Nature. (1981 Jan 29);289(5796):366-73.
- Wolf D., Rumpold H., Koppelstatter C., Gastl G.A., Steurer M., Mayer G., Gunsilius E., Tilg H., Wolf A.M.: Telomere length of in vivo expanded CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells is preserved in cancer patients.
Cancer Immunol Immunother. (2006 Oct);55(10):1198-208. Epub 2005 Dec 16.
- Woo E.Y., Chu C.S., Goletz T.J., Schlienger K., Yeh H., Coukos G., Rubin S.C., Kaiser L.R., June C.H.: Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer.
Cancer Res. (2001 Jun 15);61(12):4766-72.
- Yamaguchi T., Sakaguchi S.: Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer.
Semin Cancer Biol. (2006 Apr);16(2):115-23. Epub 2006 Jan 11.
- Zelinskyy G., Robertson S.J., Schimmer S., Messer R.J., Hasenkrug K.J., Dittmer U.: CD8+ T-cell dysfunction due to cytolytic granule deficiency in persistent Friend retrovirus infection.
J Virol. (2005 Aug);79(16):10619-26.
- Zheng S.G., Gray J.D., Ohtsuka K., Yamagiwa S., Horwitz D.A.: Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors.
J Immunol. 2002 Oct 15;169(8):4183-9.

Lehrbücher

American Cancer Society: Cancer Medicine 6
London: 2003 BC Decker Inc.

Coffin J.M., Hughes S., Varmus H.E.: Retroviruses
Plainview (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press 1997.

Delves P, Roitt I.: Encyclopedia of Immunology (2nd Edition)
San Diego: Academic Press 1998.

Modrow, S.; Falke, D. and Truyen, U. (2003): Retroviren, Molekulare Virologie (vol. 2. Auflage), Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.

Stryer L: Biochemie, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag 1995.

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Reinhardt Kurth und bei Herrn Dr. Joachim Denner für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Diplomarbeit und für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe P13 bedanken. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Denner für die ständige Ansprechbarkeit und Diskussionswilligkeit danken.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. H. von Döhren seitens der TU-Berlin für die überaus freundliche Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit sowie für die Übernahme der Funktion als Gutachter danken.

Frau Dipl. Biologin Corinna Schnöller vom Institut für molekulare Parasitologie der Humboldt Universität möchte ich für die Ermöglichung, den [3H]Thymidin Inkorporations-Assay durchführen zu können, danken.

Recht herzlich möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe P13 für das gute Arbeitsklima, vor allem Herrn Dipl. Biologe Rayk Behrendt für seine Geduld und freundliche, stets engagierte Betreuung danken. Außerdem danke ich Herrn Dr. Stefan Langhammer, der mir des Öfteren mit Rat und Tat zur Seite stand und ebenso meinen Mitstreitern Katherina Siewert und Martin Kraase für mentale Unterstützung und seelischen Aufbau.

Frau Dr. Magdalena Konzcal möchte ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

Für fortwährende und bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie und meiner Freundin Eun-ha Shin bedanken.