



# **Untersuchungen zur Induktion regulatorischer T-Zellen durch die transmembranen Hüllproteine von HIV-1 und anderer Retroviren**

**Diplomarbeit**

**Institut für Biologie  
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von**

**Levent Akyüz**

**Berlin, November 2008**

**Untersuchungen zur Induktion regulatorischer  
T-Zellen durch die transmembranen Hüllproteine von  
HIV-1 und anderer Retroviren**

**Diplomarbeit**

**Institut für Biologie  
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von**

**Levent Akyüz  
Berlin, November 2008**

Erklärung:

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

Berlin, den 13. November 2008 .....

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

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel  
Freie Universität Berlin

**Für meine Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Retroviren</b>	<b>1</b>
1.1.1 Allgemeiner Überblick der Retroviren	2
1.1.2 Aufbau und Genomstruktur der Retroviren	2
1.1.3 HIV Proteine	4
1.1.4 Die Immunsuppressive Domäne der Retroviren	7
1.1.5 Infektions- und Replikationszyklus von Retroviren (HIV-1)	9
<b>1.2 Übersicht über die Immunantwort</b>	<b>10</b>
1.2.1 Die angeborene Immunantwort	11
1.2.2 Die erworbene Immunantwort	11
1.2.3 Cytokine	12
1.2.3.1 Interleukin-10	13
1.2.3.2 Interleukin-6	14
1.2.3.3 Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	15
1.2.3.4 Interferone	15
<b>1.3 Regulatorische T-Zellen</b>	<b>16</b>
1.3.1 Natürliche und induzierbare regulatorische T-Zellen	17
1.3.2 Infektionsverlauf von HIV und FIV	18
1.3.3 Regulatorische T-Zellen bei HIV infizierten Patienten	19
1.3.4 regulatorische T-Zellen bei FIV infizierten Katzen	20
<b>1.4 Zielsetzung</b>	<b>21</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>22</b>
2.1.1 Fluorochrome	22
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Geräte	23
2.1.4 Kommerzielle Kits	25
2.1.5 Puffer	25
2.1.6 Peptide	26
2.1.7 Primer, Sonden	27

<b>2.2 Methoden</b>	<b>28</b>
<b>2.2.1 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>28</b>
2.2.1.1 Das Prinzip der quantitativen real-time PCR	28
2.2.1.2 Funktionsweise der quantitativen real-time PCR	29
2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.1.5 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen	33
2.2.1.6 RNA Konzentrationsbestimmung	34
<b>2.2.2 Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>34</b>
2.2.2.1 Polymerisierung von Peptiden	34
2.2.2.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	35
2.2.2.3 Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
<b>2.2.3 Immunologische Methoden</b>	<b>36</b>
2.2.3.1 Markierung von PBMCs mittels Antikörpern	36
2.2.3.2 Durchflusszytometrie	37
2.2.3.3 Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Interleukin-10	38
2.2.3.4 Western Blot	39
<b>2.2.4 Zellkulturtechniken</b>	<b>40</b>
2.2.4.1 Kultivierung von humanen PBMCs	40
2.2.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl	40
2.2.4.3 Isolation humaner PBMCs aus Vollblut	41
2.2.4.4 Präparation von Milzzellen aus der C57BL/6 Mauslinie	41
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>3.1 Herstellung und Charakterisierung von Peptid-Polymeren</b>	<b>42</b>
<b>3.2 Etablierung einer real time RT-PCR zur quantitativen Analyse der Expression von Cytokinen und FoxP3</b>	<b>43</b>
<b>3.3 Cytokinmodulation nach Inkubation von humanen PBMCs mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer und HERV-K TM</b>	<b>45</b>
3.3.1 Expression von IL-10 nach Inkubation humaner PBMCs mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer	45
3.3.2 Expression von INF-1 $\alpha$ nach Inkubation humaner PBMCs mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer	51
3.3.3 Expression von IL-6 nach Inkubation humaner PBMCs mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer	53
3.3.4 Einfluss von HIV-1 Isu-Homopolymer auf die Expression von IL-10 und FoxP3 bei einer Inkubation mit Mäusemilz-Zellen	55

<b>3.4 Einfluss von HIV-1 Isu-Homopolymeren auf regulatorischen T-Zellen</b> .....	<b>57</b>
3.4.1 Aktivierung der Genexpression von FoxP3 nach Inkubation mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer.....	57
3.4.2 Nachweis von Aktivierung der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> Treg nach der Inkubation mit HIV-1 Isu-Homopolymeren mittels Durchflusszytometrie.....	60
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>66</b>
<b>4.1 Sind die HIV-1 Isu- Homopolymere ein gutes Modell für die native Isu-Domäne des HI-Virus?</b> .....	<b>66</b>
4.2 IL-10 Cytokinmodulation durch HIV-1 Isu-Homopolymer.....	67
4.3 IL- 6 Cytokinmodulation durch HIV-1 Isu- Homopolymere.....	70
4.4 INF-1 $\alpha$ Cytokinmodulation durch HIV-1 Isu- Homopolymer.....	71
<b>4.5 Induktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg durch HIV-1 Isu-Homopolymere</b> .....	<b>72</b>
4.5.1 FoxP3 Aktivierung durch HIV-1 Isu-Homopolymere.....	72
4.5.2 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 Aktivierung durch HIV-1 Isu-Homopolymer.....	75
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>77</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>78</b>

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Schematischer Aufbau eines Retrovirus	3
Abbildung 1.2	RNA-Genomorganisation eines infektiösen HIV-1 Partikels	3
Abbildung 1.3	Allgemeiner Aufbau retroviraler gp41-Proteine am Beispiel von HIV-1	6
Abbildung 1.4	Sequenzvergleich der Isu-Domänen der Retroviren	7
Abbildung 1.5	Schematische Darstellung einer Retroviralen env-Region mit der Position der Isu-Domäne (ISU)	8
Abbildung 1.6	Eintritt des HIV in die CD4-Positive Zelle	9
Abbildung 1.7	Replikationszyklus von HIV-1	10
Abbildung 1.8	Der Ursprung und die Ziele von IL-10 während der Infektion	14
Abbildung 1.9	Phänotypischer Aufbau einer natürlichen regulatorischen T-Zelle	16
Abbildung 1.10	Die Suppressionsmechanismen der T-regulatorischen Zellen	18
Abbildung 2.1	Quantifizierung von Nucleinsäuren mit Hilfe der real time-RT PCR und TaqMan®-Sonden	29
Abbildung 2.2	Fluorochrome Wellenlängen Absorptionsvermögen	38
Abbildung 3.1	Exemplarische Darstellung der Peptid-Homopolymere mittels einer SDS-PAGE Analyse (A) und Western Blot Analyse (B)	42
Abbildung 3.2	Exemplarische Gradienten PCR	43
Abbildung 3.3	Analyse zum Ausschluss von Primerinterferenzen bei der real time RT PCR	44
Abbildung 3.4	Relative Genexpressionsanalysen von IL-10 (24 Stunden Kinetik)	47
Abbildung 3.5	Untersuchung der Interleukin-10 Sekretion mittels ELISA	49
Abbildung 3.6	72 Stunden Messung der IL-10 Konzentration im Zellkulturüberstand	51
Abbildung 3.7	Relative Genexpressionsanalysen von IL-10 (24 Stunden Kinetik)	52
Abbildung 3.8	Relative Genexpressionsanalysen von IL-6	54
Abbildung 3.9	Analyse der Genexpression von IL-10 und FoxP3 mittels real time RT PCR von einer 24 Stunden Kinetik.	56
Abbildung 3.10	Analyse der Expression von FoxP3 (24 Stunden Kinetik)	59
Abbildung 3.11	Exemplarische Punktwolken-Darstellung („Dot Plot“) der Durchflusszytomertie Analyse	61
Abbildung 3.12	Durchflusszytomertische Untersuchung der Tregs	62
Abbildung 3.13	Durchflusszytomertische Untersuchung der Tregs	63
Abbildung 3.14	Durchflusszytomertische Untersuchung der Tregs	64
Abbildung 4.1	Cytokin induzierte Differenzierung verschiedener T-Zelltypen	74
Abbildung 4.2	Hemmung der Lymphocytenproliferation der Tregs über APCs	76

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 2.1 Sequenz und Herkunft der verwendeten Peptid-Polymere	26
Tabelle 2.2 Zusammensetzung der SDS-Gele	36
Tabelle 3.1 Spenderliste mit Namenskürzel und Charakterisierung der Versuche	45

**Abkürzungsverzeichnis**

ad	addieren auf ein Gesamtvolumen von
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin, <i>antigen-presenting cell</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
dest.	destilliert
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid hydrochlorid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FeLV	feline leukemia virus
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FIV	feline immune deficiency virus
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HERV-K	Humanes endogenes Retrovirus K
HEX	Hexachlorfluorescein
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Isu	immunsuppressiv
kDa	Kilodalton
LP	Lysepuffer

## Abkürzungsverzeichnis

---

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

## Abkürzungsverzeichnis

---

z.B.            zum Beispiel  
ZS             Ziegenserum

### **Einbuchstabencodes für Aminosäuren**

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

### **Einbuchstabencodes für Nukleinsäuren**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

## 1. Einleitung

Bereits Ende der siebziger Jahre wurden zuerst in den USA gehäuft ähnliche Krankheitsbilder beobachtet. Den ersten Publikation dieser Krankheitsbilder (Masur et al., 1981) folgten bald ähnliche Berichte über die zunächst als „schwere erworbene Immunschwäche“ (severe acquired immunodeficiency) bezeichnete Krankheit, die bald in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen auftrat (Gottlieb et al., 1981; Siegal et al., 1981). Als Ursache unterschiedlicher phylogenetischer und biologischer Eigenschaften vom humanen Immundefizienz Virus (HIV) werden zwei Typen klassifiziert, HIV-1 und HIV-2. Obwohl beide Virustypen eine ähnliche Struktur besitzen und im Menschen Immundefizienzen auslösen, ist HIV-1 weltweit vorherrschend (Coffin et al., 1995). HIV-2-Infektionen sind vorwiegend auf Westafrika beschränkt (De Cock et al., 1993). Die Krankheitsbilder, die mit der Immunschwäche in Verbindung gebracht wurden, fasst man unter den Namen AIDS (acquired immune deficiency syndrome) zusammen. Der UNAIDS Bericht von 2008 schreibt, dass im Jahre 2007 weltweit 33 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert sind und 2 Millionen Menschen an den Folgen bereits starben. Das HI-Virus befällt CD4<sup>+</sup> Zellen des Immunsystems, vermehrt sich in ihnen und führt somit zu deren Funktionseinbuße bzw. Zerstörung, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist. Die Arbeitsgruppe um Dr. Denner konnte 2001 nachweisen, dass das vom retroviralen Hüllprotein gp41 abgeleitete Isu-Peptid bei PBMCs *in vitro* eine Cytokinmodulation hervorrufen. Folge einer Langzeit HIV Infektion ist der fortschreitende Verlust der Immunabwehr und die daraus resultierenden Krankheitsbilder. In dieser Arbeit wurden die Einflüsse retroviraler Hüllproteine auf regulatorische T-Zellen, die die Aktivierung des Immunsystems unterdrücken können, untersucht.

### 1.1 Retroviren

Peyton Rous zeigte 1911, dass mit zellfreien, filtrierten Extrakten aus Hühnersarkomen eine Virus bedingte Tumorerkrankung auf gesunde Hühner übertragen werden kann (Rous, 1911). Damit unterschied sich dieser virale Erreger als filtrierbares Agens von Bakterien. Endogene Retroviren wurden gegen Ende der 1960er Jahre entdeckt. 1964 wurde von Howard M. Temin die Provirus-Hypothese vorgeschlagen, da beobachtet wurde, dass Zellen, die durch RSV „transformiert“ wurden (erhielten Tumor-Eigenschaften), auch in Abwesenheit des Virus die transformierten Eigenschaften beibehielten. Die Vermutung, dass ganze virale Genome durch ihre Wirte nach den Mendelschen Regeln weitervererbt werden, war eine völlig neue Vorstellung. Die charakteristische Fähigkeit, den genetischen Informationsfluss umzukehren, gab der Gruppe der Retroviren ihren Namen. Die Erbinformation der Retroviren

liegt als einzelsträngige RNA vor. Sie sind in der Lage mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase RNA in DNA umzuschreiben, die dann in das Genom der Wirtszelle integriert wird.

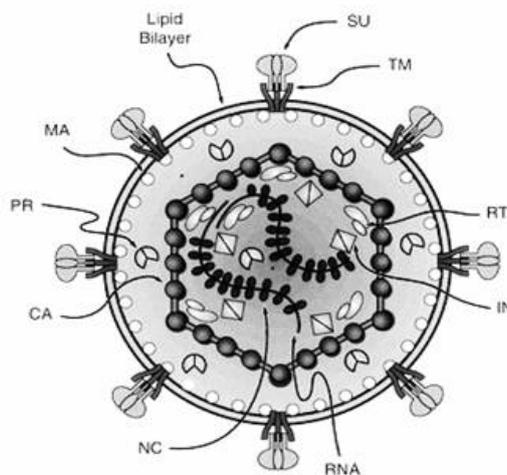
### 1.1.1 Allgemeiner Überblick der Retroviren

Die Familie der Retroviren (Retroviridae) wird in  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  -Viren, Lentiviren und Spumaviren eingeteilt. Retroviren werden des Weiteren in exogenen und endogenen Vertreter unterschieden. Zu den endogenen Retroviren gehören unter anderem das humane endogene Retrovirus K (HERV-K), das porcine endogene Retrovirus (PERV) und das Koala Retrovirus (KoRV). Das humane Immundefizienzvirus (HIV) gehört zu den Lentiviren, ein exogenes Virus mit einem komplexen Genomaufbau. Das feline Immundefizienzvirus (FIV) ist ein exogener Virus und gehört ebenfalls zu den Lentiviren (Pedersen, 1987), wohingegen das feline Leukämievirus (FeLV), ein  $\gamma$ -Retrovirus, sowohl über den endogenen, als auch über den exogenen Weg ins Genom der Wirtszelle übertragen werden kann. Die endogenen Retroviren (ERV) werden hauptsächlich über die Zellen der Keimbahn übertragen, sie können jedoch auch horizontal weitergegeben werden. Die Integration des endogenen Retrovirus ins Genom ermöglicht eine vertikale Übertragung, bis auf wenige Ausnahmen, fehlt ihnen der exogene Lebenszyklus. Viele der endogenen Retroviren sind soweit mutiert, dass sich kein intaktes Viruspartikel reproduzieren lässt. In den Genomen der meisten Säugetiere wurden inzwischen hauptsächlich defekte endogene Retroviren nachgewiesen. Das menschliche Genom besteht zu einem Teil (8%) aus diesen Retrovirus-ähnlichen, beweglichen Elementen, den sog. Retrotransposons (Kazazian, 2004). Sie sind als unvollständige Proviren fähig reverse Transkriptase (*pol*) und gruppenspezifisches Antigen (*gag*) zu kodieren.

### 1.1.2 Aufbau und Genomstruktur der Retroviren

Der Aufbau retroviraler Partikel soll am Beispiel von HIV-1 verdeutlicht werden (Abbildung 1.1). Das Virale Genom beinhaltet zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNA, die nicht durch Basenpaarung miteinander verbunden sind. Die beiden RNA-Stränge sind im Inneren des Nucleocapsidproteins (NC) komplexiert. Des Weiteren befinden sich im Viruspartikel virale Enzyme wie Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR), die eine wichtige Rolle bei der viralen Replikation und der Morphogenese spielen. Die RNA und die viralen Enzyme sind von einem Capsid (CA) umhüllt. Die netzartige Oberfläche der retroviralen MA-Proteine assoziieren zu Trimeren, die den Viruspartikeln eine isometrische Struktur verleiht. Mit der Hüllmembran sind die viralen Glykoproteine TM (transmembranes

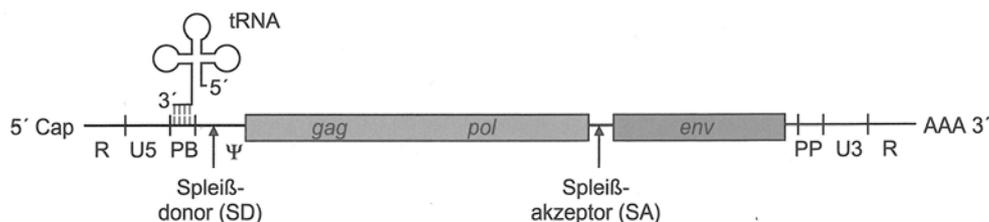
Hüllprotein, gp41) und SU (Surface-Hüllprotein, gp120) verbunden. Das TM ist mit einer aus ca. 20 hydrophoben Aminosäuren bestehenden Sequenz in der Hüllmembran verankert, während das SU-Protein über nichtkovalente Bindungen mit dem externen Teil des TM-Proteins verbunden ist. Mit dem inneren Teil der Hüllmembran sind die Matrixproteine (MA) durch aminoterminal angefügte Myristinsäurereste verbunden. Die Partikel der Retroviren haben einen Durchmesser von 80-120 nm (Modrow et al., 2003) (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines Retrovirus.**

Die Virenhülle wird von einer zellulären Lipiddoppelmembran gebildet. Surface unit (SU, gp120) und transmembran Hüllprotein Glykoprotein (TM, gp41) verkörpern die viralen Hüllproteine. MA (Matrixprotein), CA (Kapsidprotein) und NC (Nukleokapsid) sind die viralen Strukturproteine. Die Enzyme PR (Protease), RT (Reverse Transkriptase) und IN (Integrase) sind für die Reifung des Viruspartikels und die Integration des Virusgenoms in die Wirtszelle essentiell (Coffin et al., 1997).

Die Retrovirale RNA weist eine 5'-Cap-Struktur und eine 3'-Polyadenylierung auf, die alle Eigenschaften einer eukaryotischen mRNA besitzt. Dieser homologe Aufbau unterstützt die Nutzung des Translationsapparates des eukaryotischen Wirtes.



**Abbildung1.2: RNA-Genomorganisation eines infektiösen HIV-1 Partikels**

R=redundant, U=unique, PB=Primerbindungsstelle, SD=Spleißdonor, SA=Spleißakzeptor, PP=Polypurintrakt (Modrow und Falke, 2003)

Das HIV-Genom beinhaltet die Gene *gag*, *pol* und *env*, welche für die gruppenspezifische Antigene (Gag-Proteine: Matrixproteine, Kapsidproteine, Nukleokapsidproteine), die Enzyme (Reverse Transkriptase; Integrase, Protease) und die Hüllproteine kodieren. Direkt an die 5'Cap Struktur schließt sich die R-Region (R= redundant) an. Sie ist zwischen 15 und 240 Nukleotide lang und liegt in identischer Basenfolge und Orientierung auch am 3'-Ende des viralen Genoms vor. Auf die R-Region folgt am 5'-Ende des Genoms der als U5 und am 3'-Ende U3 (U für unique) bezeichnete Abschnitt. Er besteht aus 75 bis 200 Basen und enthält Sequenzen, die für die Integration des Provirus in das Zellgenom wichtig sind. Im Anschluss an die U5 Region befindet sich eine 18 Basen lange Primer-Bindungsstelle (PB), die mit einem zellulären tRNA-Molekül komplexiert ist. Zwischen der PB und dem Anfang des *gag*-Gens befindet sich die Leaderregion. Sie enthält eine Spleißdonorstelle (SD), die für die Bildung aller gespleißten mRNA Moleküle verwendet wird und eine  $\Psi$ -Sequenz, durch die sich die genomischen viralen RNAs bei der Morphogenese an die Nucleocapsidproteine der sich ausbildenden Viruspartikel anlagern. An die Leader Region schließen sich die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* an. Stromabwärts der Protein kodierenden Region befindet sich einen Polypurintrakt (PP). Der PP ist eine Folge von mindestens neun Adenosin bzw. Guanisinresten, die für die Initiation der DNA-Doppelstrang-Synthese bei der Reversen Transkription von Bedeutung ist. In der U3-Region befinden sich auch wichtige Elemente für die Integration. Analog zu der U5 Region ist die U3 Region in der Lage, nach der reversen Transkription der RNA in doppelsträngige DNA, das 5'-Ende der LTR (Long terminal repeat) zu bilden. Schließlich folgt der U3 Region eine weitere R Region, dem ein PolyA-Schwanz von ca. 200 Adenosineinheiten anhängt.

### 1.1.3 HIV-1 Proteine

Die gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine) übernehmen bei der Infektion verschiedene Funktionen. Das Gag-Protein wird als Vorläuferprodukt synthetisiert und durch die virale Protease in die einzelnen Strukturproteine MA, CA und NC gespalten. Die Matrix- und Capsidproteine sind für das Abschnüren der Lipid-Protein-Vesikel von der Zytoplasmamembran der Wirtszellen verantwortlich. Die Nucleocapsidproteine interagieren an die Leader-Sequenz der RNA.

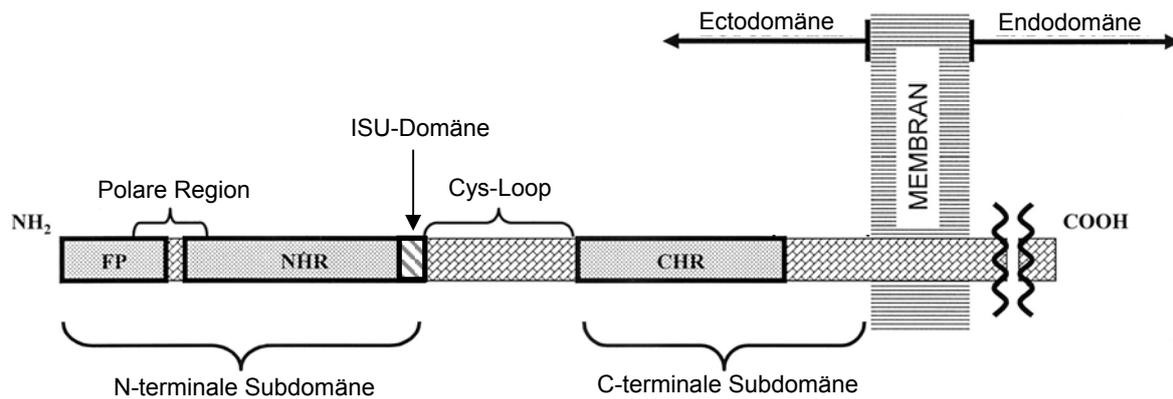
#### HIV-1 Enzyme (pol Genprodukte)

Als Bestandteil des Gag/Pol-Vorläuferproteins werden die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase synthetisiert. Die Verschiebung des ribosomalen Leserasters um  $-1$  oder  $+1$  hat die fehlerhafte Erkennung der Codongrenzen durch die Ribosomen zur Folge, was zu einem Überlesen des Stopcodons der Gag-Proteinsynthese führt, und somit in

die Synthese der Pol-Proteine übergeht. Bei ungefähr 5% der Translationsvorgänge findet dieser Leserastersprung statt. Die einzelnen Enzyme werden durch virale Protease gespalten. Die Protease von HIV-1 z.B. liegt aus zwei identischen Proteineinheiten vor. Im aktiven Zentrum des Enzyms sind zwei funktionell wichtige Asparaginsäurereste, die als Aspartatprotease wirken. Die Prozessierung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine in die einzelnen Komponenten durch die Protease, erfolgt durch Spaltung zwischen Phenylalanin- oder Tyrosin- und Prolinresten. Die Reverse Transkriptase ist ein  $Mg^{2+}$ -abhängiges Enzym, das als RNA- und auch als DNA-abhängige Polymerase wirken kann. Es besitzt außerdem noch eine RNaseH-Aktivität, die den RNA-Anteil von DNA/RNA-Hybriddoppelsträngen abbaut. Die Reverse Transkriptase von HIV-1 ist ein Heterodimer, bestehend aus einer kleinen und großen Untereinheit. Die kleinere Untereinheit entsteht durch proteolytische Spaltung am carboxyterminalen Ende und ist daher mit dem aminoterminalen Teil der großen Untereinheit identisch. Die Aktivität der RNaseH ist im carboxyterminalen Bereich der größeren Untereinheit lokalisiert, während die Polymerasefunktionen durch die aminoterminalen Aminosäuren bestimmt werden. Durch die fehlende Kontrolle der Lesegenauigkeit werden mit einer Wahrscheinlichkeit von  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  falsche Basen in die neusynthetisierten DNA bzw. RNA-Stränge eingebaut. Diese Leseungenauigkeit führt zu der relativ hohen Mutationsrate mancher Retroviren. Schließlich wird die Integrase im 3'-Bereich des gag/pol Gens codiert. Sie wirkt sowohl als Endonuclease als auch als Ligase. Die Integrase kann außerdem an die Enden des linearen, in doppelsträngige DNA transkribierten Virusgenoms binden und so für seine Integration in das Genom der Wirtszelle sorgen.

### **HIV-1 Hüllproteine (env Genprodukte)**

HIV-1 besitzt zwei Glykoproteine, die in einem nicht-kovalent verbundenen Komplex vorliegen (Chan et al. 1997). Aus dem Vorläuferprotein gp160 erfolgt die Synthese von gp120 und gp41, welches durch Translation einer einfach gespleißten mRNA am rauen endoplasmatischen Retikulum entsteht, an dem auch die Glykosylierung stattfindet (Stein et al. 1990). Im Golgi Apparat werden die Aminosäuren des Vorläuferproteins gp160 nach einem Abbau basischer Aminosäuren in gp120 und gp41 gespalten. Hierfür ist eine mit dem Golgi Apparat assoziierte zelluläre Protease verantwortlich. Für die Bindung an den CD4-Rezeptor der Zellmembran sind die gp120 Hüllproteine verantwortlich. Außerdem bieten sie entsprechende Angriffspunkte für wirtseigene Abwehrmechanismen. Das gp120 Hüllprotein besteht aus sehr variablen Elementen (V) und stark redundant aufgebauten Bereichen (C), letztere sind meist für die Wechselwirkung mit zellulären Rezeptoren verantwortlich. Schließlich ist das TM der meisten Retroviren für die Fusion mit der Wirtszelle zuständig. Das sogenannte Fusionspeptid befindet sich am aminoterminalen Ende des TM.



**Abbildung 1.3: Allgemeiner Aufbau retroviraler gp41-Proteine am Beispiel von HIV-1** (Shapner et al. 2004)  
Schematische Struktur des TM-Proteins von HIV-1. FP=Fusionspeptid, NHR=N-terminale Helixregion, CHR= C-terminale Helixregion, Isu-Domäne=Immunsuppressive Domäne

Die hoch konservierte gp41 Sequenz wird in drei Domänen eingeteilt. Die Ectodomäne, die C-terminale Endodomäne und die transmembrane Domäne, welche die ersten beiden Domänen verbindet (Abbildung 1.3). Die gp41 Ectodomäne beinhaltet verschiedene funktionelle Regionen, die entscheidend für die Membranfusion sind. Am N-terminalen Ende des gp41 befindet sich ein 20 Aminosäure langes hydrophobes Fusionspeptid (FP) (Freed et al., 1990). Das Fusionspeptid dringt in die Membran ein und destabilisiert diese. Es erleichtert somit die Fusion der Zellmembran. Dem FP folgen zwei Heptad Repeat Regionen, die aminoterminal (NHR) mit immunsuppressiver (Isu-) Domäne (Denner et al. 1994) und die carboxyterminale Heptad Repeat Region (CHR). In Abwesenheit der Lipidmembran falten sich drei NHR Moleküle zu einer zentral und parallel angeordneten  $\alpha$ -helicalen coiled-coil Struktur. Diese ist umhüllt von drei antiparallel gewickelten CHR  $\alpha$ -Helices, welche durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren innerhalb der Helix stabilisiert ist. Die NHR/CHR Moleküle sind durch einen loop verbunden, so dass die Polypeptidkette gegenläufig ist. Diese trimere helicale hairpin Struktur formt einen Komplex während des Membran Fusionsprozesses. Die gp41 Endodomäne bewirkt die Membranbindung des gp41 Moleküls (Chen et al., 2001).

Die TM weisen *in vitro* immunsuppressive Wirkung auf (Denner et al. 1986) und konnten auch *in vivo* bestätigt werden. Ein Grund für die Expression des transmembranen Hüllproteins auf der Oberfläche von Tumoren könnte ein selektiver Vorteil im Schutz gegenüber dem Immunsystem sein. Für die transmembranen Hüllproteine von MuLV (Mangeny und Heidmann 1998), des Mason-Pfizer Affenvirus (Blaise et al. 2001) und HERV-H (Mangeny et al. 2001) wurde tumorigenes Potential nachgewiesen. Zellen, die diese Proteine auf den Zelloberfläche exprimierten, bildeten in immunkompetenten Mäusen

Tumore. Die Arbeitsgruppe um Heidmann (Mangeny et al. 2005) konnte zeigen, dass Tregs bei der retroviral induzierten Immunsuppression ein Rolle spielt. Zellen, deren retrovirales *env*-Gen experimentell ausgeschaltet wurde, waren nicht mehr in der Lage in immunkompetenten Mäusen Tumore zu bilden. Da dieser Effekt reversibel ist und die tumorigenen Eigenschaften *in vitro* sowie in immundefizienten Mäusen erhalten blieben, ist es das retrovirale Env, welches hier den Schutz vor dem Immunsystem vermittelt (Mangeny et al. 2005).

### 1.1.4 Die Immunsuppressive Domäne der Retroviren

Zwischen dem Cystein-loop und dem NHR-Bereich von gp41 gibt es einen 17 Aminosäuren langen Bereich, der als besonders hoch konserviert bezeichnet werden kann (Abbildung 1.4). Aus diesem Bereich wurde 1985 von Cianciolo et al. eine Konsensussequenz abgeleitet und synthetisiert, die als CKS-17 Peptid bezeichnet wurde (Cianciolo et al., 1985). Die vermeintlich immunsuppressive Eigenschaft bei inaktiven Retroviren, synthetisch hergestellten Peptiden und aufgereinigten TM Proteinen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine hoch konservierte Domäne in der TM Region zurückzuführen (Denner, 1998).

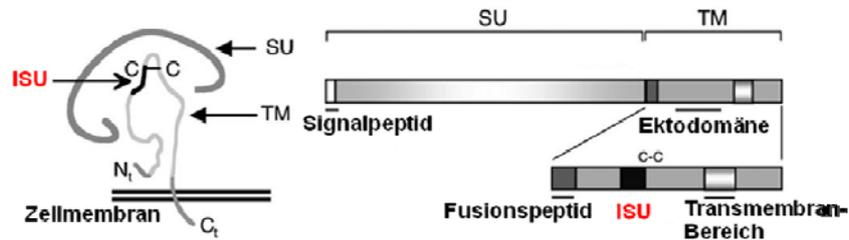
CKS-17	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
FelV	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
MuLV	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
PERV-A	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
PERV-B	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	R	E	G	G	L
HERV-K10	L	A	N	Q	I	N	D	L	R	Q	T	V	I	W	M	G	D
HIV-1	L	Q	A	R	I	L	A	V	E	R	Y	L	K	D	Q	Q	L

**Abbildung 1.4: Sequenzvergleich der Isu-Domänen der Retroviren**

FelV – Felines Leukämievirus, MuLV – Murines Leukämievirus, PERV – porcines endogenes Retrovirus, HERV – humanes endogenes Retrovirus, HIV – humanes Immundefizienzvirus; rot gefärbte Buchstaben repräsentieren von der CKS-17-Sequenz abweichende Aminosäuren. Abbildung nach (Cianciolo et al., 1985).

Dieser Bereich wird als Immunsuppressive (Isu-) Domäne bezeichnet (Ruegg et al. 1989, Denner et al. 1994, 1996). Das transmembrane Hüllproteine hemmt die Proliferation von Immunzellen und verändert deren Cytokin-Produktion *in vitro* und *in vivo*. Neben der inhibierenden Wirkung auf Lymphozyten zeichnen sich synthetische Peptide der Isu-Region noch durch weitere *in vitro*-Effekte aus. Sie wirken inhibierend auf die *respiratory burst* von humanen Monozyten (Harrel et al. 1986), auf die IL-1 Aktivität (Kleineremann et al. 1987), die IFN- $\gamma$  Produktion (Ogasawara et al. 1990), auf die Immunglobulin Sekretion (Mitani et al. 1987) und auf die durch natürliche Killer Zellen vermittelte Zytotoxizität (Harris et al. 1987). Dieses Ungleichgewicht an Cytokinen wirkt sich auf die zellvermittelte Immunität negativ aus (Haraguchi et al., 1995 a und b). Es konnte gezeigt werden, dass das immunsuppressive

Peptid nur biologisch aktiv ist, wenn es an ein Trägermolekül gekoppelt wurde (Denner et al. 1994; Cianciolo et al., 1985). Ziel der Kopplung ist es eine biologisch wirksame Konformation herzustellen, die der nativen Konformation nahe kommt (Abbildung 1.5).



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung einer Retroviralen env-Region mit der Position der Isu-Domäne (ISU), (Mangoney et al., 2007)

Des Weiteren weist die Isu-Domäne eine Homologie zu den Domänen der Klasse-I-Interferone auf (Chen et al. 1998). Darüber hinaus waren gegen das Isu-Peptid gerichtete Antikörper auch in der Lage, mit Interferon- $\alpha$  kreuzzureagieren (Chen et al., 1999, Denner et al., 2000). Daher besteht die Möglichkeit, dass die Isu-Domäne durch Interaktion mit dem Interferon-Rezeptor, die Interferon Wirkung nachahmen könnte. Die Isu-Peptide verschiedener Retroviren beeinflussten die Cytokinproduktion, so dass es zu einem erhöhten Level an Cytokinen, wie IL-6 und IL-10 und gleichzeitig zu einem verringerten Level an Cytokinen wie IL-2, IL-12, Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) kommt. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass das Interferon-1 $\alpha$ , sowie ein Peptid, korrespondierend zu einer IFN- $\alpha$  Domäne, durch Hemmung der Proliferation von B- und T-Lymphozyten, immunsuppressiv wirksam sind (Ruegg et al. 1990). Weiterhin waren gegen das Isu-Peptid gerichtete Antikörper auch in der Lage mit Interferon- $\alpha$  kreuzzureagieren (Chen et al. 1999, Denner et al. 2000).

Die immunsuppressiv aktive Domäne des gp41 von HIV-1 erstreckt sich von AS 583-599 (Denner et al. 1994, GeneBank Accession Number K03455). Das von ihr abgeleitete HIV-1 Isu-Peptid hemmt *in vitro* die Mitogen- und Lymphokin-abhängige Proliferation von humanen und murinen Lymphozyten (Ruegg et al. 1989, Denner et al. 1996) und moduliert ebenfalls die TH1/TH2-Cytokinantwort (Denner et al. 1998). Durch Experimente mit dem rekombinanten gp41 von HIV-1 konnte ebenfalls eine erhöhte Sekretion von IL-10 und IL-6 erreicht werden (Barcova et al. 1998, Koutsonikis et al. 1997, Speth et al. 2000, Takeshita et al. 1995). In einem von der Arbeitsgruppe durchgeführten Microarray wurde die Expression von 29098 humanen Genen in PBMCs, nach Inkubation mit dem HIV-1 Isu-Peptid, untersucht. Die erzielten Daten ergänzen bzw. bestätigen die im Cytokinarray beobachteten Ergebnisse, in Bezug auf die Modulation der Cytokinantwort durch das Isu-Peptid. So konnte eine erhöhte Expression von IL-6 beobachtet werden.

### 1.1.5 Infektions- und Replikationszyklus von HIV-1

Der Eintritt des HIV in seine Zielzellen erfolgt über den CD4-Rezeptor, ein ca. 58 kDa schweres monomeres Glykoprotein. Auf CD4-positiven T-Zellen gehört der CD4-Rezeptor zum T-Zellrezeptor-Komplex und bindet physiologischerweise an MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (Abbildung 1.6). Die Bindung des HIV an den CD4-Rezeptor erfolgt mit Hilfe des viralen gp120. Allerdings benötigt das Virus für den Eintritt in die Zelle weitere Ko-Rezeptoren: die Chemokinrezeptoren CCR5 (auf der Zelloberfläche von Makrophagen) bzw. CXCR4 (auf T-Helferzellen). Ob der CCR5- oder der CXCR4-Rezeptor als Ko-Rezeptor benutzt wird, ist abhängig vom Virustyp. HI-Viren, welche CXCR4 benutzen, werden als T-trop, jene, die CCR5 benutzen als M-trop bezeichnet. Die Bindung des gp120 an den CD4-Rezeptor induziert eine Konformationsänderung des gp120 Moleküls, welche es dem gp41 erlaubt, sein hydrophobes N-terminales Ende in die Plasmamembran zu inserieren. Virus- und Zellmembran verschmelzen und der Viruskern wird in das Zytoplasma aufgenommen (Abbildung 1.6). In einem bisher nicht bis ins Detail verstandenen Prozess kommt es zur Auflösung der Viruskapsid-Strukturen (uncoating). Die Reverse Transkription führt zur Verdopplung der Regulatorelemente an beiden Enden des viralen Genoms, der LTR (long terminal repeats). Die cDNA wird anschließend in den Kern transportiert, wo die virale DNA, mit Hilfe der Integrase, in das Genom der Zielzelle integriert.

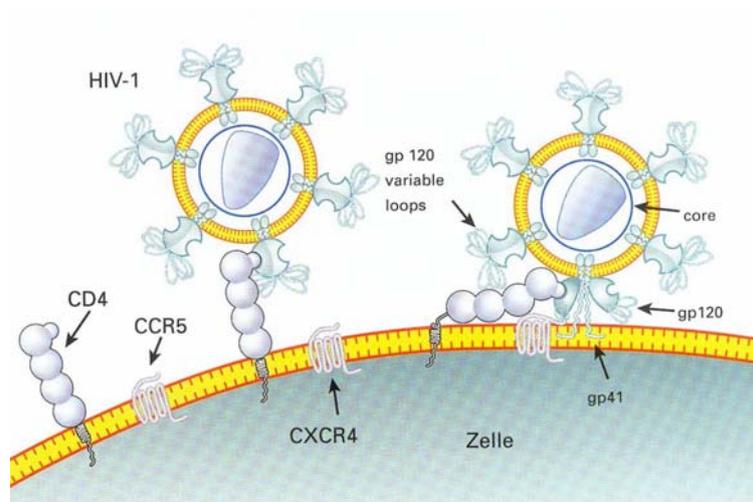


Abbildung 1.6: Eintritt des HIV in die CD4-positive Zelle

Nach Aktivierung einer infizierten Zelle erfolgt die Bindung des zellulären Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (*nuclear factor B*) an die *cis*-regulatorischen Elemente der LTR der integrierten proviralen DNA, wodurch die Transkription der viralen Gene durch die zelluläre RNA Polymerase II ausgelöst wird (Rosen *et al.*, 1985). Für die Genexpression

werden mehrfach gespleißte mRNA Moleküle gebildet, die Tat, Rev und Nef kodieren. Tat ist ein Elongationsfaktor und steigert die Effizienz der Transkription viraler Gene. Das Rev-Protein steuert den Übergang der viralen Genexpression von der frühen zur späten Phase. Des Weiteren ermöglicht das Rev-Protein den Transport von mRNA-Molekülen aus dem Kern, indem es an ein bestimmtes Sequenzelement innerhalb des Env-Gens, das Rev responsive element (RRE), bindet. In einer zweiten Phase werden zunächst Strukturproteine, als die Vorläuferproteine *Gag* (*group specific antigen*), *Pol* (*Polymerase*) und *gp160* *synthetisiert*. Die Spaltung des Vorläuferproteins *Gag-Pol* erfolgt durch die virale Protease, welche eine geringe Substrat-Spezifität besitzt und verschiedene Peptidbindungen spalten kann. Das *gp160* wird im endoplasmatischen Retikulum zunächst glykosyliert und später in die Oberflächenproteine *gp120* und *gp41* gespalten. Der Zusammenbau des HIV-Partikels und seine Ausknospung erfolgen schließlich an der Zellmembran. Hierbei wird ein Teil der Zytoplasmamembran zur Lipidhülle des Virions (Abbildung 1.7).

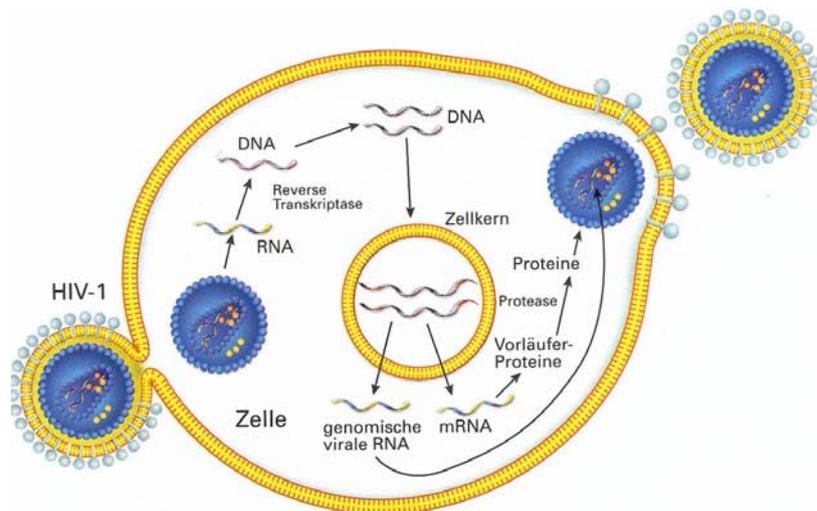


Abbildung 1.7: Replikationszyklus von HIV-1

## 1.2 Übersicht über die Immunantwort

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Pathogenen. Der Abwehrmechanismus besteht aus der angeborenen Immunität („innate immunity“) und der erworbenen Immunität („adaptive immunity“) (Medzhitov and Janeway, 1997a). Die angeborene Immunantwort erkennt alle Fremdmoleküle und Pathogene, die adaptive Immunantwort hingegen erlaubt die Wiedererkennung von Pathogenen bei der darauffolgenden Infektion. Zentrale Unterschiede beider Formen der Abwehr beruhen demnach in den Mechanismen und Rezeptoren der Pathogenerkennung. Das Immunsystem kann irrtümlicherweise körpereigenes Gewebe als zu bekämpfenden Fremdkörper erkennen. Die regulatorischen T-Zellen, eine spezialisierte Untergruppe der T-Zellen, verhindern diese Autoimmunreaktion. Sie unterdrücken die Aktivierung des Immunsystems und regulieren somit die Selbsttoleranz

des Immunsystems. Um die Immunreaktion während einer HIV Infektion verstehen zu können, müssen grundlegende Immunreaktionen bekannt sein. Die Rolle der Tregs und die zusammenhängenden Mechanismen im Fokus der Betrachtung.

### **1.2.1 Die angeborene Immunantwort**

Krankheitserreger müssen zunächst die Epithelbarriere überwinden um von Phagozyten erkannt zu werden. Die direkt folgende angeborene Immunreaktion bekämpft mit Hilfe von neutrophilen Granulozyten und Gewebsmakrophagen die eindringenden Mikroorganismen (Aderem and Underhill, 2000). Im Gegensatz zur erworbenen Immunantwort benötigt das phylogenetisch sehr alte, angeborene Immunsystem, hoch konservierte, mikrobielle Moleküle (pathogenassociated molecular patterns, PAMPs), um aktiviert zu werden und die Erkennung dieser Moleküle erfolgt durch eine begrenzte Anzahl keimbahnkodierter, mustererkennender Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) (Akira et al., 2006; Janeway and Medzhitov, 2002). Signifikant für PAMPs ist die Tatsache, dass sie nicht vom Wirt, jedoch von den Mikroorganismen selbst gebildet werden. Zu diesen Strukturen, die meist essentiell für die Pathogenität des Mikroorganismus sind, gehören Glykane, Flagellin, doppelsträngige RNA (dsRNA) Lipoteichonsäuren, Mannane, Peptidoglykane, mikrobielle DNA und Lipopolysaccharide (LPS) (Aderem and Ulevitch, 2000; Medzhitov and Janeway, 2000). Die PRRs werden konstitutiv auf verschiedenen Haupthistokompatibilitätsantigen (major histocompatibility complex II, MHC II) präsentierenden Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert und besitzen eine einheitliche Spezifität, so dass Pathogene gleichzeitig von einer Vielzahl von Zellen erkannt werden können (Akira et al., 2006; Medzhitov and Janeway, 2000). Die hervorgerufene Antwort erfolgt sofort und resultiert in einem weiten Spektrum von Immunreaktionen. Diese Reaktionen können bereits genügen, um eine Ausbreitung der Infektion zu unterbinden. Die hervorgerufene Antwort erfolgt sofort und resultiert in einem weiten Spektrum von Abwehrmechanismen. Dazu gehören u.a. die Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden, Cytokinen, Chemokinen und Prostanoiden und die Rekrutierung von Entzündungszellen sowie die zum Teil noch schlecht verstandenen angeborenen intrazellulären Resistenzmechanismen (Fritz et al., 2006; Medzhitov and Janeway, 2000; Radtke and O'Riordan, 2006).

### **1.2.2 Die erworbene Immunantwort**

T-Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle für die Initialisierung und Regulierung einer spezifischen Immunantwort über die Antigenerkennung. T-Lymphozyten werden in

mindestens drei Subklassen unterteilt, den T-Helferzellen (TH-Zellen), zytotoxische T-Zellen (TcZellen) und regulatorische T-Zellen (Tregs) (Thornton et Shevach, 1998). Charakterisiert werden die T-Zellen nach Funktion und der unterschiedlichen Expression der verschiedenen Oberflächenmoleküle. TH-Zellen interagieren hauptsächlich mit den Zellen des Immunsystems. Sie erkennen Antigene, die an MHC II Moleküle gebunden sind und durch den Abbau von Proteinen entstehen. Sie nehmen also eine organisierende Rolle bei der Entstehung einer spezifischen Immunantwort ein. Die TH-Zellen stimulieren die Antikörperproduktion von B-Zellen und aktivieren zytotoxische T-Zellen. Letztere können ihrerseits virusinfizierte Zellen zerstören. Zur Antigenerkennung benötigen die T-Lymphozyten hochspezifische T-Zell Rezeptoren (TCR). Die erforderlichen Antigene sind an die peptidbindenden Anteile von Molekülen des MHCs gebunden (Guéry et al., 1992). Dieser Vorgang wird MHC-Restriktion genannt. Da die meisten der aufgenommenen Antigene nicht in ihrer nativen Form an die MHC-Komplexe binden können, müssen sie von der Zelle gebunden, aufgenommen und schließlich im Inneren der Zelle aufgearbeitet werden. Durch Proteolyse werden die Antigene in eine Form gespalten, die an MHC-Moleküle gebunden werden kann. Diesen Vorgang der Aufarbeitung von Antigenen zu Peptiden bezeichnet man als Prozessierung (Germain und Margulies, 1993). Bedeutend für die erworbene Immunantwort sind die MHC-Moleküle der Klassen I und II. Moleküle der MHC-Klasse-I werden auf den Oberflächen nahezu aller kernhaltigen Körperzellen exprimiert. Sie werden über endoplasmatische Antigene präsentiert. Antigene Peptide werden von Tc-Zellen erkannt und assoziieren mit MHC-Klasse-I Molekülen und vermögen dann die präsentierende, d. h. die infizierte Zelle zu zerstören. MHC-Klasse-II Moleküle werden exklusiv von spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert, dazu zählen die B-Zellen, Monozyten und dendritische Zellen (DC). Die Aktivierung von TH-Zellen erfolgt nach der Präsentation über MHC-Klasse-II Moleküle, die eine komplexe Immunantwort zur Folge hat. Es existieren molekulare Mechanismen, die ein sogenanntes „Cross-presenting“ erlauben. Darunter versteht man die Präsentation intrazytoplasmatischer Antigene durch Bindung an MHC-Klasse-II Molekülen (Guéry und Adorini, 1995) und die Präsentation extrazellulärer Antigene, die durch Phagozytose in die APC gelangen konnten, über MHC-Klasse-I Komplexe (Ciubotariu et al., 2002).

### 1.2.3 Cytokine

Cytokine leiten bzw. regulieren die Proliferation und Differenzierung von Zielzellen. Des Weiteren spielen Sie außerdem eine wichtige Rolle für immunologische Reaktionen als Antwort auf eine Inflammation. Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen produzieren proinflammatorische Cytokine. Andere Zelltypen wie Epithelzellen und

Fibroblasten sind ebenfalls in der Lage Proinflammatorische Cytokine zu bilden (Bogdan et al., 2004). Unterschieden werden vier Hauptgruppen von Cytokinen: Interferone (IFN), Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren und Chemokinen.

Zur Charakterisierung der Wirkung der HIV-1 Isu-Domäne auf die Cytokinmodulation wurden synthetische Peptide, die die Sequenz der HIV-1 Isu-Domäne enthalten, zu Isu-Homopolymeren gekoppelt und das rekombinante HERV-K TM wurde aus Hefezellen exprimiert. Nachdem in einer Mikroarray Analyse in humanen PBMCs nach der Inkubation mit dem Isu-Homopolymer bzw. HERV-K TM etwa 440 Gene überexprimiert gefunden worden waren (unveröffentlicht), wurden diese in dieser Arbeitsgruppe (Falenski, 2007; Lauck, 2008) und im Rahmen dieser Diplomarbeit untersucht.

### **1.2.3.1 Interleukin-10**

IL-10 wurde als ein Produkt von TH2-Lymphozyten entdeckt, das die Cytokinsekretion von TH1-Zellen hemmt (Fiorentino et al., 1989). Das Molekül ist 35 kDa schwer und besteht aus zwei Untereinheiten, die auch einzeln ihre volle biologische Wirksamkeit entfalten (Fiorentino et al., 1989; Moore KW et al., 1993). IL-10 gehört in die Familie der sogenannten langkettigen 4- $\alpha$ -Helix-Bündel-Zytokine. Charakteristisch für diese Cytokine sind vier antiparallel in einem Bündel angeordnete  $\alpha$ - Helices (Bazan, J.F., 1990). TH1 Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, und Keratinozyten produzieren ebenfalls IL-10. Die IL-10 Sekretion erreicht auf Protein-Ebene erst nach 24-48 h ihr Maximum nach der Stimulation mit LPS (de Waal et al. ,1993). Dabei bewirkt die intrazelluläre Signalübertragung über cAMP eine Steigerung der Transkription des IL-10 Gens. Einige Cytokine und auch IL-10 selbst unterdrücken die IL-10 Produktion. Bei Lymphozyten führt IL-10 zur Hemmung der TH1 Immunantwort und begünstigt TH2 Reaktionen, indem es die Proliferation, Aktivierung und Cytokinsynthese von TH1 und natürlichen Killerzellen unterdrückt. Allerdings kann IL-10 auch die Cytokinproduktion von TH2-Lymphozyten hemmen (Abbildung 1.8).



### 1.2.3.3 Transforming growth factor- $\beta$

Beim Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) handelt es sich um ein Cytokin, welches eine Vielzahl biologischer Funktionen reguliert. TGF- $\beta$  wurde ursprünglich als ein Faktor identifiziert, der das Wachstum von Fibroblasten in Kultur unterstützt (Roberts A.B., 1999). Es moduliert die Proliferation, Apoptose (Lee et al., 2007) sowie die Aktivierung und Differenzierung der entsprechenden Zielzellen (Moses und Serra, 1996). TGF- $\beta$  wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert (Tregs, Makrophagen, Endothelzellen, T-Zellen u.a.). Es ist ein sehr potenter Wachstumshemmer. TGF- $\beta$  hemmt die T-Zell-Proliferation und die Anti-Tumoraktivität, zum Teil durch Hemmung von IL-2 Effekten. Zusätzlich wird die TH1-Differenzierung und die IL-4 und IL-12 Produktion gehemmt (Fahlen et al., 2005; Tang et al., 2005). Neuere Forschungsergebnisse zeigten des Weiteren, dass TGF- $\beta$  die Bildung von regulatorischen T-Zellen fördert. Chen et al. konnten zeigen, dass TGF- $\beta$  durch die Induktion von Foxp3 an der Konversion von CD4+CD25- zu CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen beteiligt ist (Chen, et al., 2003). So stellen Horwitz et al. fest, dass die Konversion nicht von TGF- $\beta$  alleine abhängig ist, sondern dass IL-2 ebenfalls notwendig ist (Horwitz, et al., 2003). Es konnte sogar nachgewiesen werden, dass TGF- $\beta$  und IL-2 die Suppressorkapazität von natürlichen Treg (nTreg) erhöhen. Vermutlich ist IL-2 eher für die Homöostase zuständig, während TGF- $\beta$  die regulatorischen Eigenschaften der Treg beeinflusst (Li et al., 2006). Schramm et al. entdeckten, dass ein intakter TGF- $\beta$  Signalweg für die *in vivo* Expansion und Suppressorkapazität von CD4+CD25+ Zellen benötigt wird (Schramm, et al., 2004). In TGF- $\beta$ -/- Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Menge der peripheren Treg, nicht jedoch der Treg im Thymus reduziert ist (Marie et al., 2005). Dies stützt die Vermutung, dass TGF- $\beta$  essenziell für die Erhaltung der peripheren Treg Population der humanen PBMC Population ist.

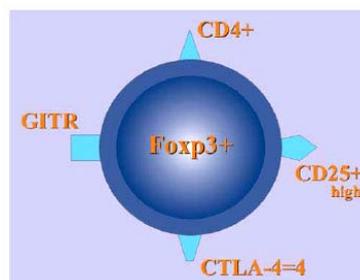
### 1.2.3.4 Interferone

Interferone wurden erstmalig 1957 als Produkte von virusinfizierten Zellen beschrieben, die in der Lage sind, einen virusresistenten Status in Nachbarzellen hervorzurufen (Isaacs et al., 1957). Interferone gehören zur Klasse II  $\alpha$ -helikaler Cytokine und werden an Hand ihrer Rezeptoren, ihrer Sequenzhomologien und Molekularstruktur in Typ I, Typ II und Typ III IFN unterschieden (Ank et al., 2006). Aus immunologischer Sicht sind hauptsächlich IFN $\alpha$  und  $\beta$  von Interesse und gehören zum Typ I IFN (Theofilopoulos et al., 2005). Diese Interferone induzieren zellautonome antivirale Aktivitäten in nahezu allen Zellen, die durch Viren befallen werden können. Die intrazelluläre Replikation von Viren stellt ein wesentliches Signal zur Aktivierung antiviraler Mechanismen dar. Im Zusammenhang mit der Induktion einer Typ I

Interferon Antwort ist die Infektion der IFN-produzierenden Zelle jedoch keine notwendige Voraussetzung. Es ist für einige virale Hüllproteine, wie das gp120-Protein vom HI-Virus (Capobianchi et al., 1992) gezeigt worden, dass sie ohne Infektion eine effektive IFN-1 $\alpha$  Antwort induzieren können.

### 1.3 Regulatorische T-Zellen

Vor 37 Jahren wurde die Theorie einer Population von Supressor-Zellen entwickelt (Gershon, 1971). Der suppressive Mechanismus der Tregs konnten weder molekularbiologisch noch biochemisch erklärt werden. Auch war es nicht möglich, die entsprechende Lymphozytenpopulation näher zu charakterisieren. Man konnte zunächst die CD4<sup>+</sup> T-Zellen detektieren (Fontenot et al., 2003). Der entscheidende Durchbruch auf dem Feld gelang dann aber 1995 Sakaguchi und Kollegen mit der Entdeckung, dass CD25 (die  $\alpha$ -Kette vom IL-2 Rezeptor) konstitutiv auf CD4<sup>+</sup> regulatorischen Zellen exprimiert wird (Sakaguchi et al., 1995). Nach einiger Zeit konnte der Transkriptionsfaktor FoxP3 identifiziert werden, der für die Funktion und Entwicklung dieser natürlichen regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-Zellen beim Menschen wesentlich ist. Außer der schon genannten Suppressoraktivität der Tregs, ist eines der wichtigsten Merkmale, ihre eingeschränkte Proliferation auf alleinigen T-Zell Rezeptor Stimulus ohne exogenes IL-2 *in vitro*. Weiterhin zeigen diese Zellen eine erhöhte CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte activation-4, CD152) Expression. CTLA-4 wird ebenfalls auf Effektorzellen nach viraler Aktivierung hochreguliert, allerdings erscheint die Regulation auch durch Foxp3 induzierbar zu sein (Hori et al., 2003). Mäuse mit einer gezielten Gendeletion (KO, knockout) von CTLA-4 zeigen zum Beispiel einen ähnlichen Phänotyp wie Foxp3 KO Mäuse. Weiterhin exprimieren CD25<sup>+</sup> T-Zellen konstitutiv GITR (glucocorticoid induced tumor necrosis factor (TNF) receptor) (McHugh et al., 2002; Shimizu et al., 2002). Auch dieser Oberflächenrezeptor wird nach LPS Stimulation von naiven T-Zellen hochreguliert und kann als Costimulation dienen (Tone et al., 2003) (Abbildung 1.9).



**Abbildung 1.9: Phänotypischer Aufbau einer natürlichen regulatorischen T-Zelle.**

Natürliche Treg Zellen exprimieren die Membranproteine CD4, CD25, GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein) und CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4) und im Nucleolus wird der Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimiert.

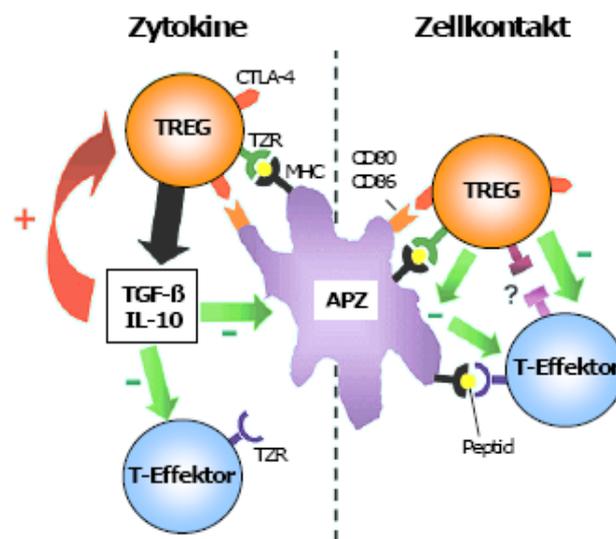
Neben den natürlichen Tregs gibt es noch weitere Subtypen, die suppressive Eigenschaften besitzen und die z.T. nicht abhängig von FoxP3 sind. Zu ihnen zählen die regulatorische TH3 T-Zellen. Diese zeichnen sich durch die Sekretion von TGF- $\beta$  und IL-10 aus. Tr1-Zellen können jedoch auch durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen induziert werden.

### 1.3.1 Natürliche und induzierbare regulatorische T-Zellen

Die Population der natürlichen regulatorischen T-Zellen liegt bei 5-10% der peripheren CD4<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup> Zellen in Mäusen und Menschen. Das so genannte X-linked immunodeficiency syndrome (IPEX), eine Autoimmunkrankheit, die die meisten endokrinen Organe betrifft, wurde mit dem Fehlen von regulatorischen T-Zellen in Verbindung gebracht. Durch Versuche an Scurfy-Mäusen, die ein ähnliches Krankheitsbild aufweisen, konnte herausgefunden werden, dass eine Mutation im Gen FoxP3 vorliegt, welche ursächlich für die Autoimmunität sowohl bei der Maus, als auch bei Patienten mit IPEX ist (Brunkow, et al., 2001, Powell, et al., 1982). In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass FoxP3 von essenzieller Bedeutung für die Entwicklung und Funktion von natürlichen Treg ist. So kann eine FoxP3 Expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen zu einer Induktion dieser Zellen zu einem Treg Phänotyp führen (Fontenot, et al., 2003, Hori, et al., 2003). Mit diesen Erkenntnissen war auch der bislang beste Marker für regulatorische T-Zellen gefunden. CD4 und CD25 alleine sind als Treg-Marker nicht ausreichend, da auch aktivierte T-Zellen diese Oberflächenmoleküle exprimieren.

Neben den natürlich vorkommenden Treg, die im Thymus generiert werden, können regulatorische T-Zellen auch in der Peripherie gebildet werden. Experimente an Mäusen haben gezeigt, dass es zu einer Konversion in der Peripherie von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen kommt, wenn niedrige Dosen von Antigen vorhanden sind (Apostolou, et al., 2004). Bei der Konversion zu Treg in der Peripherie scheint die Anwesenheit bestimmter Cytokine eine wichtige Rolle zu spielen. Vor allem TGF- $\beta$  und oder IL-10 werden hier häufig diskutiert (Abbildung 1.10). So haben Chen et al. herausgefunden, dass TGF- $\beta$  durch Induktion der FoxP3 Expression in der Lage ist, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen zu Treg zu konvertieren (Chen, et al., 2003). Weiterhin konnten Schramm et al. zeigen, dass eine gestörte TGF- $\beta$  Signaltransduktion in T-Zellen zu einer Verringerung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellpopulation in der Peripherie, nicht aber im Thymus führt, was mit einer Verringerung der Foxp3 Expression in diesen Zellen einher geht. Aus der Überexpression von TGF- $\beta$  in T-Zellen resultiert ein vermehrtes Vorkommen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen sowohl im Thymus, als auch in der Peripherie, welches hier mit einer erhöhten FoxP3 Expression korreliert (Schramm, et al., 2005). Vom Vorkommen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, die IL-10 produzieren

und sehr ähnliche suppressierende Fähigkeiten besitzen wie natürlich vorkommende Tregs, wurde ebenfalls berichtet (O'Garra, et al., 2004). Es gibt verschiedene Arten von Zellen mit suppressiven Eigenschaften. Die am Besten charakterisierten sind die schon beschriebenen natürlich vorkommenden Treg. Daneben gibt es noch die sogenannten Tr1 Zellen, welche antigenspezifisch sind und hohe Mengen an IL-10 und oder TGF- $\beta$  produzieren. Ihre Generation konnte in Menschen *in vivo* während der Frühphase einer allergenspezifischen Immuntherapie beobachtet werden, was dafür spricht, dass sie durch hohe und ansteigende Dosen von Antigen induziert werden können (Jutel, et al., 2003). Da Tr1 Zellen die Fähigkeit besitzen, allergenspezifische TH1 und TH2 Antworten herunterzuregulieren, gelten sie als vielversprechendes Instrument für neue Therapieansätze bei Autoimmunkrankheiten (Taylor, et al., 2006). Ein weiterer Zell-Typ mit suppressiven Eigenschaften sind die so genannten TH3 Zellen, die sich vor allem durch eine hohe Expression von TGF- $\beta$  und eher geringeren Mengen von IL-10 und IL-4 auszeichnen. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TGF- $\beta$  nach Antigenstimulation, die Foxp3 Expression sowohl in CD25<sup>+</sup> T-Zellen, als auch in CD25<sup>-</sup> T-Zellen hochregulieren und unabhängig von der CD25 Expression *in vivo* suppressiv sind (Carrier, et al., 2007).



**Abbildung 1.10: Die Suppressionsmechanismen der T-regulatorischen Zellen.**

Die Suppression ist entweder Cytokin- oder Zellkontakt-vermittelt. Die suppressiven Eigenschaften der Tregs können über größere Distanz durch Ausschüttung inhibitorischer Cytokine zum Tragen kommen. Hierbei sorgen die ausgeschütteten Cytokine TGF- $\beta$  und IL-10 für eine Verstärkung der Treg-Funktionalität. Die Suppression durch Zellkontakt wird durch die Bindung von CTLA-4 an CD80/86 vermittelt. Die suppressiven Eigenschaften der Cytokine wirken sich hauptsächlich auf T-Effektor Zellen und Antigen-präsentierende Zellen (APZ) aus.

### 1.3.2 Infektionsverlauf von HIV und FIV

Die Infektion von Katzen mit dem feline Immundefizienz Virus (FIV) verläuft ähnlich der humanen HIV-Infektion, weshalb die FIV-Infektion in mancher Hinsicht als Tiermodell für die HIV-Infektion dienen kann.

HIV und FIV unterschieden sich allerdings in ihrer genomischen Struktur und der Zielzelle. Der akuten Infektion folgt eine Grippe-ähnliche Krankheit. Charakteristisch ist ein schneller Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, gefolgt von einer langen Zeit klinisch asymptomatischer chronischer Infektion. Kennzeichnet für die Endphase ist die allmählichen Abnahme der CD4 Zellen (Bach et al., 1994; English et al., 1994; Tompkins et al., 1991). Während FIV als Empfänger neben CD4 auch CD8 Zellen anzielt, zeigt HIV-1 als der primäre Empfänger CD4 als Zielzellen(Dean et al., 1996).

Der genaue Verlauf der Cytokinantwort nach einer akuten HIV Infektion ist schwer zu untersuchen. Deswegen könnte die Katze als Tiermodell die Untersuchung der Cytokinmodulation direkt nach der Infektion vorantreiben. Nach vier Wochen FIV Infektion konnte eine vermehrte IL-10 Produktion nachgewiesen werden (Avery and Hoover, 2004). Die Zunahme der IL-10 Sekretion ist bei HIV infizierten Patienten in allen Stufen der Infektion (Meroni et al., 1995; Stylianou et al., 1999) beobachtet worden. Außerdem konnte eine erhöhte IL-6 Produktion nach der Infektion der Katze mit FIV (Ohashi et al. 1992) bzw. des Menschen mit HIV (Breen et al., 1990) gezeigt werden. In vitro Infektionen von Monozyten mit dem HIV (Nakajima et al., 1989) und FIV (Ritchey et al., 2001) induzierten ebenfalls die Produktion von IL-6.

### **1.3.3 Regulatorische T-Zellen bei HIV infizierten Patienten**

Die Rolle von Tregs während der Kontrolle der Immunantwort bei chronischen Infektionen ist nach wie vor unklar (Legrand et al., 2006). Es wird vermutet, dass diese Zellen die chronische Immunaktivierung verhindern und daher von Vorteil wären. Eine weitere Hypothese besagt, dass diese Zellen die antivirale Immunantwort unterdrücken können und somit eher schädlich wirken. Trotz erhöhter CD25<sup>+</sup> Zellen Ausbildung auf der Oberfläche der CD4<sup>+</sup> Zellen, erreichen die Tregs von den PBMCs bei Patienten mit progressiverer HIV-1 Krankheit eine Erschöpfungsphase (Kinter et al., 2007). Im Laufe der HIV Infektion findet möglicherweise eine Umverteilung der Tregs statt. Während die Tregs in PBMC eine Abnahme zeigen, konnte in lymphatischen Organen eine Zunahme beobachtet werden (Boasso et al., 2007). Es konnte auch gezeigt werden, dass Tregs die Immunantwort in vitro nach der HIV-1 Infektion unterdrücken können (Kinter et al., 2007). Es ist jedoch noch nicht klar, wie effizient Tregs die HIV-spezifische Immunantwort in vivo unterdrücken können oder ob sie mit HIV-Antigenen binden können. Daher ist das Verständnis der Mechanismen der Tregs während HIV und anderen chronischen viralen Infektionen von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung besserer präventiver und therapeutischer Impfstoff Ansätze (Rouse et al, 2006). Eine direkte Korrelation zwischen der FoxP3 Expression im lymphatischem Gewebe, dem wichtigsten Ort der HIV Replikation (Haase et al., 1999) und

der Viruslast im Blutplasma, konnte bereits nachgewiesen werden (Andersson et al., 2005; Daniel et al., 2008). In einer aktuellen Studie wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten, eine prozentual höhere Treg-Population bei HIV infizierten Patienten gemessen (Gaardbo et al., 2008). Das höhere Niveau der Tregs ergab sich sowohl bei HIV-infizierten Patienten die eine hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) erhielten, als auch bei Patienten ohne die HAART (Gaardbo et al., 2008).

#### **1.3.4 Regulatorische T-Zellen bei FIV infizierten Katzen**

Es wurden phänotypische und funktionelle Analysen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen bei gesunden und FIV positiven Katzen vorgenommen. Die regulatorischen T-Zellen bei Menschen machen ungefähr 5-10% der peripheren T-Zellpopulation aus und erzeugen kein IL-2 (Joshi et al., 2004). Nach einer akuten FIV-Infektion konnte eine Runterregulierung der IL-2 Produktion gezeigt werden wobei *in vivo* eine frühe Aktivierung der Tregs beobachtet wurde. Die Arbeitsgruppe Mexas et al. konnte kurze Zeit nach der FIV-Infektion zeigen, dass die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Zellen infiziert wurden und die charakteristischen phenotypischen und funktionalen Eigenschaften einer aktivierten Treg Zelle hochreguliert wurde (Mexas et al., 2008). Außerdem wurde ein höheres virales mRNA Niveau in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen gemessen als in den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen. Die FoxP3 und TGF- $\beta$  Markergene sind während der akuten Phase der Infektion in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Zellen hochreguliert (Zheng et al., 2006). Nach der FIV Infektion nimmt die TGF- $\beta$  Sekretion insbesondere auf der Membranoberfläche bei aktivierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Zellen zu. Diese Eigenschaft könnte bei der Differenzierung der FIV infizierten und uninfizierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Zellen eine wichtige Rolle spielen (Petty et al., 2008). Außerdem konnten Petty et al. nachweisen, dass die Expression des FoxP3 Transkripts, nach der FIV Infektion in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen, signifikant höher war, als in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen (Petty et al., 2008).

## 1.5 Zielsetzung

Zurzeit sind weltweit mehr als 33 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert. HIV löst das erworbene Immundefizienz-Syndrom (AIDS) aus, jedoch ist der genaue Pathogenesemechanismus unklar. Die Arbeitsgruppe Denner konnte zeigen, dass transmembrane Hüllproteine die Proliferation von Immunzellen hemmen und deren Cytokin-Produktion in vitro und in vivo verändern. In den transmembranen Hüllproteinen ist eine immunsuppressive (Isu-) Domäne vorhanden, die bei allen Retroviren konserviert ist

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte geklärt werden, wie das HIV-1 Isu-Homopolymer die Immunantwort modulieren kann. Die Mikroarray Analyse zeigte nach der Inkubation mit dem Isu-Homopolymer eine Überexpression von etwa 440 Genen. Daher sollte in einer Kinetik untersucht werden, wie die Expression zeitlich abläuft, um eventuelle Signalwege zu erkennen. Es wurden die cytokinmodulierende Einflüsse des Isu-Homopolymers auf die Änderung der Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-6 (IL-6) und Interferon-1 $\alpha$  (INF-1 $\alpha$ ) humaner PBMCs untersucht. Die Änderungen der Cytokinmodulation wurden mittels real time RT-PCR Analysen auf mRNA-Ebene detektiert und auf Proteinebene mittel ELISA Analyse untersucht. Randomisierte Isu-Homopolymere und Medium dienten dabei als Kontrolle.

Da es bei FIV-infizierten Katzen und HIV-infizierten Menschen zur Erhöhung der Zahl der regulatorischen T-Zellen (Tregs) kommt, soll der Einfluss der transmembranen retroviralen Hüllproteine oder der entsprechenden Isu-Homopolymere auf die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen in der Population von humanen PBMCs untersucht werden.

Deshalb soll im Rahmen der Kinetik getestet werden, ob das HIV-1 Isu-Homopolymer die FoxP3 Genexpression induziert. Der Transkriptionsregulator FoxP3 gilt als Marker der Aktivierung von Tregs. Durchflusszytometrische Analysen der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> markierten PBMC Population wurden durchgeführt, um eine quantitative Induktion der immunsuppressiv wirkenden Tregs ermitteln zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Fluorochrome

##### Fluorochrom-Konjugate

Anti-CD3-FITC Immunotech, Marseille, Frankreich

Anti-CD8a-APC eBioscience, Cornerstone, USA

Anti-CD8a-PE eBioscience, Cornerstone, USA

Anti-CD4-APC eBioscience, Cornerstone, USA

Anti-CD25-PE eBioscience, Cornerstone, USA

Anti-FoxP3-FITC eBioscience, Cornerstone, USA

Die Fluorochrom-Konjugate wurden mit 5 µl /  $1,8 \times 10^6$  Zellen inkubiert.

#### 2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Acrylamid-Lösung Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Standard	Pierce, Rockford, USA
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS <sup>3</sup> )	Pierce, Rockford, USA
dNTP-Mix, 10mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol reinst	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FKS (fötales Kälberserum, 10 %)	PAA, Pasching, Österreich
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES-Puffer (1 M)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ilomastat (GM6001), 2,5 mM	Chemicon International, Temecula, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin (200 mM, Low Endotoxin)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Lymphocyte Separation Medium	PAA, Pasching, Österreich
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PCR-Puffer (10 x)	Roche, Mannheim, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (10000 U /10000 $\mu$ g/ $\mu$ l)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RNase-freies Wasser	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold™, 5 U/ $\mu$ l)	Roche, Mannheim, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	USB Corporation, Cleveland, USA
Tricin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TrisHCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserbadkonservierer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.3 Geräte

Geräte	Firma
96 Plate Washer™	Tecan, Crailsheim, Deutschland
accu-jet® (Pipettierhilfe)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator Sanyo MCO-20AIC	Sanyo Biomedical, Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland
ELISA Reader Spectra Classic	Tecan, Crailsheim, Deutschland

FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, USA
GelDoc 2000	BioRad, Hercules, USA
Innova 4330 Inkubator	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlzentrifuge 5804R q	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop ID 03	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland
Mikrowelle Micro-Chef FM B930	Moulinex, Deutschland
Mx4000® Multiplex Quantitative PCR System	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000	peQLab, Erlangen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Power Pac 200 bzw. 300	BioRad, München, Deutschland
Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Schüttler Sartorius Certomat IS	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
SDS-Gelkammer	Hoefer-SE 250 Amersham / GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe KS12	Thermo Electron Corporation (Kendro), Langenselbold, Deutschland
Sterilbank SterilGARD, Class II Type A / B3	
Biological Safety Cabinet	The Baker Company, Sanford, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ThermoStat Plus (Thermomixer)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Labofuge A	Heraeus, Hanau, Deutschland
Trans-Blot SD® Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München, Deutschland
Ultraschall Desintegrator Sonifier 250	Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, USA
VF2 (Vortexer)	Janke&Kunkel, IKA® Labortechnik, Staufen, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage Sartorius Excellence E2000D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zählkammer Neubauer Improved	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R Langenselbold, Deutschland	Thermo Electron Corporation (Kendro), Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
Zentrifuge Heraeus Sepatech Minifuge RF	Thermo Electron Corporation (Kendro), Langenselbold, Deutschland

#### 2.1.4 Kommerzielle Kits

##### Kit Firma

BD OptEIA™ Human IL-10 ELISA Set  
 Foxp3 Staining Buffer Set  
 Quanti Tect Gene Expression Assays IL-10  
 RNase-Free DNase Set  
 RNeasy Mini Kit  
 SuperScript™ III Platinum® One-Step  
 Quantitative RT-PCR System

##### Firma

BD Biosciences, San Diego, USA  
 eBioscience, Cornerstone, USA  
 Qiagen, Hilden, Deutschland  
 Qiagen, Hilden, Deutschland  
 Qiagen, Hilden, Deutschland  
 Invitrogen, Carlsbad, USA

#### 2.1.5 Puffer

##### Pufferzusammensetzung

PBS „ohne“	136,9 mM NaCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2
------------	--

Bei PBS „ohne“ wird im Vergleich zu PBS kein MgCl<sub>2</sub> verwendet; im Folgenden wird die Abkürzung PBS „ohne“ genutzt.

##### Agarosegelelektrophorese

10 x DNA-Ladepuffer	50 % (v/v) Glycerin 2 % (v/v) 1 x TAE
---------------------	--

1 Spatelspitze Orange G

50 x TAE-Puffer

2 M Tris

1 M Eisessig

50 mM EDTA

Intra- und extrazelluläres Färben von PBMCs

Puffer F

PBS, 2 % (v/v) Formaldehyd

Puffer P

PBS, 0,2 % (v/v) Tween20

Puffer W

PBS, 2 % FKS, 0,2% Natriumacid

IL-10 ELISA

Waschpuffer

PBS „ohne“ + 0,05 % Tween-20

**2.1.6 Peptide**Analysen zur IL-10 Sekretion und zur Modulation der Genexpression

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

**Tabelle 2.1: Sequenz und Herkunft der verwendeten Peptid-Polymeren**

Name	Typ	Abkürzung	Sequenz	Herkunft
HIV Isu	Homopolymer	K169, K172, K176, K194,	NH <sub>2</sub> -KQLQARILAVERYLKDQQL-COOH	Genaxxon, Biberach
HIV Ran	Homopolymer	K46, K51, K200	NH <sub>2</sub> -QQEKVAADKLRLIQYQLLR-COOH	Genaxxon, Biberach

### 2.1.7 Primer und Sonden

#### Primer und Sonden:

Name	5'-3' Sequenz	Fragment- größe [bp]
humanes GAPDH 2 fwd	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	
humanes GAPDH 2 rev	TGGTCCACACCCATGACGA	149
humanes GAPDH 2 Sonde	HEX-CTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGG[3BQ1]	
humanes IL-10 fwd	CCACGCTTTCTAGCTGTT	
humanes IL-10 rev	CTCCCTGGTTTCTCTTCCTAA	92
humanes IL-10 Sonde	TCTTGTCTCTGGGCTT	
humanes FoxP3 fwd	CGACCCCCTTTCACCTACGCC	
humanes FoxP3 rev	GGATGGCGTTCTTCCAGGTGGC	150
humanes FoxP3 Sonde	6Fam-TCCGCTGGGCCATCCTGGAGGCTC[3BQ1]	
humanes INF1- $\alpha$ fwd	CTTCAACCTCTTTACCACAAAAGATTC	
humanes INF1- $\alpha$ rev	TGCTGGTAGAGTTCGGTGCA	84
humanes INF1- $\alpha$ Sonde	6Fam-TGCTTGGGATGAGGACCTCCTAGACA[3BQ1]	
humanes IL-6 fwd	GGTACATCCTCGACGGCATCT	
humanes IL-6 rev	GTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC	81
humanes IL-6 Sonde	6Fam-TGTTACTCTTGTTACATGTCTCCTTTCTCAGGGCT[3BQ1]	
murines GAPDH fwd	GGTACAGTCAAGGCCGAGAA	
murines GAPDH rev	CCCTTTTGGCTCTACCCTTC	184
murines GAPDH Sonde	HEX-CTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGG[3BQ1]	
murines FoxP3 fwd	GGCCCTTCTCCAGGACAGA	
murines FoxP3 rev	GCTGATCATGGCTGGGTTGT	112
murines FoxP3 Sonde	6Fam-ACTTCATGCATCAGCTCTCCACTGTGGAT[3BQ1]	
murines IL-10 fwd	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	
murines IL-10 rev	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	191
murines IL-10 Sonde	6Fam-TGAGGCGCTGTCATCGATTTCTCCC[3BQ1]	

Die Primer und Sonden für humanes IL-10 stammen von Qiagen, Hilden Deutschland. Die Primer und Sonden für humanes GAPDH, humanes FoxP3, humanes INF1- $\alpha$ , humanes IL-6, murines GAPDH, murines FoxP3, und murines IL-10 wurden von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland bezogen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

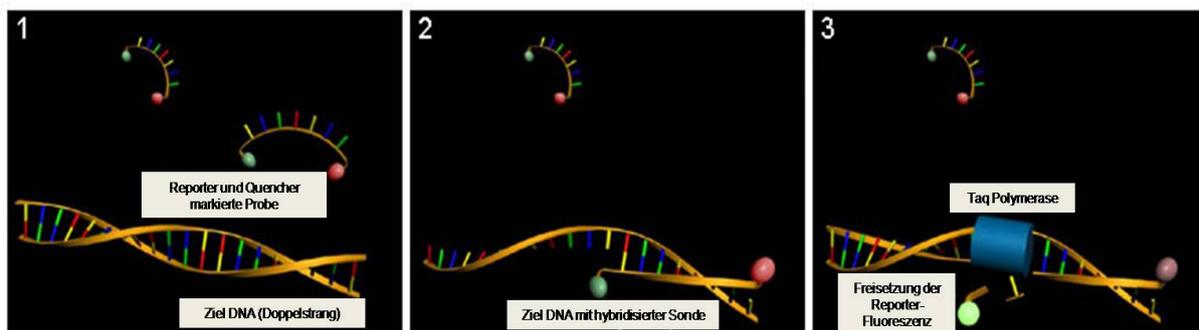
#### 2.2.1.1 Das Prinzip der quantitativen real time RT-PCR

Bei der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real time RT-PCR) handelt es sich um ein schnelles und vollautomatisiertes Verfahren zur Quantifizierung der mRNA-Expression. Sie ist eine Weiterentwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al. 1986), mit der das PCR Amplifikat selektiv *in vitro* vervielfältigt wird. Eine quantitative Aussage ist mit dieser Methode kaum möglich. Das PCR-Endprodukt wird auf ein Agarosegel aufgetragen und die gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente nach Zugabe von Ethidiumbromid dokumentiert. Die Fragmentmenge wird anschließend über Farbintensität der erhaltenen Gelbanden bestimmt, wodurch die Sensitivität der Methode beeinträchtigt wird. Durch diese Methode können nur vergleichende Aussagen über die verschiedenen Endproduktmengen getroffen werden. Die PCR-Reaktion verläuft in drei Phasen, das Aufschmelzen der komplementären DNA-Stränge (Denaturierung), die Anlagerung kurzer Oligonukleotide *upstream* bzw. *downstream* der Zielsequenz (primer annealing) und die Neustrangsynthese/Kettenverlängerung (Elongation). Aufgrund der besonderen PCR-Reaktionskinetik ist es nicht möglich, die in den eingesetzten Proben vorhandenen Ausgangs-DNA-Mengen quantitativ exakt zu bestimmen. Während der Elongation verlängert die Taq-Polymerase die Primer am 3'OH-Ende durch kovalentes Anfügen von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) unter Abspaltung von Pyrophosphat. Die Entwicklung der quantitativen real time RT-PCR ermöglicht die genaue Quantifizierung der Ausgangs-Templatmenge einer Probe. Die Detektion der PCR-Produktmenge erfolgt dabei über Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden. Dadurch sind weitere Arbeitsschritte im Anschluss an die PCR nicht erforderlich. Die Grundlagen der „real-time“ PCR wurden durch Higuchi et al. geschaffen (Higuchi et al., 1992), indem sie der PCR-Reaktion Ethidiumbromid zufügten. Eine UV-Lampe konnte die Fluoreszenz von dem in die DNA eingebauten Ethidiumbromid in der PCR-Maschine messen und die Konzentration der Ziel-DNA bestimmen (Higuchi et al., 1992). Heutzutage verwendet man teilweise unspezifisch (z. B. Cyber Green) oder auch sequenzspezifisch (z.B. TaqMan Sonde) fluoreszierende Farbstoffe, die mit der Ziel-DNA interagieren und die Detektion der PCR Produkte ermöglichen. Im Laufe der PCR steigt die Fluoreszenz proportional zur

Produktmenge an. Zu jedem Zeitpunkt während der Echtzeit PCR kann die Menge des entstehenden Produktes berechnet werden, die eine quantitative Messung erlauben.

Zur Bestimmung der PCR-Produktmenge stehen mehrere Detektionsprinzipien zur Verfügung, die auf Fluoreszenzfarbstoffmessung basieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Detektionsmethode die QuantiProbe-Sonde der Firma Qiagen und die Primer-Sonden Kombination von Sigma verwendet. Die Sonden sind sequenzspezifische, zweifach markierte TaqMan-Sonden, die eine spezifische Detektion der gesuchten PCR-Produkte ermöglichen, indem die Sonde zwischen den beiden Primern an die Ziel-DNA binden. An ihrem 3' Ende sind die Sonden mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein; Extinktion 490 nm, Emission 530 nm) markiert und besitzen an ihrem 5' Ende ein nichtfluoreszierendes Quenching-Molekül (Black Hole Quencher 1, BHQ1). Liegen die Sonden in ungebundener Form vor, geht von ihnen keine Fluoreszenz aus, da diese durch die Nähe des Quenchers unterdrückt wird (Livak et al. 1995). Solange das Oligonukleotid intakt ist, ist die Lichtstärke des Fluorochroms gering, wird aber der Reporter durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase freigesetzt, steigt die Lichtproduktion bei dieser Wellenlänge an (Abbildung 2.1). Die Stärke des Signals ist direkt proportional zu der vorhandenen Menge an PCR-Produkt zu diesem Zeitpunkt im Ansatz und ermöglicht so die Quantifizierung der untersuchten Sequenz.



**Abbildung 2.1: Quantifizierung von Nucleinsäuren mit Hilfe der real time-RT PCR und TaqMan®-Sonden**  
 (1) Die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors wird bei intakten TaqMan®-Sonden durch einen Quencher mittels strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) unterdrückt. (2) Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang, die Reporter-Fluoreszenz bleibt zunächst unterdrückt. (3) Die Taq-Polymerase baut auf Grund ihrer 5'-3'-Exonucleaseaktivität das 5'-Ende der Sonde während der PCR-Zyklen ab. Die Fluoreszenz des Reporters wird nun nicht mehr durch den Quencher gelöscht und kann gemessen werden.  
 (Quelle: www.wikipedia.de)

### 2.2.1.2 Funktionsweise der quantitativen real time RT-PCR

Die Ziel-RNA musste für die Genexpressionsanalyse zunächst enzymatisch mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben werden. RTs sind retrovirale, RNA-abhängige DNAPolymerasen, die das virale RNA-Genom in eine komplementäre DNA-Sequenz umschreiben. Diese cDNA kann schließlich in die DNA der Wirtszelle integrieren.

In dieser Arbeit wurde eine sogenannte Ein-Schritt-Reaktion angewendet (One-Step RT-PCR), d.h. die cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase sowie die anschließende PCR wurde in einem Reaktionsgefäß mit dem Mx4000 Multiplex Quantitative PCR System (Stratagen) durchgeführt. Die Reverse Transkriptase wird nach der Umschreibung der mRNA in cDNA bei 95°C hitzeinaktiviert. Anschließend konnte die Vermehrung (Amplifikation) der cDNA durch die PCR-Reaktion stattfinden. Es wurden immer Triplikate von einer Probe gemessen, um die Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate errechnen zu können. Zur Kontrolle und um einen besseren Vergleich zu den unterschiedlichen Reaktionsansätzen zu bekommen, wurde das „house keeping“-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) parallel zu den entsprechenden Genen amplifiziert. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Livak und Schmittgen (Livak et al. 2001). Die Quantifizierung der PCR-Produkte basiert bei real time RT-PCR Systemen auf der Messung der in einem bestimmten Bereich des Versuchablaufs proportional zur PCR-Produkt-Akkumulation ansteigenden Fluoreszenz. Die Fluoreszenzwerte werden von der Mx4000 Software übermittelt und gegen die entsprechende Zyklenzahl aufgetragen. Die Quantifizierung der Amplifikate basiert bei allen Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem sogenannten Threshold Cycle oder CT-Wert. Die Fluoreszenz des Reportersignals, das proportional zur Produktmenge ansteigt, hebt sich von der unspezifischen Basis- oder Hintergrundfluoreszenz ab. Bedingt von der entsprechenden Menge an Ziel cDNA im Reaktionsansatz wird die Schwelle zu unterschiedlichen Zykluszeiten erreicht, das eine quantitative Aussage ermöglicht. Als Negativkontrolle wurde ein Reaktionsansatz mit  $H_2O_{\text{bidest}}$  statt mit RNA untersucht. Zusätzlich wurde von jeder RNA-Probe ein Aliquot mit der AmpliTaq Gold und ohne Reverse Transkriptase angesetzt, um mögliche DNA-Kontaminationen feststellen zu können. Die verwendeten Primer wurden zuvor auf Interferenzerscheinungen untersucht. Die cDNA wurde im Anschluss bei -20°C eingefroren und hätte im Falle einer Kontamination der Negativkontrolle gelelektrophoretisch untersucht werden können.

**IL-10 Reaktionsansatz:**

Template	5 µl (50 ng) RNA
Primermix IL-10 (20x)	1,25 µl
Sonde IL-10 (20x)	1,25 µl
GAPDH fwd (10 pmol/µl)	0,5 µl
GAPDH rev (10 pmol/µl)	0,5 µl
Sonde GAPDH (10 pmol/µl)	0,5 µl
2 x reaction mix	12,5 µl
SSIII RT/Platinum-Taq (U/µl)	0,50 µl
Nuklease freies H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 25 µl

**IL-10 Reaktionsbedingungen:**

40 Zyklen                    50°C/10min - **95°C/2min - 95°C/15s - 56°C/30s - 72°C/30s** - 4°C/∞  
 ----- **40x** -----

**humanen FoxP3/ humanen INF-1α/ humanen IL-6/ murines FoxP3/ murines IL-10 Reaktionsansatz:**

Template	5 µl (50 ng) RNA
Primer X fwd (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer X rev (10 pmol/µl)	0,5 µl
Sonde X (10 pmol/µl)	0,5 µl
GAPDH fwd (10 pmol/µl)	0,5 µl
GAPDH rev (10 pmol/µl)	0,5 µl
Sonde GAPDH (10 pmol/µl)	0,5 µl
2 x reaction mix	12,5 µl
SSIII RT/Platinum-Taq (U/µl)	0,50 µl
Nuklease freies H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 25 µl

**humanen FoxP3/ humanen INF-1α/ humanen IL-6/ murines FoxP3/ murines IL-10 Reaktionsbedingungen:**

40 Zyklen                    50°C/10min - **95°C/2min - 95°C/15s - 60°C/2min** - 4°C/∞  
 ----- **40x** -----

**Reaktionsansatz Kontrolle:**

Template	5 µl (50 ng) RNA
Primer X fwd (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer X rev (10 pmol/µl)	0,5 µl
Sonde X (10 pmol/µl)	0,5 µl
GAPDH fwd (10 pmol/µl)	0,5 µl
GAPDH rev (10 pmol/µl)	0,5 µl
Sonde GAPDH (10 pmol/µl)	0,5 µl
PCR-Puffer	2,50 µl
dNTPs	0,50µl
MgCl <sub>2</sub>	1,75µl
AmpliTaq Gold	0,25µl
Nuklease freies H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 25,00µl

### 2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Das Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese beruht auf der Auftrennung von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld. Agarose, bestehend aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose, dient als interne Matrix, in dem DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückrad der DNA zur Anode wandern. Die Geschwindigkeit, mit der die Nukleinsäure durch die Matrix dringt, hängt von verschiedenen Faktoren wie Molekülgröße, Konformation der DNA, Agarosekonzentration oder angelegter Gleichspannung ab. Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich in der Matrix indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes.

Zur Trennung der PCR-Produkte, die alle zwischen 100-200 bp waren, wurde ein 2%iges Agarosegel eingesetzt. Die Agarose wurde dafür in der entsprechenden Konzentration in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und luftblasenfrei in eine vorbereitete Gelkammer (BioRad) gegossen. Die zu untersuchenden Proben wurden 1:10 mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt und in die jeweiligen Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Größe der untersuchten Fragmente wurden 10 µl des O'Gene Ruler, DNA Ladder Mix (Fermentas) Standards aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 5-8 V/cm<sup>2</sup>, was einer Spannung von ~ 80 V entspricht. Zur Auswertung wurde das Gel für 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) gefärbt. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, der zwischen die Basen der DNA 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  $\lambda_{\text{max}}=590$  nm, wobei sich die Lichtintensität proportional zur vorhandenen DNA-Menge verhält. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe des BioRad GelDoc200 (BioRad) Systems.

### 2.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### Gradienten-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al. 1986) bietet die Möglichkeit der selektiven *in vitro* Amplifikation eines DNA Abschnittes. Es handelt sich dabei um eine zyklische Reaktion, die das Aufschmelzen der komplementären DNA-Stränge (Denaturierung), die Anlagerung kurzer Oligonukleotide *upstream* bzw *downstream* der Zielsequenz (primer annealing) und die Neustrangsynthese/Kettenverlängerung (Elongation) umfasst. Während der Elongation verlängert die aus *T.aquaticus* gewonnene thermostabile Taq-Polymerase die Primer am

3'OH-Ende durch kovalentes Anfügen von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) unter Abspaltung von Pyrophosphat. Die Menge der Ziel-DNA wird in jedem Zyklus verdoppelt und die neusynthetisierte DNA dient im nächsten Zyklus als Matrize (template), so dass es zu einer exponentiellen Amplifikation des DNA-Fragmentes kommt.

Reaktionsansatz für einen 25 µl Ansatz:

Template	x µl (50 ng – 100 ng) DNA
Primer X fwd (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer X rev (10 pmol/µl)	0,5 µl
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Ampli-Taq Gold (5U/µl)	0,25 µl
Nuklease freies ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

Die Gradienten-PCR Analyse ist in der Lage, die Temperatur, bei der das primer annealing stattfindet, stufenweise zu verändern. Dadurch kann das Temperaturoptimum für das Binden der Primer an die Zielsequenz bestimmt werden.

Zu Beginn der Reaktion erfolgte eine Aktivierung der Taq-Polymerase für 7 min bei 95°C. Danach erfolgten 36 Amplifikationszyklen, welche sich aus 30 s Denaturierung, 30 s annealing (50°C – 65°C) und 30 s Elongation zusammensetzten. Zum Abschluss der Reaktion wurde die finale Extension für 5 min bei 72°C durchgeführt. Die anschließende Lagerung der Amplifikate erfolgte bei 4°C. Der verwendete Temperaturgradient hat sich wie folgt zusammengesetzt: 49,8°C, 50,2°C, 51,1°C, 52,5°C, 54,3°C, 56,2°C, 58,3°C, 60,2°C, 62°C, 63,5°C, 64,6°C, 65,1°C

Zur Analyse der optimalen annealing Temperatur wurden die amplifizierten DNA-Fragmente auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und die Intensität der Bandenstärke wurde verglichen.

### 2.2.1.5 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolation von RNA aus den PBMCs wurde mittels RNeasy Kit der Firma Qiagen durchgeführt (Qiagen, Hilden, Deutschland). Nach erfolgter Inkubation der PBMCs in 96-Well-Platten (Nunc) wurden sechs wells in ein Eppi überführt (ungefähr  $1,8 \times 10^6$  Zellen) und bei 2000 x g 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 800 µl PBS „ohne“ gewaschen und erneut bei 2000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für weitere ELISA Messungen bei -80°C eingefroren. Nach Zugabe von 600 µl Guanidin-Isothiocyanat Puffer und 6 µl Mercaptoethanol wurden die Zellen lysiert und homogenisiert. Nachdem 700 µl

Ethanol (70% in DEPC-Wasser) zugesetzt wurden, wurde die Suspension in 2 Schritten von jeweils 700 µl und 600 µl auf die RNeasy Minisäule gegeben und bei 13000 x g für 15 s zentrifugiert. Die RNA bindet an eine Silikamembran der Säule. Anschließend wurde die Säule mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen erneut bei 13000 x g für 15 s zentrifugiert und dann mit 80 µl einer Mischung aus DNaseQ und RDD-Puffer (Verhältnis 1:7, RNase-Free DNase Set, Qiagen) für 15 min inkubiert. Dem folgten Waschschrte mit 350 µl Puffer RW1 und 500 µl Puffer RPE bei 13000 x g für 15 s und ein weiterer Waschschrte mit 500 µl Puffer RPE bei 13000 x g für 1min. Zur Entfernung aller Pufferreste wurde die Säule noch einmal für 1 min bei 13000 x g zentrifugiert. Schließlich erfolgte die Elution der RNA durch Zugabe von 50 µl DEPC-Wasser bei 13000 x g für 1min. Zur Vermeidung einer RNase Kontamination wurden nur RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die RNA wurde auf 10 ng/µl verdünnt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### **2.2.1.6 RNA Konzentrationsbestimmung**

Das NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (peQLab) wurde zur Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA verwendet. Als Leerprobe wurde das zur Elution verwendete DEPC-Wasser verwendet. Der RNA-Gehalt wurde in ng/µl bestimmt und es wurde jeweils 1 µl der zu untersuchenden Probe eingesetzt und. Die Reinheit und Konzentration der RNA-Lösung wurde bei 260nm und 280nm Absorption im Spektralphotometer ermittelt. Das Absorptionsmaximum der aromatischen Pyridin- und Pyrimidinringe der Nukleinsäurebasen liegt bei 260nm. Proteine hingegen zeigen aufgrund ihrer aromatischen Aminosäurereste, den zyklischen Seitenketten einiger Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin ein Absorptionsmaximum bei 280nm. Der Quotienten beider optischer Dichten, aus der Absorption bei 260nm und 280nm, sollte bei einer kontaminationsfreien RNA-Lösung zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.2.1 Polymerisierung von Peptiden**

Die Herstellung von Homopolymeren des HIV-Isu Peptids ist notwendig, um biologisch aktive Präparationen zu erhalten (Denner et al., 1994). Offensichtlich entsteht dabei eine Konformation, die für immunregulatorische Effekte an Zellen des Immunsystems zu induzieren kann. Monomere waren biologisch nicht aktiv. Das Isu-Peptid ist 17 Aminosäuren lang und muss daher zu Polymeren verknüpft werden. EDC (1-Ethyl-3-(3-

Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid) war für das chemische Cross-Linking der Proteine eingesetzt worden. Voraussetzung hierfür ist, dass sich geeignete funktionelle Gruppen von Aminosäureresten entsprechend nahe kommen. Carbodiimid katalysiert die Bildung einer Amidbindung zwischen Carboxylsäuren und Aminen durch Aktivierung von Carboxylgruppen zur Bildung von O-N-Derivaten. Diese Derivate reagieren bereitwillig mit nukleophilen Substanzen. In 2 ml PBS wurde jeweils 4 mg Peptid und 38,4 mg EDC hinzugegeben und vermischt. Zugabe von 2mg N-Hydroxysulfosuccinimid erhöht die Halbwertszeit des Zwischenproduktes in Wasser (Staros et al., 1986) und verlängert somit die Reaktionszeit. Zur Entfernung der niedermolekularen Fraktionen erfolgte nach Inkubation des Reaktionsgemisches für 3h bei RT die Dialyse gegen PBS „ohne“ bei 4°C (molecular weight cut off, MWCO:3500 Da) (Spectra/Por Biotech). Schließlich wurde Proteinkonzentration der gekoppelten Peptide durch das BCA Protein Assay Kit (Pierce) bestimmt. Die verwendeten Peptide wurden von der Firma Genaxxon HPLC gereinigt synthetisiert. Die verwendeten Homopolymer und die Heteropolymere sind in der Tabelle 2.1 aufgelistet.

#### 2.2.2.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Für Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden das „Pierce Protein Assay Kit“ angewendet. Der BCA Proteinnachweis kombiniert die Reduktion von  $\text{Cu}_{2+}$  zu  $\text{Cu}_{1+}$  von Proteinen in einem hoch sensitiven alkalischen Medium mit einer hoch sensitiven und selektiven colormetrischen Detektion von  $\text{Cu}_{1+}$  durch Bicinchoninsäure. Der erste Schritt ist die Chelatbildung von Kupfer mit Proteinen in einer alkalischen Umgebung, welches einen blau färbenden Komplex bildet. Einzelne Aminosäuren wurden dabei nicht detektiert, jedoch Tripeptide bzw. größere Polypeptide und Proteine reagieren damit und bilden die blaue Farbe, das bei 540nm photometrisch quantifiziert wurde. Mit der Herstellung der Gebrauchslösung aus 50 Teilen BCA Reagenz A und einem Teil BCA Reagenz B beginnt die Versuchsdurchführung. Pro well wurden 200  $\mu\text{l}$  von der fertigen Gebrauchslösung in eine 96-well Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 10  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Probe vermischt. Als Vergleichsstandard diente ein „Albumin Standard“, von dem ebenfalls je 10  $\mu\text{l}$  der Verdünnungen 200, 400, 600, 800, 1000 und 1200  $\mu\text{g/ml}$  auf dieselbe Mikrotiterplatte gegeben wurden. Der Inkubation von 30 min bei 37°C folgte die Messung der Proben im ELISA Reader (Tecan) bei 560 nm mit einer Referenz von 492 nm. Die Proben wurden als Triplikate, die Standards als Duplikate untersucht, sodass der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt werden konnte.

### 2.2.2.3 Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sodium Dodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das durch Anlagerung an Proteine deren Eigenladung maskieren kann, so dass Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Dazu wurden die Proteine mit Probenpuffer vermisch und auf 95 °C erhitzt. Das im Probenpuffer enthaltene Detergenz SDS bindet an die Proteine und durch seinen anionischen Charakter werden diese negativ geladen, so dass das Verhältnis von Ladung zu Masse konstant bleibt. Durch Zugabe von reduzierenden Thiolverbindungen wie Dithiothreitol (DTT) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol wurden die Disulfidbrückenbindungen in den Proteinen aufgespalten. Wasserstoff- und Disulfidbrücken wurden so zerstört, die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine aufgelöst. Daher konnte gewährleistet werden, dass nur die Größe bzw. das Molekulargewicht als Trennkriterium wirksam wurden.

**Tabelle 2.2 : Zusammensetzung der SDS-Gele**

Trenngel (pH 8,8, 10% Acrylamid)	Sammelgel (pH 6,4, 4% Acrylamid)
2,5 ml Gelpuffer	1,0 ml Gelpuffer
2,5 ml H <sub>2</sub> O dest.	1,6 ml H <sub>2</sub> O dest.
2,5 ml Acrylamid (30%)	0,4 ml Acrylamid (30%)
50 $\mu$ l APS	50 $\mu$ l APS
5 $\mu$ l TEMED	5 $\mu$ l TEMED

Es wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt. Die verwendeten Gele waren 1,5 mm stark und zur Abschätzung des Molekulargewichtes wurden als Massenstandard 10  $\mu$ l des PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) eingesetzt. Die Trennung erfolgte vertikal in der SDS-Gelkammer Hoefer-SE 250 bei einer Spannung von 120 V begonnen.

## 2.2.3 Immunologische Methoden

### 2.2.3.1 Markierung von PBMCs mittels Antikörpern

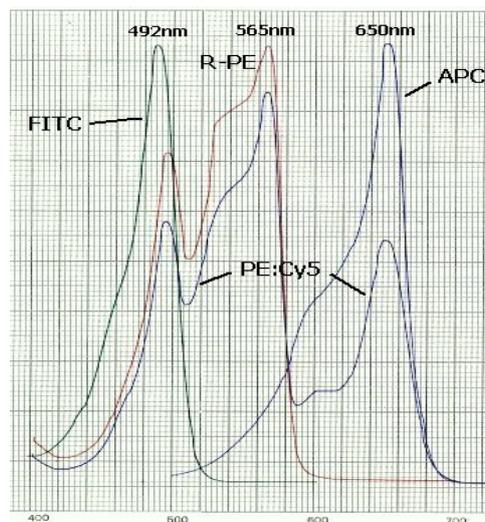
Mittels Durchflusszytometrie wurden Informationen über Größe und Struktur individueller Zellen gewonnen und die Expression von verschiedenen Oberflächenproteinen qualitativ und quantitativ analysiert. Die Membranproteine CD4 und CD25 und der Transkriptionsfaktor FoxP3 (intrazellulär) wurden mit dem entsprechenden Fluorchrom gekoppelten Antikörpern inkubiert. Zur späteren Kalibrierung der Kanäle des Durchflusszytometers wurden viermal ca.  $1,8 \times 10^6$  der im Medium inkubierten Zellen den Mikrotiterplatten entnommen. Es wurden zur

Markierung mittels Antikörpern jeweils 3 x ca.  $9 \times 10^5$  Zellen mit Isu-Homopolymer, Ran-Homopolymer und mit Medium inkubierten Zellen entnommen. Die PBMCs wurden anschließend für 5 min bei 500 x g zentrifugiert und mit 800 µl PBS gewaschen. Das Pellet wurde daraufhin in 100 µl PBS resuspendiert und mit je 5 µl anti-CD4- sowie anti-CD25-Antikörpern für 30 min bei 4 °C und leichtem Schütteln im Dunkeln inkubiert. Eine der vier Kalibrierungsproben blieb ungefärbt. Die restlichen drei Kalibrierungsproben wurden jeweils mit anti-CD8-APC, anti-CD8-PE und anti-CD3-FITC markiert und in die restlichen Inkubations- und Waschschriffe einbezogen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und mit PBS gewaschen (beide 5 min, 500 x g) und 30 min in Puffer F inkubiert (4 °C, dunkel, leicht schüttelnd). Durch das Formaldehyd wurden die Oberflächenproteine miteinander verkettet, so dass sie nicht mehr abgewaschen werden konnten. Nach Zugabe von 750 µl Puffer W und einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die PBMCs für 15 min in 750 µl Puffer P bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Das Tween20 im Puffer P diente der Perforation der Zellmembranen, damit der intrazelluläre Transkriptionsfaktor FoxP3 mit Antikörpern markiert werden konnte. Die Proben wurden mit 750 µl Puffer W vermischt und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen 30 min im Dunkeln bei 4 °C und leichtem Schütteln in 100 µl Puffer W und 5 µl Anti-FoxP3-FITC inkubiert. Die Kalibrierungsproben wurden ohne Anti-FoxP3-FITC inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit 800 µl Puffer P, wonach die PBMCs schließlich in 300 µl Puffer W resuspendiert wurden und bis zur Messung am Durchflusszytometer bei 4 °C im Dunkeln gelagert wurden. Das im Puffer W enthaltene Natriumazid sollte den Bakterienbefall der Proben verhindern.

### **2.2.3.2 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie analysiert das Streulicht und Fluoreszenzsignale von Partikeln, es ist ein optisches Messverfahren. Unter Druck wird die Probeflüssigkeit durch eine Düse gepresst und durch die unter geringerem Druck stehende Mantelflüssigkeit beschleunigt. Die entstehende lamelläre Strömung bringt jede einzelne Zelle zum Messpunkt. Ein Laserstrahl ist auf dem Messpunkt gerichtet. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften der Zellen und ihrer Fluoreszenzmarkierung wird das Licht gestreut bzw. durch Fluorochrome absorbiert und nachfolgend emittiert. Die PBMCs wurden mittels Durchflusszytometrie am FACSCalibur (BD Biosciences) untersucht, um die Antikörper markierten Proteine CD4, CD25 und FoxP3 quantitativ zu detektieren. Das reflektierte Licht wurde dabei mit Hilfe von Detektoren registriert. Trifft es auf eine Zelle, wird es gebeugt (forward scatter), wodurch auf die Zellgröße geschlossen werden kann. Des Weiteren wird das Laserlicht je nach Oberflächenstruktur der Zelle gebrochen (side scatter). Diese beiden Messdaten sind notwendig, um innerhalb der PBMCs Lymphozyten von Monozyten unterschieden. Die mit

Antikörpern konjugierten Fluoreszenz-Farbstoffe Allophycocyanin (APC), Phycoerythrin (PE) und Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC), mit denen die Proteine CD4, CD25 und FoxP3 markiert wurden, werden durch den Laser angeregt und emittieren Licht einer für sie spezifischen Wellenlänge (Abbildung 2.2). Dadurch können alle drei Proteine mit einer Messung detektiert werden. Es wurden stets  $3 \times 10^5$  Zellen, in Puffer W gelöst und gemessen. Mittels der Software CellQuest Pro (BD Biosciences) wurden die Daten verarbeitet und in Microsoft Excel aufbereitet. Aus den Ergebnissen der Triplikate wurde der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.



**Abbildung 2.2: Fluorochrome Wellenlängen Absorptionsvermögen**

Das Absorptionsvermögen von Anti-FoxP3- Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC), Anti-CD25-phycoerythrin (PE), und Anti-CD4-allophycocyanin (APC) wurde von der Durchflusszytometrie gemessen. Die Absorptionsspitzen an 490-495nm für FITC, 565nm für PE, und an 650nm für APC werden mittels Lasererregung detektiert.

### 2.2.3.3 Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für Interleukin-10

Dieses immunologische Verfahren (ELISA) dient sowohl zum quantitativen, als auch zum qualitativen Nachweis von Viren, Proteinen aber auch niedermolekularen Verbindungen wie Toxinen, Hormonen oder Pestiziden und beruht auf der Antikörpereigenschaft, spezifisch an das gesuchte Protein/Molekül zu binden. Zum Nachweisen dieser Verbindung bedient man sich in der Regel eines zweiten Antikörpers, an den ein Enzym (z.B. Meerrettich-Peroxidase HRP) assoziiert ist, welcher den Umsatz eines bestimmte Substrates (z.B. Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$ ) durch eine Farbänderung detektiert. Zur Untersuchung der IL-10 Expression in humanen PBMC's gesunder Spender, nach deren Inkubation mit verschiedenen Konjugaten, wurden  $100 \mu l$  Zellen ( $3 \times 10^5$  Zellen/ml) pro well in eine 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit jeweils  $25 \mu g/ml$  des entsprechenden Peptides über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 10 min bei  $2000g$  zentrifugiert und der abgenommene Überstand bei  $-80^\circ C$  zur folgenden Nutzung eingefroren. Mit Hilfe des Interleukin-10 ELISA (BD Biosciences, San Diego, USA) wurde der IL-10

Gehalt in den Überständen bestimmt, dabei wurden die wells einer Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µl *capture-antibody* in *coating buffer* ÜN bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde jedes well dreimal mit 300 µl Waschpuffer pro Well gewaschen und zur Entfernung der Pufferreste die Mikrotiterplatte auf Zellstoff ausgeschlagen. Diese drei Waschschrte wurden nach einstündiger Inkubation mit 200 µl *assay diluent* pro Well repetiert. Von den aufgetauten Überstände aus der Inkubation mit den PBMC`s wurden 100 µl pro Well aufgetragen. Ausserdem wurden Standard Verdünnungen von 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6, 7,8 und 0 pg/ml rekombinatem IL-10 pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Im folgenden wurde nach fünf Waschgängen der *working detector*, der den *detection antibody* und Avidin HRP enthielt, hinzu appliziert (100 µl/Well). Als nächstes nach einstündiger Inkubation bei RT und 7 x Waschen (Einwirkzeit jeweils 30 sek) wurde die Substratlösung hinzugegeben (100 µl/Well). Nach weiteren 30 min in Dunkelheit und bei RT wurden 50 µl Stopplösung in jede Vertiefung pipettiert und die Absorption am ELISA Reader Spectra Classic (Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm zu gemessen (Referenzwert: 560 nm). Aufgrund des Vergleichs mit der Kalibriergeraden konnte der IL-10-Gehalt der Proben bestimmt werden.

#### 2.2.3.4 Western Blot

Western Blot bezeichnet den Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Membran und die anschließende immunologische Detektion mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers. Sowohl das SDS-Gel, als auch die zwei Blotting Filterpapiere wurden zunächst für 10 min in Transferpuffer gelegt. Auch die PVDF-Membran (0,2 µm) (Millipore Immobilon) wurde kurz in Methanol und danach ebenfalls für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Im Anschluss wurde der Blot-Sandwich in der Reihenfolge Anode, Blot-Papier, PVDF-Membran, SDS-Gel, Blot-Papier, Kathode in der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) aufgebaut und zum Übertragen der Proteine auf die Membran für 30 min auf 20 V eingestellt. Danach wurde die Membran 1 h bei RT in Blockierungspuffer geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die weitere Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1,5 h bei RT bzw. Übernacht bei 4 °C. Nach dem Waschen mit Waschpuffer (3 x 10 min) erfolgte die Inkubation für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper und nach erneutem 3 x Waschen (jeweils 10 min) erfolgte die Detektion mittels *enhanced chemoluminescence* (ECL Western Blotting Detection Reagents Kit von Amersham). Das Luminol, (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion) welches im Kit enthalten ist, wird durch die mit den Sekundärantikörpern konjugierte *horse radish peroxidase* (HRP) und Wasserstoffperoxid oxidiert und in einen angeregten Zustand versetzt. Die dabei gespeicherte Energie wird in Form von Licht (Chemilumineszenz) wieder abgegeben, wobei die *enhanced chemiluminescence* sich in verstärkter und länger anhaltender Emission von Licht äußert, die durch Zugabe von Phenolen erreicht wird.

Danach wurde die Membran 1 min bei RT und Dunkelheit darin inkubiert und im Anschluss in einer Photokassette (Kodak) der CL-XPosure™ Clear Blue X-Ray Film (Pierce) aufgelegt. Die Entwicklung erfolgte in der Entwicklermaschine Curix 60 (Agfa).

## 2.2.4 Zellkulturtechniken

### 2.2.4.1 Kultivierung von humanen PBMCs

Nach der Isolierung der PBMCs wurden die Zellen in Nunclon™ delta Surface 96-Well-Platten (Nunc) im Brutschrank (Sanyo Biomedical) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Ausserdem wurden zu den jeweils 100 µl Zellsuspension 50µl PBMC-Nährmedium und 50 µl Protein-/Peptidlösung pipettiert, so dass eine Konzentration von 1,5 x 10<sup>6</sup> PBMCs/ml erreicht wurde. Zu Kontrolle diente die Inkubation in PBMC-Medium. Die Inkubationszeiten variierten zwischen zwei Stunden und drei Tagen und sind im Ergebnisteil für jeden Versuch angegeben.

### 2.2.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Lebendzellzahl zu bestimmen, wurde ein Aliquot einer PBMC-Suspension mit 0,4 %igem Trypanblau (Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1 : 1 vermischt. Dabei wurden bereits tote Zellen durch den Farbstoff, der beschädigten Zellmembranen durchdringen kann, intrazellulär blau gefärbt und bei der Zählung der PBMCs nicht berücksichtigt. Trypanblau ist ein negativ geladenes Chromophor, welches unspezifisch mit Proteinen interagiert. In lebende Zellen dringt Trypanblau nicht ein, sodass diese hell leuchten. Danach wurde die gefärbte Zellsuspension auf eine Neubauerzählkammer aufgetragen und aus der Anzahl der Zellen in den vier Zählfeldern der Mittelwert berechnet.

Anhand folgender Formel wurde die Zellzahl berechnet:

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

(Z=Dichte der Zellen pro Volumen, N= Mittelwert der Zellzahlen, 2=Verdünnungsfaktor Trypanblau, 10<sup>4</sup> =Faktor der Neubauerzählkammer)

Die isolierten PBMCs wurden anschließend in PBMC-Nährmedium resuspendiert und auf 3 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml verdünnt.

### **2.2.4.3 Isolation humaner PBMCs aus Vollblut**

Die Isolation mononuclearer Zellen aus frischem, peripherem Blut erfolgte mit Hilfe von LeucoSep-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Deutschland) und wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wird ein Leukozytenseparationsmedium (Ficoll-Isopaque, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) verwendet und eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Zunächst wurden 15 ml des Separationsmediums in ein 50 ml Leucosep Röhrchen mit Filterscheibe pipettiert und für 1 min (800xg, RT) zentrifugiert. Anschließend wurden 15-30 ml mit Heparin versetztes Blut vorsichtig in jeweils ein Röhrchen gegeben und für 15 min bei 800xg ohne Bremse zentrifugiert. Die Lymphozyten und Monozyten trennen sich dabei in der Interphase zwischen Überstand (Plasma, Thrombozyten) und Ficoll-Isopaque entsprechend ihrer spezifischen Dichte. Unter der Filterscheibe bilden Erythrozyten und Granulozyten das Zellsediment, die sich wegen ihrer höheren Dichte absetzen. Das Blutplasma, die oberste Phase, wurde abgenommen und verworfen. Darunter sammelten sich die Lymphozyten in einer Phase ab, der vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues 50 ml Falcon überführt wurde. Die isolierten PBMCs wurden in 50 ml PBS „ohne“ aufgenommen und anschließend für 10 min bei 250xg zentrifugiert. Eine Erythrocyten Kontamination wurde durch die rote Farbe des Pellets erkannt. Das Zellpellet wurde bei Kontamination in 10 ml 0,86%igem Ammoniumchlorid für 20 min bei 37°C inkubiert um die Erythrocyten zu entfernen. Den drei Waschschritten mit PBS „ohne“ für 10 min bei 250xg folgte eine Lebendzellzahlbestimmung. Schließlich wurden die weitestgehend kontaminationsfreien PBMCs im PBMC-Nährmedium resuspendiert auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt.

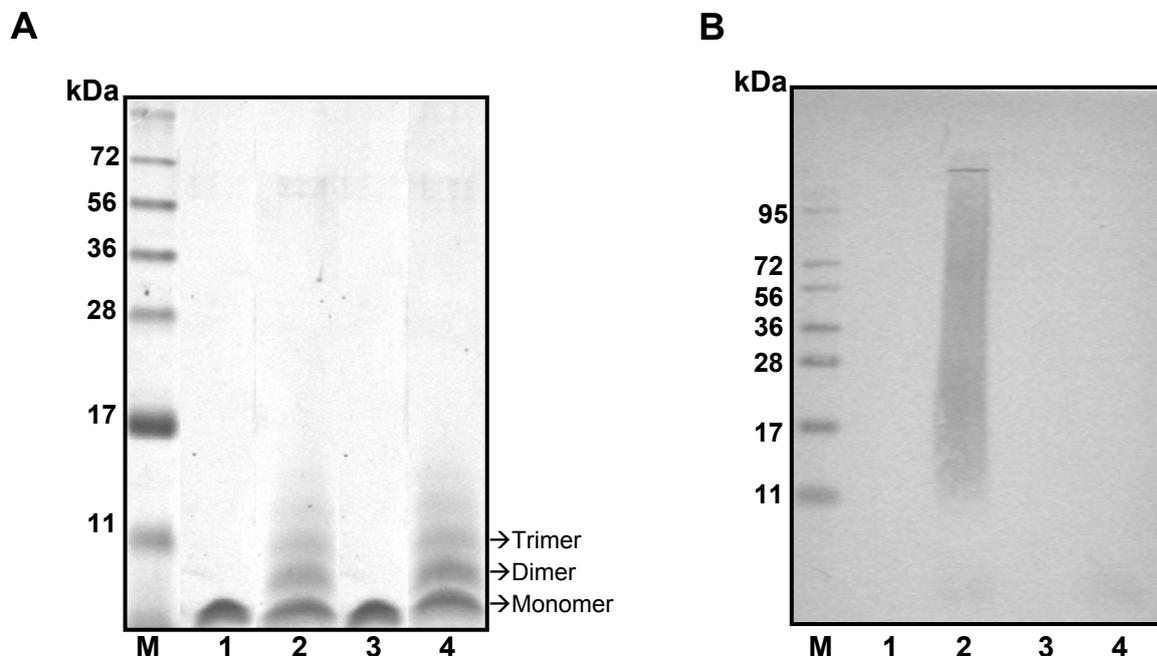
### **2.2.4.4 Präparation von Milzzellen aus der C57BL/6 Mauslinie**

Die C57BL/6 Versuchstiere wurden mit Ether betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Das Mausfell wurde mittels 70%-igem Alkohol desinfiziert, der Peritonealraum mittels einer Schere eröffnet und die Milz entnommen. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension aus der entnommenen Milz wurde diese mittels Spritzkolben zerkleinert und durch ein Metallsieb (Porengröße 100  $\mu\text{m}$ ) in frisches RPMI 1640 Medium gerieben. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden 1x mit RPMI 1640 Medium gewaschen und anschließend auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung und Charakterisierung von Peptid-Polymeren

Da die Isu-Peptide als Monomere keine Wirkung auf die Proliferation immunkompetenter Zellen hatten (Denner et al., 1994), wurden sie zur Erlangung einer biologisch aktiven Konformation mittels EDC zu Peptid-Homopolymeren gekoppelt (siehe 2.2.2.1). Die durchschnittliche Kopplungseffizienz lag bei 20 % und wurde mit Hilfe der Pierce-Proteinbestimmung ermittelt (siehe 2.2.2.2). Im Anschluss wurden die gekoppelten Homopolymere mittels SDS PAGE Analysen (siehe 2.2.2.3) und Western Blot Analysen (siehe 2.2.2.6) charakterisiert.



**Abbildung 3.1: Exemplarische Darstellung der Peptid-Homopolymere mittels einer SDS-PAGE Analyse (A) und Western Blot Analyse (B)**

1: HIV Isu Peptid-Monomer (10µg/ml), 2: HIV Isu Peptid-Homopolymer (10µg/ml), 3: HIV Ran Peptid-Monomer (10µg/ml), 4: HIV Ran-Peptid-Homopolymer (10µg/ml), M: Marker

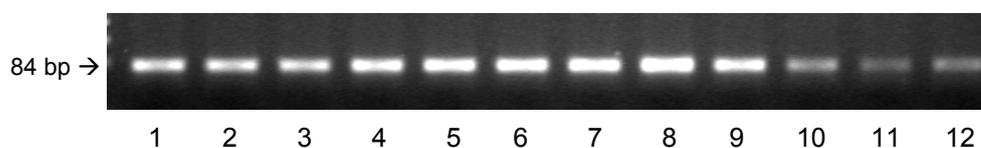
**A)** SDS-Gel, Coomassie-Brilliant Blue gefärbt **B)** Western Blot eines HIV Isu-Peptid-Homopolymer Kopplungsansatzes, Primerantikörper: monoklonaler B3 Antikörper von der Maus (1:2), Sekundärantikörper: anti-Maus 1:2000

Im SDS-Gel wurde eine Bande im niedermolekularen Bereich detektiert, die der berechneten Größe des Monomers von 2,3 kDa entspricht. Spur 1 (Abbildung 3.1 A) zeigt das HIV-Isu Peptid Monomer und Spur 3 zeigt ein HIV-Ran Peptid-Monomer. Bei der Kopplung des HIV-Isu Peptid-Monomers bzw. HIV-Ran Peptid-Monomers zu Homopolymeren lag ein Teil der Peptide ungekoppelt vor und ein weiterer Teil als niedermolekulare Polymere (Spur 2 und 4).

Die Polymerisationsstufen (Monomer, Dimer, Trimer) konnten dabei in der Spur 2 und 4 nachgewiesen werden (Abbildung 3.1 A). Weiterhin konnte die Bildung hochmolekularer Strukturen erst mittels Western Blot Analyse gezeigt werden (Abbildung 3.1 B, Spur 2). Bei der Western Blot Analyse wurde der monoklonale Antikörper B3 verwendet, der nach Immunisierung mit dem Isu-Peptid gekoppelt an BSA gewonnen wurde (Daten unveröffentlicht). Mittels SDS-PAGE Analyse und anschließender Western Blot Analyse konnte somit die erfolgreiche EDC-Kopplung von Monomeren zu Polymeren nachgewiesen werden.

### 3.2 Etablierung einer real time RT-PCR zur quantitativen Analyse der Expression von Cytokinen und FoxP3

Die real time PCR wurde für folgende Cytokine etabliert: humanes IL-6, humanes IL-10, humanes INF-1 $\alpha$ , humanes FoxP3, humanes GAPDH, murines FoxP3, murines IL-10 und murines GAPDH. Dazu wurden die Primer zuvor mittels Gradienten PCR getestet, um die optimale Annealing-Temperatur zu bestimmen. Exemplarisch ist ein Agarose-Gelbild dargestellt, in der die Ergebnisse der Analyse der INF-1 $\alpha$  Primer gezeigt werden (Abbildung 3.2). Die verwendeten Primer amplifizierten ein 86bp langes Fragment. Die Gradienten PCR wurde zwischen 50°C-65°C Annealing-Temperatur programmiert. In der ersten Spur wurde das PCR Produkt bei 49,8°C Schmelztemperatur aufgetragen, es folgten: 50,2°C; 51,1°C; 52,5°C; 54,3°C; 56,2°C; 58,3°C; 60,2°C; 62°C; 63,5°C; 64,6°C und 65,1°C. Ab einer Temperatur von 63°C nahm die Intensität des Fragmentes ab (Spur 10-12). Bei einer Annealing-Temperatur von 60°C (Spur 8) war die Darstellung der entstandenen Fragmente am intensivsten.

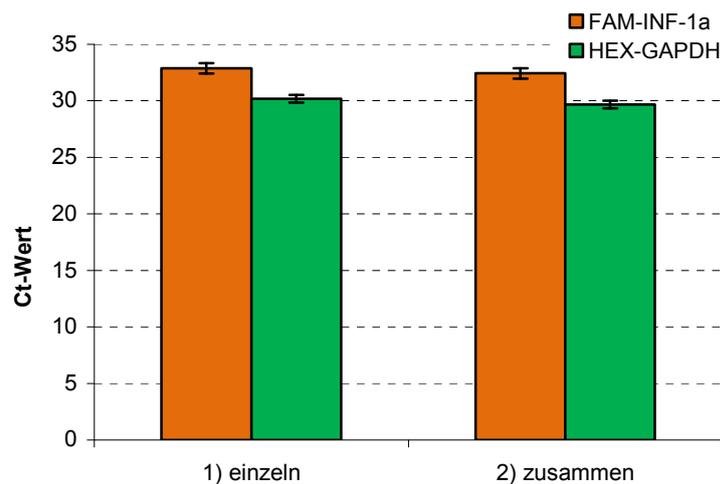


**Abbildung 3.2: Exemplarische Gradienten PCR**

Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur wurden INF-1 $\alpha$  Primer getestet mit 100ng DNA. Annealing-Temperatur in Spur 1= 49,8°C; 2= 50,2°C; 3= 51,1°C; 4= 52,5°C; 5= 54,3°C; 6= 56,2°C; 7= 58,3°C; 8= 60,2°C; 9= 62°C; 10= 63,5°C; 11= 64,6°C; 12= 65,1°C

Neben den INF-1 $\alpha$  Primer (Abbildung 3.2) wurde die optimale Annealing-Temperatur der humanen IL-6, humanen IL-10, humanen FoxP3, humanen GAPDH, murinen FoxP3, murinen IL-10 und murinen GAPDH Primer mittels Gradienten PCR ermittelt (Daten nicht gezeigt). Die optimale Annealing-Temperatur für humanen IL-10 lag bei 56°C, die für die restlichen Primer bei 60°C.

Nach der Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur wurden die beiden Primerpaare auf mögliche Interferenzen in einem Vorversuch getestet. Bei der gleichzeitigen Verwendung von zwei verschiedenen Primerpaaren kann es zu unspezifischen Bindungen zwischen den einzelnen Primern kommen (Primerinterferenzen). Für die real time RT-PCR Analysen wurden jeweils zwei Primerpaare gleichzeitig verwendet. Als Referenzgen für die Expressionsprofile wurde ein Gen benötigt, das im gesamten Differenzierungszeitraum mit gleicher Stärke exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde das *housekeeping*-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, um eine Veränderung der Genexpression des untersuchten Gens zu ermitteln. Zusätzlich gibt ein gleichbleibender GAPDH-Wert einen Hinweis darauf, dass die verwendeten Homopolymere keine zytotoxischen Effekte hervorrufen. An die Primer des untersuchten Gens wurde Fam-Fluorchrom, an die Primer für das *house-keeping* Gen GAPDH das Hex-Fluorchrom gekoppelt. Um Primerinterferenzen auszuschließen wurden zuvor diese Untersuchungen mit allen Genen durchgeführt. Exemplarisch ist der Vorversuch von INF-1 $\alpha$  und GAPDH Primer auf mögliche Interferenzen dargestellt (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Analyse zum Ausschluss von Primerinterferenzen bei der real time RT PCR**

Es wurden gleichzeitig zwei Primerpaare verwendet. Die beiden Versuchsansätze, einzeln und zusammen, beschreiben die Anzahl der Primerpaare in einem Reaktionsschritt **1) einzeln**: die Primer wurden einzeln untersucht, um den Ct-Wert zu ermitteln **2) zusammen**: die beiden Primer Paare wurden gleichzeitig untersucht und der Ct-Wert ermittelt

Die Primer für INF-1 $\alpha$  und GAPDH wurden einzeln und zusammen untersucht und die Mittelwerte beider Versuchsansätze (einzeln, zusammen) miteinander verglichen. Bei gleichzeitiger Verwendung der beiden Primerpaare waren also keine Primerinterferenzen aufgetreten. Die Primer für humanes IL-6, humanes IL-10, humanes FoxP3, murines FoxP3 und murines IL-10 zeigten im Vortest ebenfalls keine Primerinterferenz Vorkommnisse (Daten nicht gezeigt).

### 3.3 Cytokinmodulation nach Inkubation von humanen PBMCs mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer

Um den Einfluss eines HIV-1 Isu-Homopolymer und des rekombinanten TM Proteins von HERV-K TM auf die Sekretion der proinflammatorischen Cytokine IL-10, IL-6 und INF-1 $\alpha$  zu untersuchen, wurden beide Materialien mit humanen PBMCs inkubiert. Die Expression der Cytokine wurde mittels real time RT-PCR gemessen. Die Modulation der Cytokinexpression wurde während 24 Stunden untersucht. Dazu wurden PBMCs von verschiedenen Spendern verwendet (Tabelle 3.1), die eine definierte Zeit mit HIV-1 Isu-Homopolymer bzw. mit HIV-1 Ran-Homopolymer inkubiert wurden.

**Tabelle 3.1: Spenderliste mit Namenskürzel und Charakterisierung der Versuche**

Sender Nummer	Namenskürzel	real time RT-PCR	Durchflusszytometrie
Spender 1	S.S	1.Kinetik	24h Inkubation
Spender 2	C.S	2.Kinetik	/
Spender 3	C.K	3.Kinetik	24h Inkubation
Spender 4	M.E.	4.Kinetik	/
Spender 5	S.B.	/	24h-72h Proteinkinetik

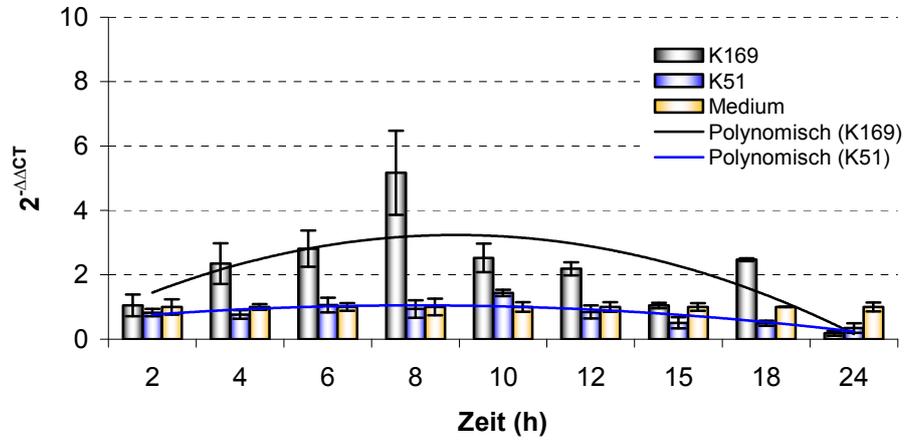
Als Kontrolle wurden die PBMCs mit randomisierten Isu-Homopolymeren (Ran-Homopolymer) und mit Medium inkubiert.

#### 3.3.1 Expression von IL-10 nach Inkubation humaner PBMCs mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer und HERV-K TM

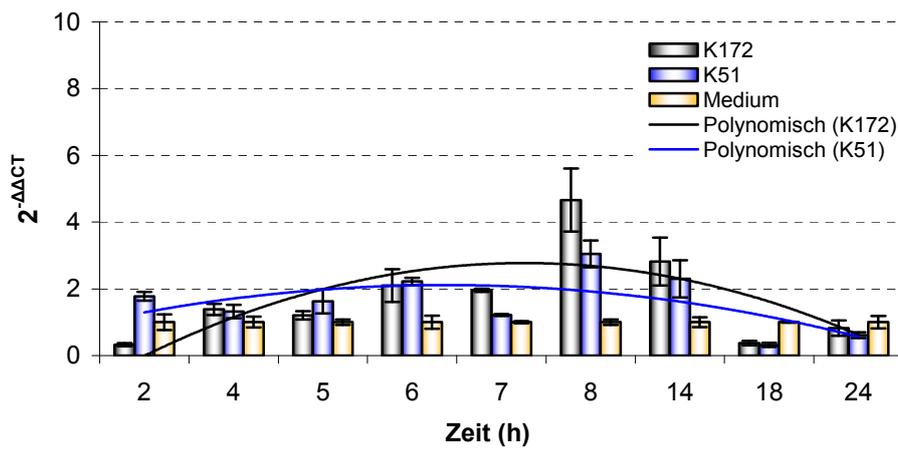
Die IL-10 Sekretion wurde generell als wichtiger Indikator verwendet, um den Einfluss der HIV-1 Isu-Homopolymere *in vitro* auf die Cytokinmodulation zu untersuchen. Da in früheren Arbeiten durch die Isu-Homopolymer induzierte IL-10 Genexpression nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden durchgeführt wurde, konnte keine signifikante Hochregulierung des Gens nachgewiesen werden, obwohl eine erhöhte Expression des Cytokinmoleküls im Überstand der behandelten PBMCs nachweisbar war (Denner, 1998). Microarray Untersuchungen zeigten ebenfalls nach 24 Stunden keine IL-10 Hochregulierung der mRNA (unveröffentlicht).

IL-10 real time RT-PCR

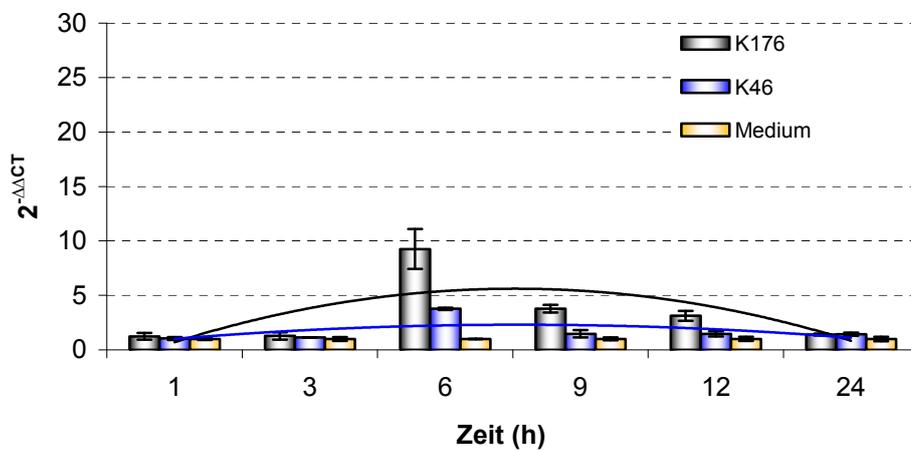
**A Spender S.S**

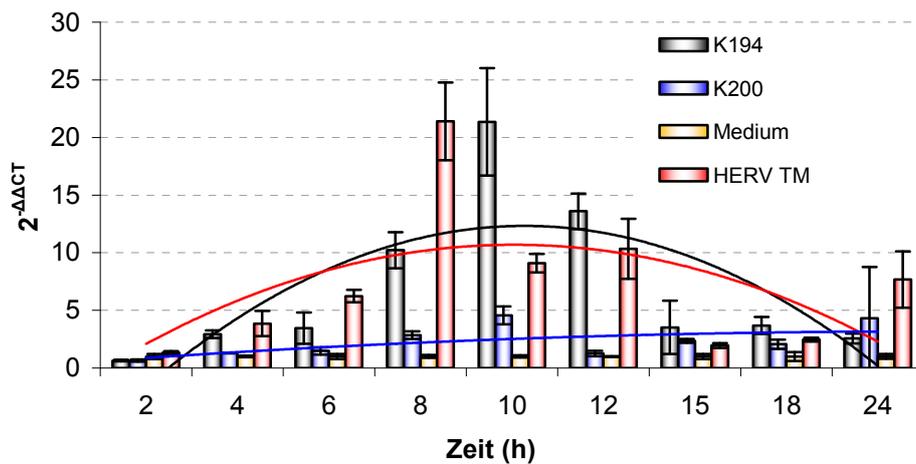


**B Spender C.S.**



**C Spender C.K.**



**D Spender M.E.****Abbildung 3.4: Analyse der Expression von IL-10 (24 Stunden Kinetik)**

**A)** Die PBMCs des Blutspenders S.S wurden mit 12,5µg/ml Isu-Homopolymer (K169) und 12,5µg/ml Ran-Homopolymer (K51) inkubiert, gemessen an neun Messpunkten. **B)** Die PBMCs vom Blutspender C.S mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K172)/ Ran-Homopolymer (K51) inkubiert, gemessen an neun Messpunkten. **C)** Die PBMCs vom Blutspender C.K mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K176)/ Ran-Homopolymer (K51) inkubiert, gemessen an sechs Messpunkten. **D)** Die PBMCs vom Blutspender M.E. mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K194)/ Ran-Homopolymer (K200)/ Transmembranprotein HERV TM inkubiert, gemessen an neun Messpunkten.

Die Standardabweichungen ergaben sich aus den Mittelwerten der untersuchten Triplikate. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurden mathematisch berechnete polynomische Trendlinien ( $y = b + c_1x + c_2x^2 + c_3x^3 \dots c_6x^6$ ) herangezogen, um Trends grafischer Daten darzustellen. Die Sekretion des IL-10 im Überstand des PBMC Mediums konnte nach 24 Stunden mittels IL-10 ELISA stets nachgewiesen werden. Die Zunahme der Expression des Cytokins konnte durch Cytokinarray Analysen ebenfalls bestätigt werden (unveröffentlicht). Die Veränderung der Expression des Cytokins IL-10 nach der Inkubation der PBMCs mit dem Isu-Homopolymer wurde mittels real time RT-PCR und auf der Protein-Ebene mittels IL-10 ELISA untersucht. Als Kontrolle wurden die PBMCs mit randomisierten Isu-Homopolymeren und mit Medium inkubiert.

Die Zellen des Spenders S.S. wurden mit 12,5µg/ml Isu-Homopolymer (K169) und Ran-Homopolymer inkubiert. Nach acht Stunden wurde eine fünffache Hochregulierung der IL-10 Expression beobachtet. Bei Ran-Homopolymer (K51) und Medium dagegen konnte keine Erhöhung detektiert werden (Abbildung 3.4.1 A). Die polynomische Trendlinie macht die Zunahme bis zum Erreichen des Maximums und die kontinuierliche Abnahme deutlich.

Für die Inkubation der PBMCs von Spender C.S. mit dem Isu-Homopolymer, wurden in dieser Kinetik andere Messpunkte gewählt, um die Entwicklung in den ersten acht Stunden exakter bestimmen zu können (Abbildung 3.4 B). Bei Inkubation der Zellen des Spenders C.S. mit Isu-Homopolymer (K172) konnte nach acht Stunden eine 4,4-fache Hochregulierung beobachtet werden. In dieser Versuchsreihe zeigten die mit dem Ran-Homopolymer (K51)

inkubierten Zellen nach 8 und 14 Stunden ebenfalls eine dreifache Hochregulierung von IL-10 im Vergleich zur Mediumprobe.

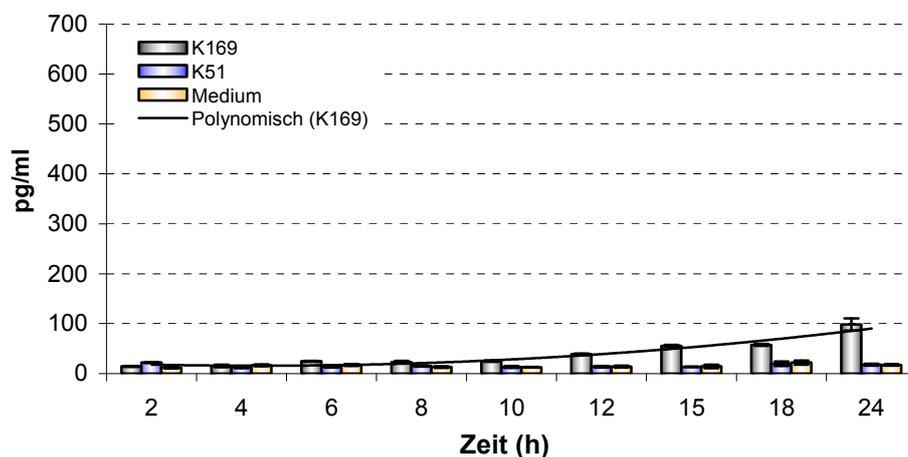
Bei der Inkubation der PBMCs des Spenders C.K. mit dem Isu-Homopolymer (K176) und dem Ran-Homopolymer (K46) zeigte sich eine deutliche Steigerung der IL-10 Genexpression im Vergleich zur Kinetik von Spender S.S und C.S (Abbildung 3.4 C). In dieser Kinetik erhöhte sich die IL-10 Transkription nach sechs Stunden um ein zehnfaches im Vergleich zu unbehandelten PBMCs. Bei dem randomisierten Peptid konnte eine 3,5fache Erhöhung beobachtet werden. Nach 24 Stunden wurde nach Abnahme der IL-10 Expression das Ausgangsniveau wieder erreichte.

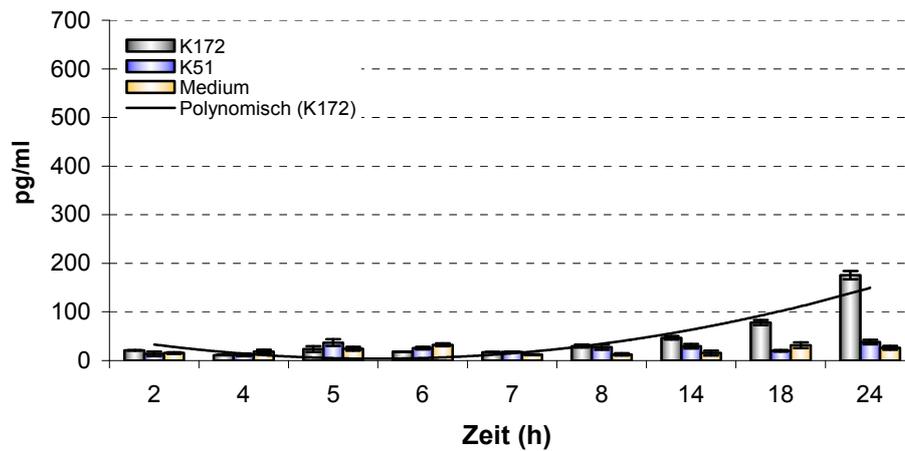
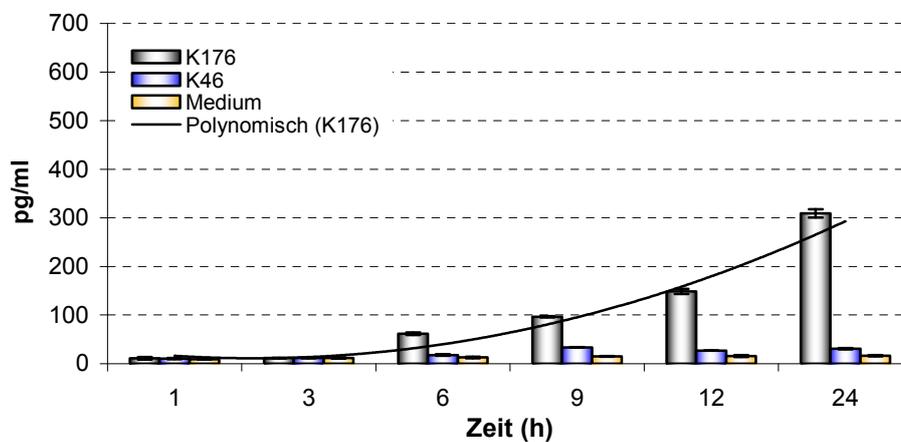
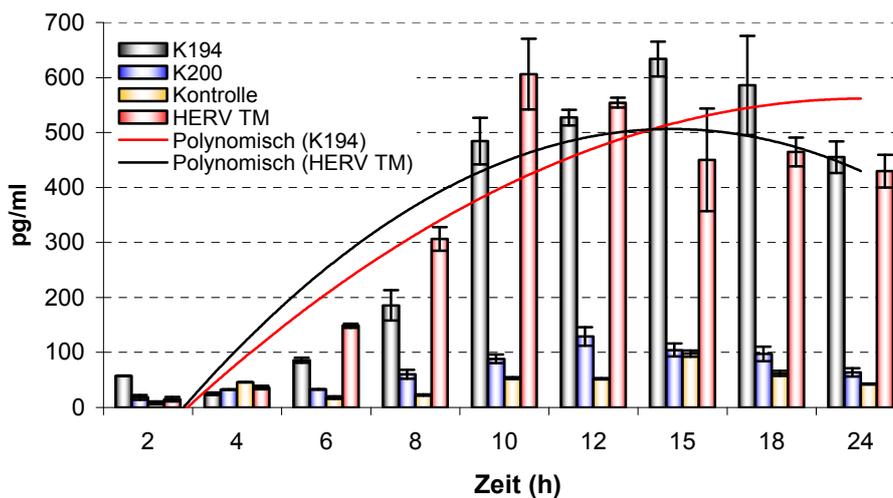
Beim Spender M.E. wurde nach Inkubation der PBMCs mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K194) und 5µg/ml HERV TM ein vergleichbares Muster der IL-10 Genexpression beobachtet. Die Inkubation mit dem Isu-Homopolymer führte zu einer stetigen Zunahme der Genexpression. Nach zehn Stunde wurden die IL-10 mRNA im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, 22fach hochreguliert. Dem folgte eine kontinuierliche Abnahme der Expression. Die mit dem HERV-K TM inkubierten Zellen zeigten nach acht Stunden ebenfalls eine 22fache Hochregulierung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Anhand der polynomischen Trendlinien von Isu-Homopolymer und HERV TM kann der ähnliche Verlauf der IL-10 Genexpression verdeutlicht werden. Bei Inkubation der Zellen mit dem Ran-Homopolymer konnte keine signifikante Erhöhung des IL-10 Transkripts beobachtet werden. Die IL-10 Expression erreichte nach 24 Stunden stets das Ausgangsniveau, was die Ergebnisse der Microarray Analyse erklären würde.

Es konnte anschließend mittels ELISA nachgewiesen werden, dass die IL-10 Genexpression mit der Zunahme der Konzentration von IL-10 auf Protein Ebene im Zellkulturüberstand korrelierte (Abbildung 3.5).

## IL-10 ELISA

### A Spender S.S.



**B Spender C.S.****C Spender C.K.****D Spender M.E.****Abbildung 3.5: Untersuchung der Interleukin-10 Sekretion mittels ELISA**

Die IL-10 Konzentration im Überstand des PBMC Mediums wurde gemessen in pg/ml (y-Achse). Die PBMCs wurden für einen definierten Zeitraum (x-Achse) mit Isu-Homopolymer, Ran-Homopolymer und Medium inkubiert. **A)** Die PBMCs des Blutspenders S.S wurden mit 12,5µg/ml Isu-Homopolymer (K169) und 12,5µg/ml Ran-Homopolymer (K51) für neun Messpunkte inkubiert. **B)** 24 Stunden Kinetik, PBMCs vom Blutspender C.S mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K172)/ Ran-Homopolymer (K51) für neun Messpunkte inkubiert. **C)** 24 Stunden Kinetik für sechs Messpunkte inkubiert, PBMCs vom Blutspender C.K mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K176)/ Ran-Homopolymer (K51) inkubiert. **D)** 24 Stunden Kinetik für neun Messpunkte, PBMCs vom Blutspender M.E. mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K194)/ Ran-Homopolymer (K200)/ transmembranen Hüllprotein HERV-K TM inkubiert.

Der Schwellenwert für eine positive IL-10 Antwort wurde in dieser Arbeit durch den Mittelwert aller gemessenen Kontrollen nach Addition der Standardabweichungen auf 35 pg/ml festgelegt. In dieser Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass die Höhe der IL-10 Sekretion vom Spender abhängig ist (Lauck, 2008). Diese Daten konnten hiermit bestätigt werden.

In der Kinetik A wurden die PBMCs von Spender S.S mit 12,5µg/ml Isu-Homopolymer (K169) und Ran-Homopolymer (K51) inkubiert. Anschließend wurden die IL-10 Konzentration in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen. Es konnte eine kontinuierliche Zunahme der IL-10 Sekretion ab der Stunde acht beobachtet werden, bis nach 24 Stunden die Konzentration ein Maximum von 100pg/ml erreichte. Die Ran-Homopolymer inkubierten Zellen und die Mediumkontrolle zeigten keine signifikante Änderung der IL-10 Konzentration (Abbildung 3.5 A).

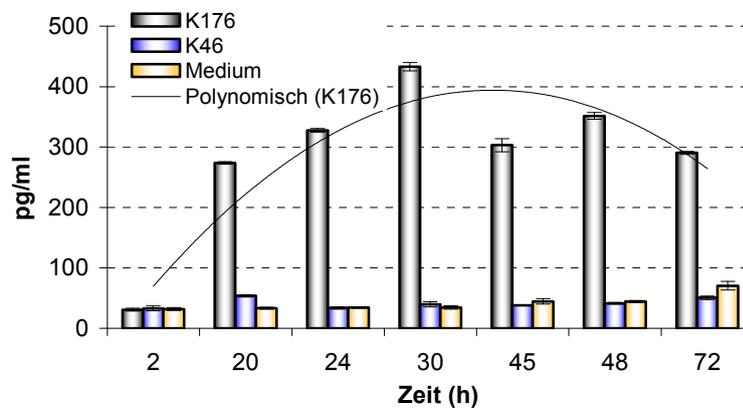
Die Kinetik B wies eine vergleichbare Entwicklung der IL-10 Sekretion auf. Die PBMCs von Spender C.S. wurden mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K172) und Ran-Homopolymer (K51) inkubiert. Die Maximale IL-10 Konzentration wurde hierbei nach 24 Stunden mit 170 pg/ml erreicht (Abbildung 3.5 B).

In der Kinetik C wurden die PBMCs von Spender C.K. mit K176 Isu-Homopolymer und K51 Ran-Homopolymer inkubiert und gleicht der Kinetik A und B. Die IL-10 Sekretion erreichte ein Maximum von 310 pg/ml nach 24 Stunden (Abbildung 3.5 C).

Die Inkubation der PBMCs von Spender M.E. mit Isu-Homopolymer (K194) und Ran-Homopolymer (K200) ergab sich ein verändertes Sekretionsmuster. Die IL-10 Sekretion der Isu-Homopolymer inkubierten Zellen nahm nach acht Stunden kontinuierlich zu, bis nach 15 Stunden eine maximale Konzentration von 630pg/ml erreicht wurde. Anschließend nahm die Konzentration geringfügig auf 490pg/ml ab. Die Inkubation mit dem HERV-K TM führte zu einem Maximum des IL-10 Gehaltes von 600pg/ml nach zehn Stunden, dem folgte eine kontinuierliche Abnahme bis auf einen IL-10 Wert von 450pg/ml nach 24h. Die Inkubation mit dem Ran-Peptid zeigte nach 12 Stunden einen leichten Anstieg des IL-10 Gehaltes bis auf ein Maximum von 120pg/ml (Abbildung 3.5 D).

Die IL-10 Genexpressionsrate korreliert mit der Höhe der IL-10 Proteinkonzentration. Durch einen Langzeitversuch über 72 Stunden sollte der weitere Verlauf der IL-10 Sekretion nach 24 Stunden im Zellkulturüberstand aufgeklärt werden (Abbildung 3.6). Die PBMCs von Spender C.K wurden mit K176 Isu-Homopolymer und K46 Ran-Homopolymer inkubiert. Somit waren, bis auf den Zeitpunkt der Blutabnahme, dieselben Bedingungen wie in der 3.Kinetik geschaffen worden (Abbildung 3.5 C). Der Gesundheitszustand des Spenders zum Zeitpunkt der Blutabnahme könnte bei der IL-Sekretion eine große Rolle spielen. Die Kinetik C und der Langzeitversuch zeigten nach 24 Stunden vergleichbar hohe IL-10

Konzentrationen. In dieser Arbeitsgruppe konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass die IL-10 Sekretion beim selben Spender abweichen kann (Behrendt, 2005).



**Abbildung 3.6: 72 Stunden Messung der IL-10 Konzentration im Zellkulturüberstand**

Überstand des PBMC Mediums von Spender C.K. gemessen wurde in pg/ml. Die PBMCs wurden für Zeitraum über 2-72 Stunden mit Isu-Homopolymer (K176), Ran-Homopolymer (K46) und Medium inkubiert.

Bei Inkubation der PBMCs mit dem Isu-Homopolymer zeigte sich nach 30 Stunden eine maximale IL-10 Konzentration von 430pg/ml. In den Stunden 45, 48 und 72 erreichte der IL-10 Gehalt im Zellkulturüberstand ein nahezu gleich bleibendes Niveau bei ungefähr 300pg/ml.

Die Ran-Homopolymer und mit Medium inkubierten Zellen zeigten in diesem Zeitraum keine signifikante Erhöhung der IL-10 Sekretion.

Es konnte gezeigt werden, dass die HIV-1 Isu-Homopolymere eine Hochregulierung des Gens und die Sekretion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 induzierte. Die Kontrollhomopolymere HIV-1 Ran und die Mediumkontrolle hingegen zeigten keine signifikante Induktion der IL-10 Expression. Für HERV-K TM konnte ebenfalls eine IL-10 Expression beobachtet werden. Es wurden Schwankungen der IL-10 Expression beobachtet, die abhängig vom Spender und kopplungsspezifisch waren. Langzeituntersuchungen zeigten, dass sich der IL-10 Gehalt nach 24 Stunden nicht weiter verändert, sodass keine weitere Hochregulierung des Gens stattfand.

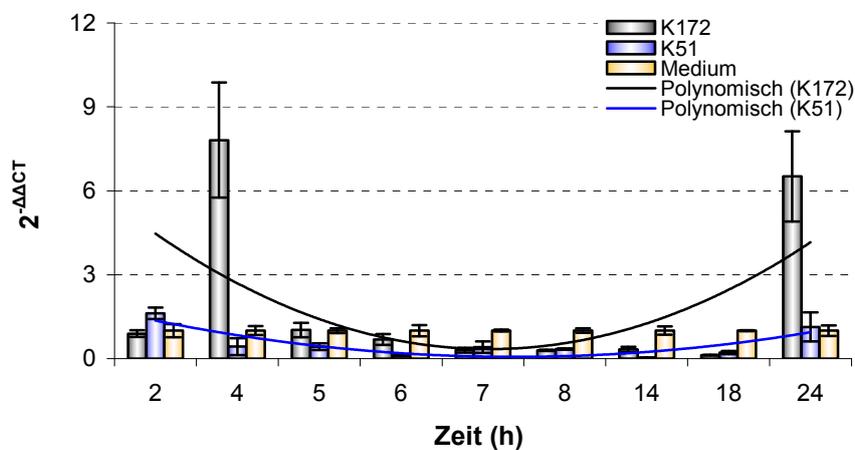
### 3.3.2 Expression von INF-1 $\alpha$ nach Inkubation humaner PBMCs mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer

Eine Virusinfektion von Zellen induziert die Produktion von Interferon-1 $\alpha$  (INF-1 $\alpha$ ) und blockiert somit die Verbreitung der Viren in gesunden Zellen (Taniguchi et al. 2001). In der vorhergehenden Arbeit konnte die Zunahme des antiviralen Effektor Moleküls INF-1 $\alpha$  gezeigt

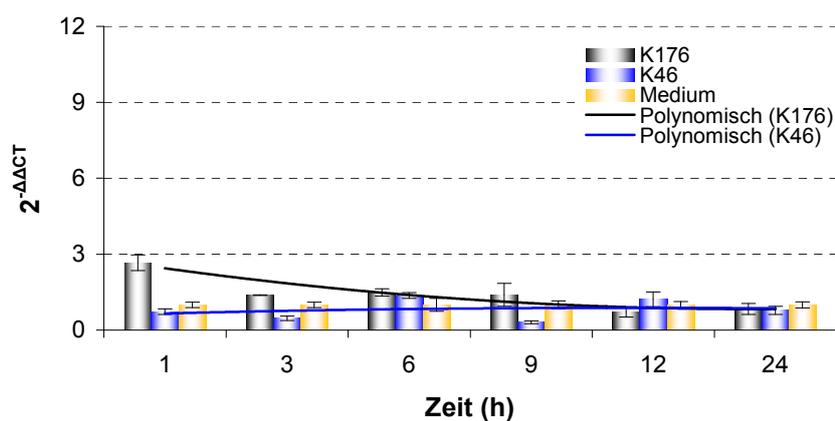
werden (Falenski, 2007). Um den Verlauf der INF-1 $\alpha$  Genexpression innerhalb von 24 Stunden detektieren zu können, wurden real time RT-PCR Analysen durchgeführt.

Untersucht wurde die Expression bei PBMCs von Spender C.S. (Abbildung 3.7 A) und von Spender C.K. (Abbildung 3.7 B). Die Inkubation der PBMCs von Spender C.S. mit 25 $\mu$ g/ml Isu-Homopolymer bewirkt eine achtfache Hochregulierung von INF-1 $\alpha$  nach vier Stunden und eine sechsfache Hochregulierung nach 24 Stunden. Bei den PBMCs von Spender C.K. konnte keine Hochregulierung beobachtet werden. Dabei wurden allerdings andere Polymere verwendet (K176, K172 bzw. K51, K46) und andere Messpunkte gewählt.

### A Spender C.S.



### B Spender C.K.



#### Abbildung 3.7: Analyse der Expression von INF-1 $\alpha$ (24 Stunden Kinetik)

**A)** 24 Stunden Kinetik mit neun Messpunkten, PBMCs vom Blutspender C.S mit 25 $\mu$ g/ml Isu-Homopolymer (K172)/ Ran-Homopolymer (K51) inkubiert. **B)** 24 Stunden Kinetik mit sechs Messpunkten, PBMCs vom Blutspender C.K mit 25 $\mu$ g/ml Isu-Homopolymer (K176)/ Ran-Homopolymer (K51) inkubiert.

In früheren Arbeiten konnte nach fünf Stunden Inkubationszeit eine sechsfache Hochregulierung von IFN-1 $\alpha$  nachgewiesen werden (Falenski, 2007). Bei den PBMCs von Spender C.S. konnte zudem eine Runterregulierung der INF-1 $\alpha$  Genexpression beobachtet werden. Die Messpunkte zwischen 5 und 18 Stunden der Isu-Homopolymer inkubierten Zellen, zeigten eine kontinuierliche Runterregulierung auf 13% von INF-1 $\alpha$  mRNA im Vergleich zu der INF-1 $\alpha$  Expression in den unbehandelten PBMCs. Nach Inkubation mit dem Ran-Homopolymer konnte ebenfalls eine stetige Abnahme der INF-1 $\alpha$  Produktion nach 14 Stunden auf 3% im Vergleich zu den unbehandelten PBMCs gezeigt werden. Eine Hochregulierung des INF-1 $\alpha$  Gens durch Ran-Homopolymer inkubierten Zellen konnte nicht beobachtet werden. Die polymnischen Darstellungsweise verdeutlicht den Unterschied zwischen Isu-Homopolymer und Ran-Homopolymer und die Runterregulierung.

### **3.3.3 Expression von IL-6 nach Inkubation humaner PBMCs mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer**

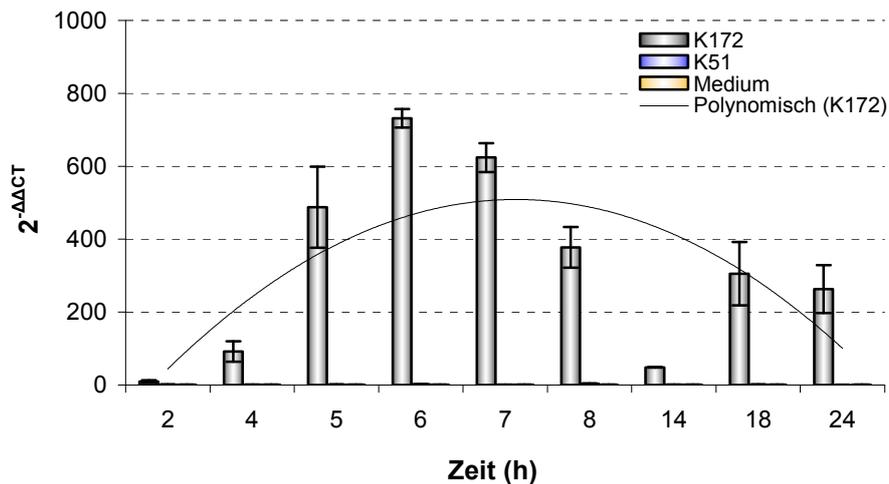
IL-6 wird als proinflammatorisches Cytokin nach der HIV Infektion *in vivo* und *in vitro* gebildet, um die virale Replikation zu unterdrücken. Den Einfluss des HIV-1 Isu-Homopolymers auf die Produktion des IL-6 Transkripts wurde mittels real time RT-PCR untersucht.

Die PBMCs von Spender C.S. wurden mit 25 $\mu$ g/ml Isu-Homopolymer inkubiert und die relative Menge des IL-6 Transkripts im Vergleich zu den unbehandelten PBMCs an neun Messpunkten über 24 Stunden ermittelt (Abbildung 3.8 A). Nach Inkubation der Zellen mit dem Isu-Homopolymer konnte eine 95-fache Hochregulierung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bereits nach vier Stunden beobachtet werden. Nach sechs Stunden erreichte das IL-6 Transkript, mit einer 730-fachen Hochregulierung, das Maximum. Dem folgte eine ebenso schnelle Abnahme der IL-6 Expression auf 14 Stunden, bedingt durch einen vermutlichen Messfehler. Schließlich wurde die Expression des Gens nach 18 und 24 Stunden um das 300-fache hochreguliert. Bei mit dem Ran-Homopolymer inkubierten PBMCs konnte kein signifikanter Anstieg des IL-6 Transkripts im Vergleich zu den unbehandelten PBMCs beobachtet werden.

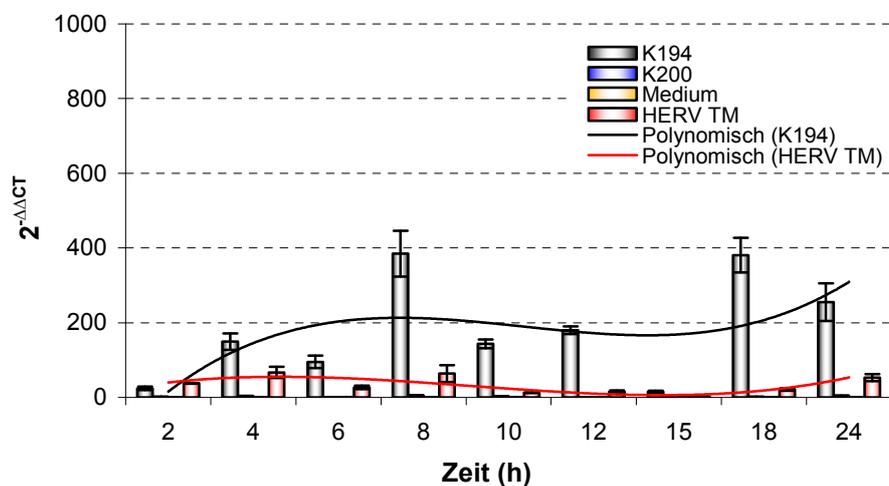
Die Inkubation der PBMCs von Spender M.E. mit 25 $\mu$ g/ml Isu-Homopolymer zeigte ein ähnliches Regulationsmuster wie in der Kinetik mit den PBMCs von Spender C.S. (Abbildung 3.8). Die maximale Hochregulierung von IL-6 betrug nach acht Stunden das 390-fache im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Nach 15 Stunden konnte eine Messfehler bedingte Verminderung gefolgt von einem erneuter Anstieg der IL-6 Expression nach 18 und 24 Stunden beobachtet werden. Die Inkubation der PBMCs mit dem Ran-Homopolymer zeigte in dieser Kinetik ebenfalls keine signifikante Hochregulierung von IL-6. Inkubation der

PBMCs mit 5 $\mu$ g/ml HERV-K TM zeigte zudem eine Hochregulierung von IL-6. Das Gen wurde nach vier und acht Stunden 70-fach hochreguliert im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die Hochregulierung ist zu den unbehandelten PBMCs deutlich höher, jedoch bewirkt die Inkubation mit dem HIV-1 Isu-Peptid eine viel höhere Hochregulierung des IL-6 Gens.

### A Spender C.S.



### B Spender M.E.



#### Abbildung 3.8: Relative Genexpressionsanalysen von IL-6

**A)** 24 Stunden Kinetik mit neun Messpunkten, PBMCs vom Blutspender C.S mit 25 $\mu$ g/ml Isu-Homopolymer (K172)/ Ran-Homopolymer (K51) inkubiert. **B)** 24 Stunden Kinetik mit neun Messpunkten, PBMCs vom Blutspender M.E. mit 25 $\mu$ g/ml Isu-Homopolymer (K194)/ Ran-Homopolymer (K200)/ Transmembranprotein HERV TM inkubiert.

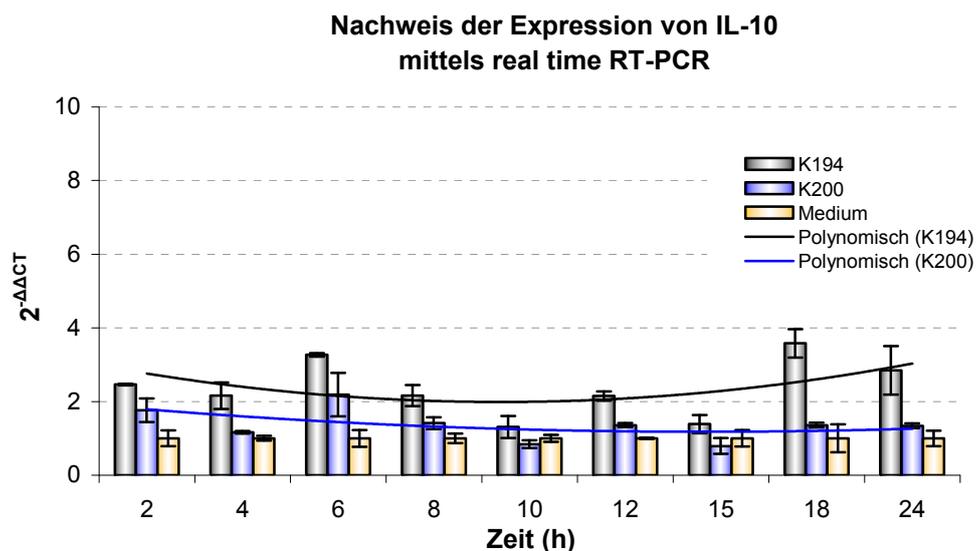
HIV-1 Isu-Homopolymere und HERV-K TM induzierten eine Hochregulierung des IL-6 Cytokins. Das Kontrollhomopolymer HIV-1 Ran und die Mediumkontrolle hingegen zeigten keine signifikante Hochregulierung der IL-6 Expression.

### 3.3.4 Einfluss von HIV-1 Isu-Homopolymer auf die Expression von IL-10 und FoxP3 bei einer Inkubation mit Mäusemilz-Zellen

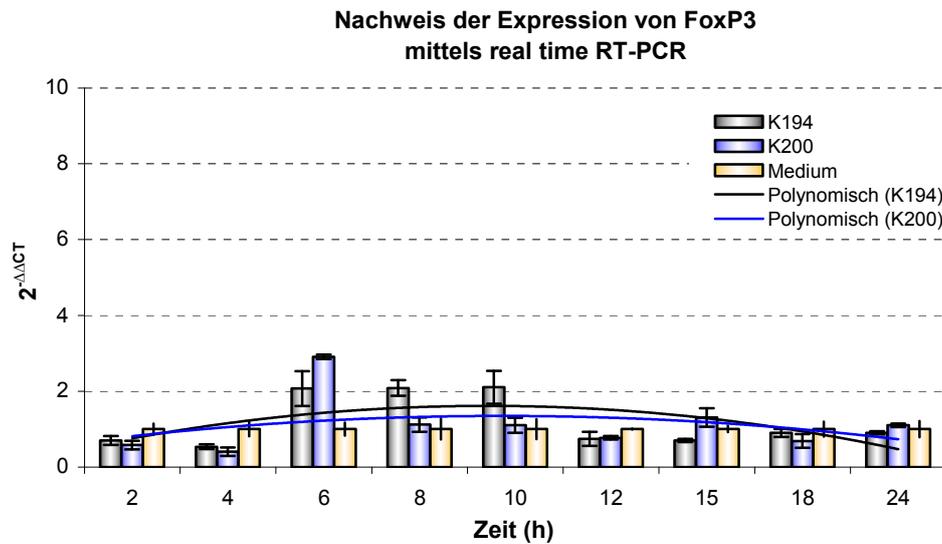
*In vitro* Versuche mit humanen PBMCs ist mit einigen Problemen verbunden. Die Verwendung von Zellen von Inzuchtmäusen könnte dabei Abhilfe schaffen. Zellen von der Maus könnten bei der Untersuchung konstantere Versuchsbedingungen liefern, da bei humanen PBMCs die Reaktion von Spender zu Spender sehr variiert (Lauck, 2008). Da es sich bei dem Isu-Homopolymer um eine hoch konservierte Region handelt, wäre eine ähnliche Reaktion denkbar. Die Milzzellen von unbehandelten C57BL/6 Mäusen wurden mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K194) und Ran-Homopolymer (K200) inkubiert. Dieser Versuch wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie bei der Kinetik mit den PBMCs von Spender M.E. Die Milzzellen wurden mit den gleichen Homopolymeren inkubiert und es wurden die gleichen Messpunkte gewählt, um einen Vergleich der Reaktion zwischen den beiden Organismen zu ermöglichen.

Untersucht wurde die Expression von IL-10 sowie FoxP3, um eine Aktivierung der Tregs zu detektieren (Abbildung 3.9). Bei Inkubation der Milzzellen mit 25µg/ml Isu-Homopolymer konnte eine geringe Hochregulierung beobachtet werden. Nach 18 Stunden ist der IL-10 mRNA Gehalt dreifach erhöht im Vergleich zu den unbehandelten Milzzellen.

#### A



## B



**Abbildung 3.9: Analyse der Expression von IL-10 und FoxP3 mittels real time RT PCR von in einer 24 Stunden Kinetik.**

Die Milzzellen der C57BL/6 Mauslinie wurde mit 25 $\mu$ g/ml Isu-Homopolymer (K194), Ran-Homopolymer (200) und als Mediumkontrolle inkubiert. **A)** IL-10 Expression der Zellen an neun definierten Messpunkten. **B)** FoxP3 Expression der Zellen an neun definierten Messpunkten

Im Gegensatz dazu konnte eine erhöhte IL-10 Genexpression nach der Isu-Homopolymer Inkubation von PBMCs des Spenders M.E. beobachtet werden (Abbildung 3.4 D). Beide Versuche wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, sodass der Vergleich der IL-10 Induktion zwischen den Organismen Mensch und Maus gezogen werden kann. Die IL-10 Hochregulierung der Milzzellen ist verglichen mit der Kinetik der PBMCs von Spender M.E nicht signifikant (Abbildung 3.9 A). Die polynomische Darstellung der Kinetik macht deutlich, dass die mit den Isu-Homopolymeren inkubierten Zellen eine geringfügig höhere Expression zeigten als die mit den Ran-Homopolymeren inkubierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Milzzellen (Abbildung 3.9 A). Die Genexpressions-Analyse für FoxP3 zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den, mit dem Isu-Homopolymer und dem Ran-Homopolymer inkubierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 3.9 B). Nach acht und zehn Stunden konnte zwar eine doppelt so hohe Expression des FoxP3 Gens beobachtet werden, jedoch verglichen mit den anderen Ergebnissen zur FoxP3 Genexpression (Abbildung 3.10) wurde keine signifikante Erhöhung der Expression des Gen detektiert. Die Darstellung der polynomischen Trendlinien macht deutlich, dass kein Unterschied zwischen den Homopolymeren und kein eindeutiges Expressionmuster für FoxP3 zu erkennen ist.

### 3.4 Einfluss von HIV-1 Isu-Homopolymeren auf regulatorische T-Zellen

Kennzeichnend für die HIV-Infektion bzw. FIV-Infektion ist eine chronische Immunaktivierung. Es ist bekannt, dass diese Viren gezielt regulatorische T-Zellen infizieren und wahrscheinlich in der späten Phase der Erkrankung durch Hyperaktivität die Zellen ihre regulatorische Funktion nicht mehr ausüben können (Weiss et al., 2004). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen (Tregs) HIV spezifische Immunantworten *in vitro* unterdrücken können (Kinter et al., 2007).

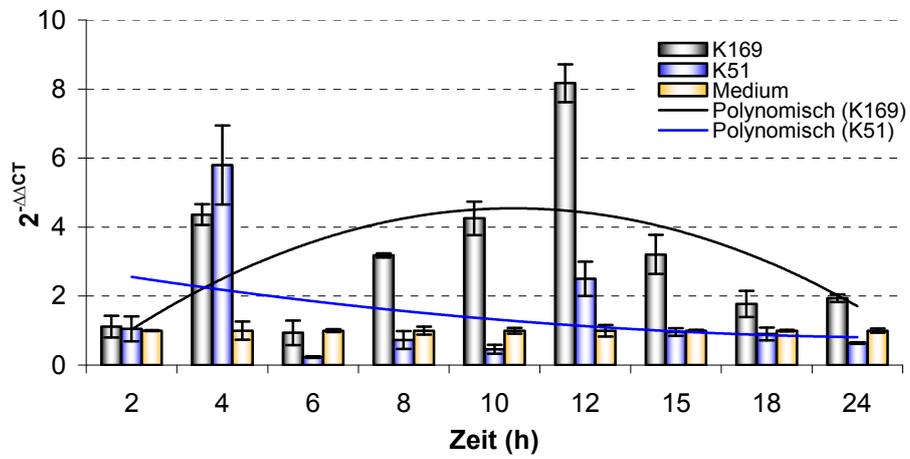
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der PBMCs mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer einen biologischen Effekt hervorruft. Einflüsse dieser auf die regulatorischen T-Zellen konnten mittels real time RT-PCR und Durchflusszytometrie ermittelt werden. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 ist ein spezifischer Marker, um CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs zu detektieren. Es konnte eine Überexpression des FoxP3 Gens mittels real time RT-PCR nachgewiesen werden. Diese Hochregulierung der FoxP3 mRNA lässt sich auf Proteinebene bestätigen und somit die Aktivierung der Tregs nachweisen. Die Aktivierung der regulatorischen T-Zellen kann durch eine Zunahme der CD25<sup>+</sup> Membranproteine und der Zunahme des Transkriptionsfaktors FoxP3 gezeigt werden.

#### 3.4.1 Aktivierung der relativen Genexpression von FoxP3 nach Inkubation mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer

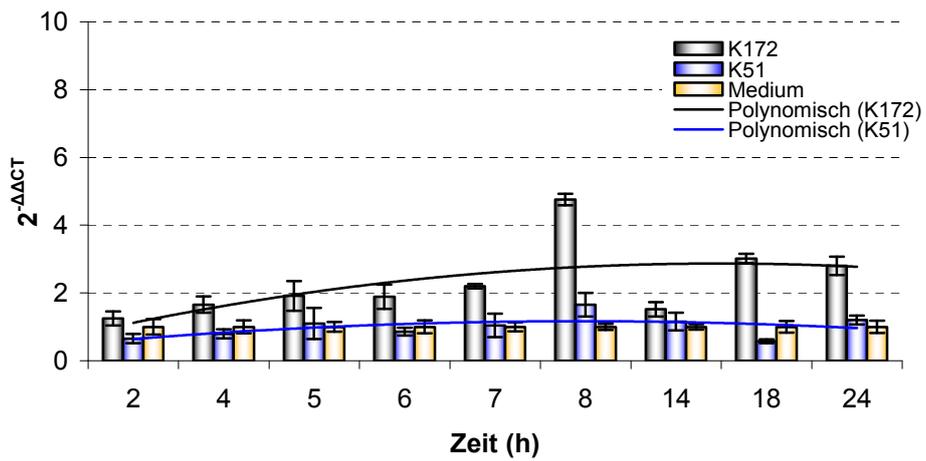
Die Zunahme der Menge des FoxP3 Transkripts ist ein wichtiger Indikator für die Aktivierung regulatorischer T-Zellen. In vorhergehenden Diplomarbeiten (Behrendt, 2005; Dao Thi, 2006; Falenski, 2007)) beschränkten sich die Expressionsuntersuchungen vorwiegend auf eine Inkubationszeit von 24 Stunden. In dieser Arbeit wurden 24 Stunden Kinetiken mit sechs bis neun definierten Messpunkten durchgeführt, um die Veränderung der FoxP3 mRNA Expression zu detektieren.

### FoxP3 real time RT PCR

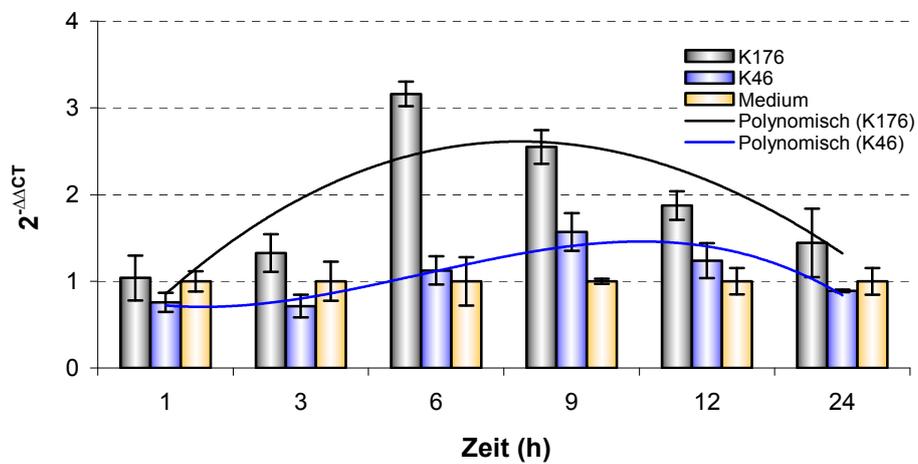
#### A Spender S.S.



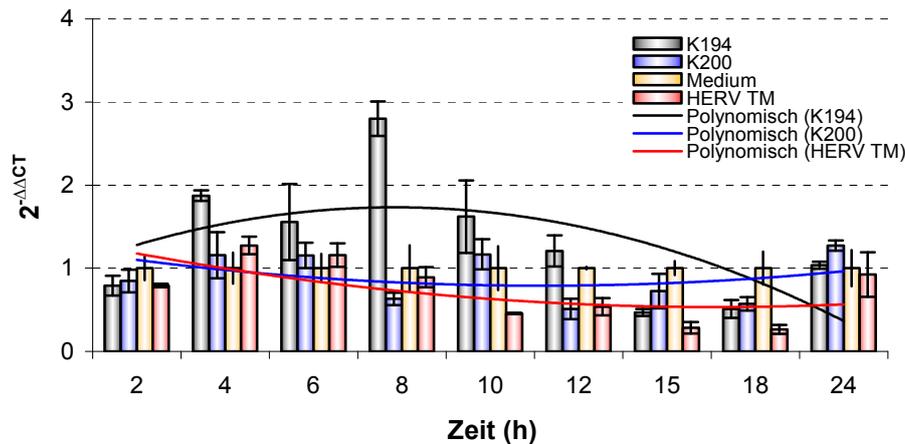
#### B Spender C.S.



#### C Spender C.K.



## D Spender M.E.



**Abbildung 3.10: Analyse der Expression von FoxP3 (24 Stunden Kinetik)**

Die PBMCs wurden 24 Stunden mit Isu-Homopolymer, Ran-Homopolymer und Medium inkubiert. **A)** Die PBMCs des Blutspenders S.S wurden mit 12,5µg/ml Isu-Homopolymer (K169) und 12,5µg/ml Ran-Homopolymer (K51) für neun Messpunkte inkubiert. **B)** 24 Stunden Kinetik, PBMCs vom Blutspender C.S mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K172)/ Ran-Homopolymer (K51) für neun Messpunkte inkubiert. **C)** 24 Stunden Kinetik für sechs Messpunkte inkubiert, PBMCs vom Blutspender C.K mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K176)/ Ran-Homopolymer (K51) inkubiert. **D)** 24 Stunden Kinetik für neun Messpunkte, PBMCs vom Blutspender M.E. mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K194)/ Ran-Homopolymer (K200)/ Transmembranprotein HERV-K TM inkubiert.

Alle Untersuchungen wurden mit PBMCs von verschiedenen Blutspendern durchgeführt und die isolierten PBMCs wurden mit 12,5µg/ml (Abb. 3.10 A) bzw. 25µg/ml (Abb. 3.10 B-D) Peptid inkubiert. Die Standardabweichungen ergeben sich aus den Mittelwerten der untersuchten Tripikate. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurden mathematisch berechnete polynomische Trendlinien ( $y = b + c_1x + c_2x^2 + c_3x^3 \dots c_6x^6$ ) herangezogen, um Trends grafischer Daten darzustellen. In den ersten Messpunkten der Kinetik A-D sind keine signifikanten Unterschiede in der Expression von FoxP3 bei den mit dem Isu-Homopolymer und Ran-Homopolymer inkubierten Zellen im Vergleich zur Expression bei unbehandelten Zellen beobachtet worden.

Vier Stunden nach Beginn der Inkubation der PBMCs von Spender S.S. mit dem Isu-Homopolymer (K169) und Ran-Homopolymer (K51) konnte ein plötzlicher Anstieg der FoxP3 Genexpression beobachtet werden (Abbildung 3.10 A). Dem Anstieg folgt eine ebenso schnelle Abnahme der Expression. Die mit dem Isu-Homopolymer inkubierten PBMCs zeigten ein deutliches Expressionsmuster mit stetiger Zunahme, einem Maximum nach 12 Stunden und einer weiteren Abnahme der Expression. Nach 12 Stunden wurde das FoxP3 achtfach höher exprimiert als bei der unbehandelten Mediumkontrolle. Die polynomische Trendlinie macht innerhalb der 24 Stunden die Unterschiede zwischen den Homopolymeren und den Mediumkontrollen deutlich.

Bei Spender C.S. konnte ebenfalls ein Unterschied in der FoxP3 Expression bei den mit dem Isu-Homopolymer (K172) und Ran-Homopolymer (K51) inkubierten Zellen beobachtet

werden (Abbildung 3.10 B). In dieser Kinetik wurden andere Messpunkte verwendet. Die Inkubation mit dem Ran-Homopolymer und Mediumkontrolle führte kaum zu einer Hochregulierung, dagegen war das Isu-Homopolymer vierfach hochreguliert im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Die Inkubation der PBMCs von Spender M.E. mit dem Isu-Homopolymer (K176) zeigten eine 3,2-fache Hochregulierung der FoxP3 Expression (Abbildung 3.10 B). Inkubation der PBMCs mit Ran-Homopolymer zeigte keine signifikante FoxP3 Hochregulierung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

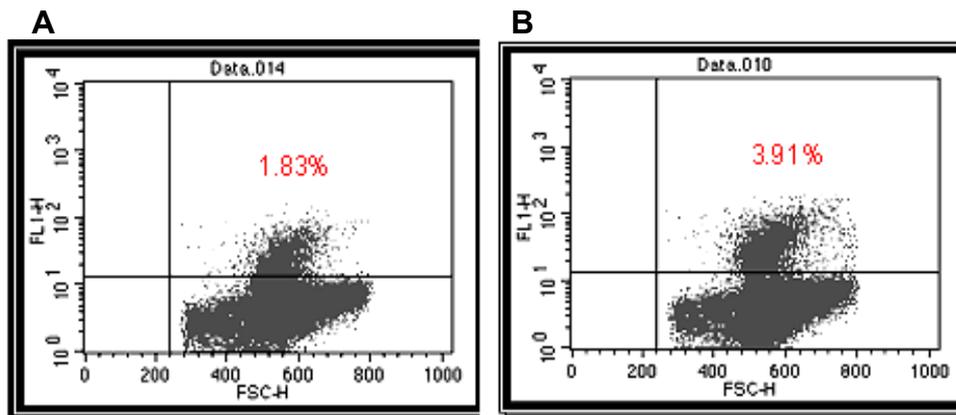
Die Inkubation der PBMCs des Spenders M.E. mit dem Isu-Homopolymer (K194) zeigte ein dreifache Hochregulierung von FoxP3 im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Außerdem wurden die PBMCs in dieser Kinetik mit 5µg/ml HERV-K TM inkubiert. Die mit HERV-K TM inkubierten Zellen zeigten genau wie die mit Ran-Homopolymer inkubierten Zellen keine signifikante Hochregulierung von FoxP3 im Vergleich zu unbehandelten PBMCs (Abbildung 3.10 D)

Es konnte somit gezeigt werden, dass das HIV-1 Isu-Homopolymer eine Hochregulierung des FoxP3 Gens induzierte. Das randomisierte Kontrollhomopolymer zeigte keine signifikante Induktion der FoxP3 Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. HERV-K TM inkubierte Zellen zeigten ebenfalls keine Hochregulierung der FoxP3 Expression.

### **3.4.2 Nachweis von Aktivierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg nach der Inkubation mit HIV-1 Isu-Homopolymeren mittels Durchflusszytometrie**

Die Existenz der regulatorischen T-Zellen war mangels zuverlässigen Oberflächenmarkers lange fraglich und schwer zu detektieren. Sakaguchi et al. konnten dann CD25, die alpha Kette des Interleukin 2 Rezeptors, als einen Oberflächenmarker von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit regulatorischem Potential beschreiben (Sakaguchi et al., 1995). Außerdem wurde anhand von Genexpressionsanalysen Foxp3 als Schlüssel Transkriptionsfaktor von CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Treg identifiziert (Hori et al., 2003).

Eine Hochregulierung der FoxP3 Genexpression konnte in dieser Arbeit mittels real time RT PCR beobachtet werden. Die FoxP3 Expression konnte außerdem durchflusszytometrisch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Eine exemplarische Punktwolken Darstellung zeigt auf der x-Achse die Oberflächenstruktur der PBMCs (FSC-H) und auf der y-Achse (FL-1H) die Wellenlänge des emittierten Lichts von FITC-FoxP3 (Abbildung 3.11). Bei Inkubation der PBMCs mit dem Ran-Homopolymer konnte ein FoxP3 Anteil von 1,83% der gemessenen Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.11 A). Der Anteil der FoxP3 markierten Zellen nach der Inkubation mit dem Isu-Homopolymer betrug 3,91% (Abbildung 3.11 B).

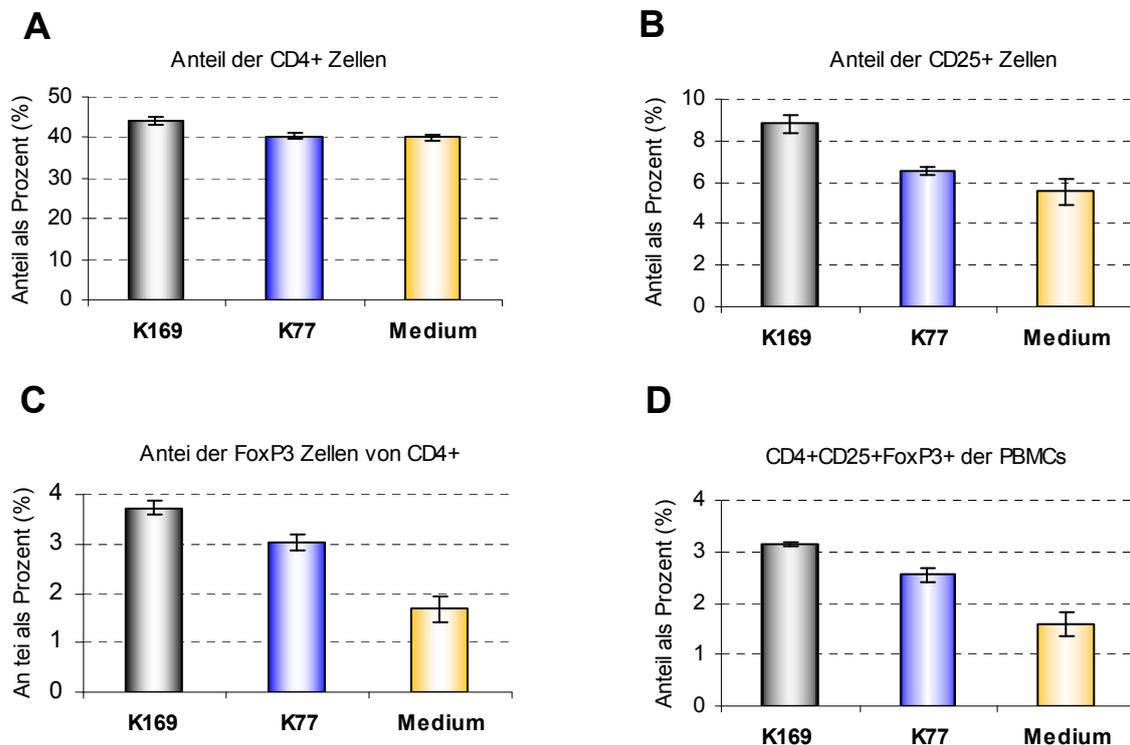


**Abbildung 3.11: Exemplarische Punktwolken-Darstellung („Dot Plot“) der Durchflusszytometrie Analyse** nach der Inkubation mit Isu-Homopolymeren und Ran-Homopolymeren. **A)** Prozentualer Anteil von 1,83% der FoxP3 markierten Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 25µg/ml Ran-Homopolymer. **B)** Prozentualer Anteil von 3,91% der FoxP3 markierten Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 25µg/ml Isu-Homopolymer.

Die PBMCs wurden aus den Blutproben isoliert (siehe 2.2.4.3). Nach Isolation wurden die Einzelzellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD4, CD25 und FoxP3 inkubiert (siehe 2.2.3.1). Diese durchflusszytometrische Mehrfarbenanalysen ermöglichten die gleichzeitige Messung der CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> Markerproteine. Dadurch konnte die quantitative Veränderung der Zahl der Tregs nach der Inkubation mit dem Isu-Homopolymer detektiert werden. Vergleichbar zu den exemplarischen Punktwolken Darstellung (Abbildung 3.11) wurden auch die Wellenlängen des emittierten Lichts von APC-CD4<sup>+</sup> und PE-CD25<sup>+</sup> gemessen.

Die PBMCs von Spender S.S wurden 24 Stunden mit 12,5µg/ml Isu-Peptid (K169) und Ran-Homopolymer (K77) in PBMC Nährmedium inkubiert. Der prozentuale CD4<sup>+</sup> Anteil an der gesamten PBMC-Population war bei den mit dem Isu-Homopolymer inkubierten Zellen geringfügig höher als bei den mit dem randomisierten Peptid inkubierten und bei der Medium Kontrolle (Abbildung 3.12 A). Der Anteil der CD25<sup>+</sup> Zellen war bei den mit dem Isu-Homopolymer inkubierten Zellen mit 8,3% signifikant höher als bei den mit Ran-Homopolymer inkubierten Zellen mit 6,2% und der Mediumkontrolle mit 5,8% (Abbildung 3.12 B). Der FoxP3 Anteil an der gesamten CD4<sup>+</sup> Zell-Population lag bei 3,8% bei den Zellen, die mit dem Isu-Homopolymer inkubiert wurden. Der FoxP3 Anteil an der gesamten CD4<sup>+</sup> Population dagegen lag bei Ran-Homopolymer inkubierten Zellen bei 3% und bei der Mediumkontrolle bei 1,8% (Abbildung 3.12 C). Die eingestellten Parameter ermöglichten den Nachweis einer FoxP3 exprimierenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Population. Diese Parameter waren entscheidend für die durchflusszytometrische Messung der Tregs (Abbildung 3.12 D). Der Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> exprimierenden Zellen lag bei den mit dem Isu-Homopolymer inkubierten Zellen mit 3,1% am höchsten. Die Ran-Homopolymer inkubierten Zellen zeigten

einen Anteil von 2,5% und die Mediumkontrolle einen Anteil von 1,6% der Treg Population. Die Standardabweichung wurde vom Mittelwert der gemessenen Triplikate ermittelt.

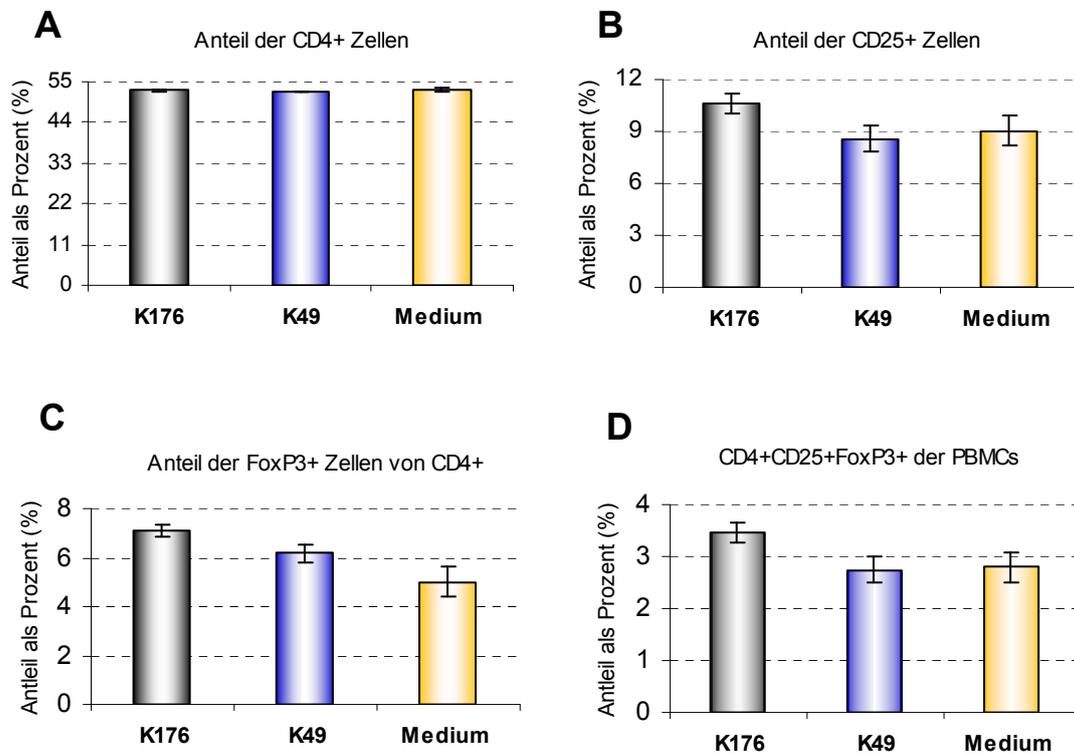


**Abbildung 3.12: Durchflusszytometrische Untersuchung der Tregs**

Die PBMCs des Spenders S.S wurden nach einer 24 Stunden Inkubationszeit mit 12,5µg/ml Isu-Homopolymer (K169) und Ran-Homopolymer (K77) mit den drei Fluorchrom gekoppelten Antikörper inkubiert **A**) Prozentualer Anteil der CD4+ markierten Zellen **B**) Prozentualer Anteil der CD25+ markierten Zellen **C**) Prozentualer Anteil der FoxP3 markierten Zellen in der CD4+ Population **D**) Prozentualer Anteil der FoxP3 markierten Zellen in der CD4+/CD25+ Population

In der nächsten Messung wurden die PBMCs von Spender C.K. nach 24 Stunden mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K176) und Ran-Homopolymer (K49) inkubiert (Abbildung 3.13). Diese durchflusszytometrische Analyse bestätigte eine Treg aktivierende Eigenschaft des Isu-Homopolymers. Der prozentuale CD4+ Anteil an der gesamten PBMC-Population war bei den Isu-Homopolymer inkubierten Zellen auf selber Höhe wie bei der mit dem randomisierten Peptid inkubierten Kontrolle und der Medium Kontrolle (Abbildung 3.13 A). Der Anteil der CD25+ Zellen war bei der mit dem Isu-Homopolymer inkubierten Zellen mit 10,6% signifikant höher als bei den mit dem Ran-Peptid inkubierten Zellen mit 8,8% und bei der Mediumkontrolle mit 9% (Abbildung 3.13 B). Das Expressionsmuster von CD25+ war der vorhergehenden Messung (Abbildung 3.12) sehr ähnlich. Der Anteil FoxP3 positiver Zellen an der gesamten CD4+ Zell-Population lag bei den mit Isu-Peptid inkubierten Zellen bei 7,2%. Der Anteil FoxP3 positiver Zellen an der gesamten CD4+ Population lag dagegen bei Ran-Homopolymer inkubierten Zellen bei 6,1% und in der Mediumkontrolle bei 5% (Abbildung 3.13 C).

Der Anteil  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  markierter Zellen der gesamten PBMCs-Population lag bei den Isu-Homopolymer inkubierten Zellen mit 3,5% am höchsten (Abbildung 3.13 D). Die Ran-Homopolymer inkubierten Zellen zeigten einen Anteil von 2,7% und die Mediumkontrolle einen Anteil von 2,8% der Treg-Population.



### Abbildung 3.13: Durchflusszytomertische Untersuchung der Tregs

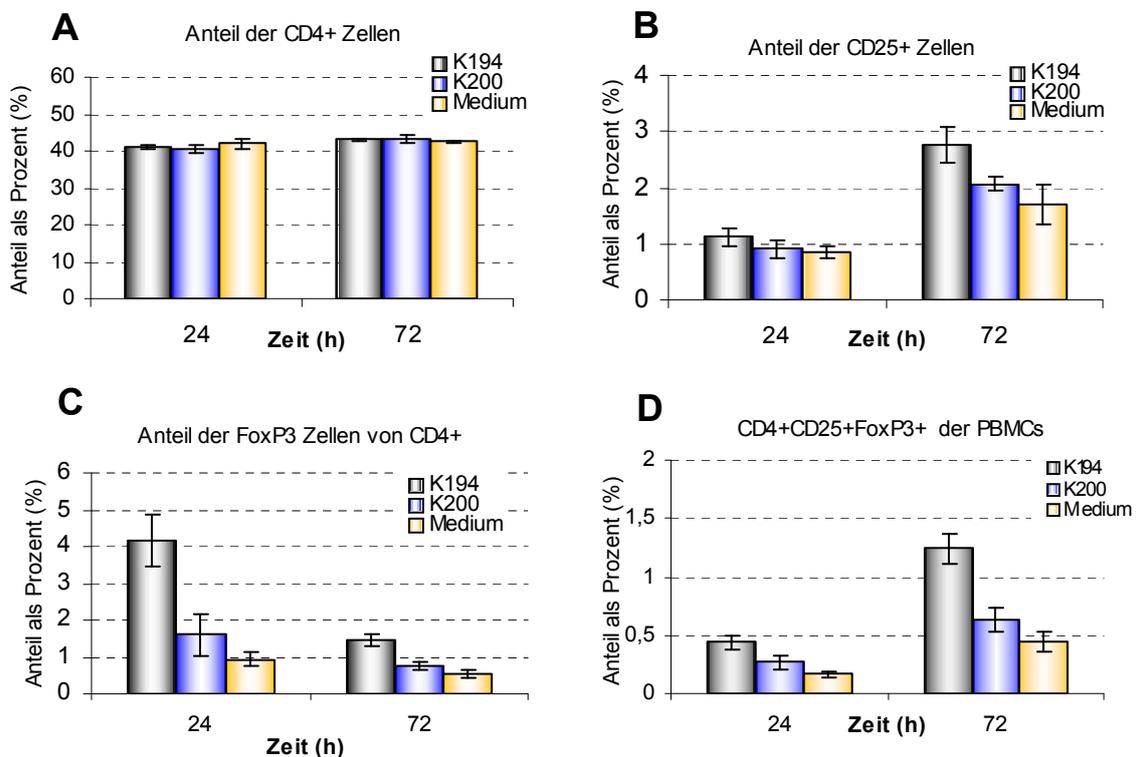
Die PBMCs des Spenders C.K. wurden nach einer 24 Stunden Inkubationszeit mit 12.5µg/ml Isu-Homopolymer (K176) und Ran-Homopolymer (K49) mit den drei mit Fluorchrom gekoppelten Antikörper inkubiert **A**) Prozentualer Anteil der  $CD4^+$  markierten Zellen **B**) Prozentualer Anteil der  $CD25^+$  markierten Zellen **C**) Prozentualer Anteil der  $FoxP3^+$  exprimierenden Zellen in der  $CD4^+$  Population **D**) Prozentualer Anteil der  $FoxP3^+$  markierten Zellen in der  $CD4^+/CD25^+$  Population. Gemessen am FLI.

Im Anschluss wurde der Versuch mit den PBMCs von einem anderen Spender wiederholt, diesmal wurden zwei Zeitpunkte gewählt, um den langfristigen Einfluss der Isu-Homopolymere auf die regulatorischen T-Zellen zu detektieren. Die PBMCs von Spender S.B. wurden 24 und 72 Stunden mit 25µg/ml Isu-Peptid (K194) und Ran-Peptid (K200) im PBMC Nährmedium inkubiert (Abbildung 3.14). Der prozentuale Anteil von  $CD4^+$  Zellen an der gesamten PBMC-Population war sowohl nach 24 Stunden als auch nach 72 Stunden bei den mit dem Isu-Homopolymer inkubierten Zellen auf der selben Höhe wie bei der mit dem randomisierten Peptid inkubierten und bei der Mediumkontrolle (Abbildung 3.14 A). Drei Tage nach Beginn des Versuchs fiel der Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen deutlicher aus, der Anteil der  $CD25^+$  Zellen war bei Isu-Homopolymer inkubierten Zellen nach 72 Stunden signifikant höher als nach 24 Stunden. Bei den mit Ran-Homopolymer

inkubierten Zellen und der Mediumkontrolle konnte ebenfalls nach 72 Stunden eine Zunahme der Expression von Tregs beobachtet werden (Abbildung 3.14 B). In dieser Messung wurden nur wenige CD25<sup>+</sup> Zellen beobachtet.

Der Anteil der FoxP3 positiven Zellen an der gesamten CD4<sup>+</sup> Zell-Population lag nach 24 Stunden bei den mit Isu-Homopolymer inkubierten Zellen bei 4%. Der Anteil der FoxP3 positiven Zellen an der gesamten CD4<sup>+</sup> Population dagegen lag bei Ran-Homopolymer inkubierten Zellen bei 1,5% und in der Mediumkontrolle bei 1% (Abbildung 3.14 C). Der Anteil CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> markierter Zellen der gesamten PBMCs-Population lag bei den Isu-Homopolymer inkubierten Zellen mit 0,5% am höchsten (Abbildung 3.14 D). Die Ran-Homopolymer inkubierten Zellen zeigten einen Anteil von 0,25% und die Mediumkontrolle einen Anteil von 0,25% der Treg-Population.

Nach 72 Stunden konnte eine Zunahme der Expression von CD25<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> bei den Treg Zellen beobachtet werden. Die signifikante Zunahme der Tregs lag bei den mit dem Isu-Homopolymer inkubierten Zellen mit 1,25% am höchsten (Abbildung 3.14 D). Die Ran-Homopolymer inkubierten Zellen zeigten einen Anteil der Tregs von 0,6% und bei der Mediumkontrolle einen Anteil der Tregs von 0,5% der Treg-Population.



**Abbildung 3.14: Durchflusszytometrische Untersuchung der Tregs**

Die PBMCs des Spenders S.B. wurden nach einer 24 und 72 Stunden Inkubationszeit mit 25µg/ml Isu-Homopolymer (K194) und Ran-Homopolymer (K200) mit den drei mit Fluorchrom gekoppelten Antikörper inkubiert **A)** Prozentualer Anteil der CD4<sup>+</sup> markierten Zellen **B)** Prozentualer Anteil der CD25<sup>+</sup> markierten Zellen **C)** Prozentualer Anteil der FoxP3 exprimierenden Zellen in der CD4<sup>+</sup> Population **D)** Prozentualer Anteil der FoxP3 markierten Zellen in der CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Population. Gemessen am Fraunhofer Institut, Stuttgart.

Die durchflusszytometrische Messung konnte die Aktivierung der regulatorischen T-Zellen durch das HIV-1 Isu Homopolymer zeigen. Eine Aktivierung von FoxP3 wurde sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Protein Ebene nachgewiesen. Außerdem konnte die Hochregulierung der CD25<sup>+</sup> Membranproteine nachgewiesen werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Sind die HIV-1 Isu- Homopolymere ein gutes Modell, für die native Isu-Domäne des HI-Virus?

In dieser Arbeit wurden die immunsuppressiven Eigenschaften der immunsuppressiven Domäne des transmembranen Hüllproteins gp41 untersucht. Dabei wurden die Veränderungen der Cytokinexpression mittels real time RT-PCR überprüft. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass das Isu-Peptid konjugiert vorliegen muss, um biologisch aktiv zu sein (Denner et al., 1994, Cianciolo et al., 1985). Das Monomer aber auch Dimere und Trimere zeigten keine immunsuppressive Wirkung (Behrendt, 2005). Erst nach Kopplung an größere Trägermoleküle, wie BSA konnte *in vitro* eine immunsuppressive Wirkung gemessen werden. Mögliche Effekte des Trägermoleküls BSA konnten durch die Kopplung der Isu-Peptide untereinander zu Homopolymeren (mittels EDC) ebenfalls umgangen werden (Behrendt 2005) (siehe 2.2.2.1). Das Isu-Homopolymer stellt somit ein Modell für Untersuchungen der Einflüsse der Isu-Domäne von gp41 von HIV-1 auf das Immunsystem dar. Die Polymerisierung wurde mittels EDC/NHS Kopplungen durchgeführt. Die erfolgreiche Kopplung der hergestellten Homopolymere konnte mittels SDS Page und Western-Blot nachgewiesen werden (Abbildung 3.1). Das SDS Page zeigt, dass viele Monomere bleiben und überwiegend Di- und Trimere entstanden sind. Diese Methode ist jedoch nicht sensitiv genug, um geringe Mengen an Protein, wie die hochmolekularen Strukturen, zu erfassen. Diese hochmolekularen Strukturen des Isu-Homopolymers konnten erst mittels spezifischer Detektion im Western-Blot dargestellt werden (Abbildung 3.1 B). Allerdings bleibt unklar, in wie weit die entstandene Konformation der nativen Konformation der Isu-Domäne im gp41 entspricht (Abbildung 1.5).

Aufgrund der sterischen und energetischen Eigenschaften des Isu-Peptids ist es auch denkbar, dass eine Polymerisationsstufe vermehrt entsteht. Eine mögliche Konformation ist die Loop-Struktur, die durch ihre Faltstruktur eine polare Eigenschaft besitzt, die Membranproteine binden und eine unspezifische Reaktion, resultierend in der Aktivierung zahlreicher Signaltransduktionswege, hervorrufen kann. Monell beschrieb die Wirksamkeit der Defensine mit gefalteten Loop-Strukturen, die durch bipolare Domänen mit der Proteinkinase C (PKC) in der Zellmembran interagieren können (Mondel et al., 1994). Diese und andere Konformationen des Isu-Homopolymers haben schließlich einen biologischen Effekt. Die *in vivo* Beobachtung bei HIV-1 infizierten Personen zeigte eine erhöhte IL-10 und IL-6 Cytokinsekretion (Navikas et al., 1996). Brenchley beobachtete, dass chronisch infizierte HIV-Patienten und Patienten mit AIDS signifikant höhere Plasma-LPS Spiegel aufweisen als

nicht infizierte Patienten. Dieses LPS kommt von kommensalen und pathogenen Bakterien des Darms, die aufgrund der Immunsuppression eindringen können und von subklinischen opportunistischen Infektionen (Brenchley 2006). Dieser LPS Spiegel wirkt ebenfalls cytokinmodulierend. Transmembrane Hüllproteine, wie p15E (Ruegg et al., 1989) und gp41, zeigten *in vitro*, verglichen mit dem Isu-Peptid, einen ähnlichen immunsuppressiven Effekt. So konnte beobachtet werden, dass das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1 eine direkte immunsuppressive Wirkung auf humane PBMCs hat und in der Lage ist, die IL-10 Sekretion hochzuregulieren (Koutsonikolis et al. 1997; Speth et al., 2000). Das Isu-Peptid bewirkte ebenfalls eine Erhöhung der IL-10 Sekretion bei humanen PBMCs (Denner 1998).

## 4.2 IL-10 Cytokinmodulation durch HIV-1 Isu-Homopolymere

In vorhergehenden Arbeiten zeigten sich nach einer Inkubationszeit über 24 Stunden von humanen PBMCs mit Isu-Peptiden erste Anhaltspunkte der Cytokinmodulation (Behrendt, 2005; Dao Thi, 2006; Falenski, 2007). In dieser Arbeit wurden erstmals Kinetiken durchgeführt, um die Entwicklung der Expression zu analysieren. Es konnte beobachtet werden, dass die untersuchten Cytokine hochreguliert wurden und nach 24 Stunden Inkubationszeit ihr Ausgangsniveau wieder erreichten.

Es wurden vier Kinetiken über einen Zeitraum von 24h durchgeführt, um die IL-10 Sekretion humaner PBMCs genauer zu untersuchen, welche durch das Isu-Peptid Homopolymer induziert worden ist. Dabei konnte die Zunahme der IL-10 Genexpression und der IL-10 Sekretion bei HIV-1 Isu-Homopolymer und HERV-K TM inkubierten PBMCs beobachtet werden (Abbildung 3.4). HERV-K TM wurde in dieser Arbeitsgruppe aus Hefen exprimiert, die keine Endotoxine enthalten. Die Induktion der IL-10 Genexpression ließ sich in einem Zeitfenster zwischen 6 und 10 Stunden nachweisen (Abbildung 3.4 A-D). Im Zellkulturüberstand konnte eine signifikante Zunahme des IL-10 Proteins, bereits 8 Stunden (Abbildung 3.5 C und D) bzw. 18 Stunden (Abbildung 3.5 A und B) nach der Inkubation der PBMCs mit dem Isu-Homopolymer, detektiert werden. Eine vergleichbare Beobachtung konnten Chehimi et al. nach einer *in vitro* HIV-Infektion von Monozyten und Makrophagen (Chehimi et al., 1996) publizieren. Außerdem zeigten Akridge et al. 3-12 Stunden nach der Infektion von Makrophagen eine IL-10 mRNA Expression, mit dem Nachweis von biologisch aktivem IL-10 in Zellkulturüberständen 12 Stunden nach der Infektion (Akridge et al., 1994). Diese Beobachtungen konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Die Inkubation der PBMCs von Spender S.S. und Spender C.S. mit dem Isu-Homopolymer zeigten nach 8 Stunden eine 4,5-fache Hochregulierung (Abbildung 3.4 A und B) mit dem Nachweis des IL-10 Proteins nach 24 Stunden auf 120-180 pg/ml (Abbildung 3.5 A und B). Die Inkubation der PBMCs von Spender C.K. mit dem Isu-Homopolymer zeigten nach 6 Stunden eine 10-fache

Hochregulierung (Abbildung 3.4 C) und mit dem Nachweis des IL-10 Proteins nach 24 Stunden auf 300pg/ml (Abbildung 3.5 C). Schließlich zeigte die Inkubation der PBMCs von Spender M.E. mit dem Isu-Homopolymer nach 10 Stunden eine 22-fache Hochregulierung (Abbildung 3.4 D) mit dem Nachweis des IL-10 Proteins nach 620 Stunden auf 620 pg/ml (Abbildung 3.5 D). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Höhe der gemessenen IL-10 Proteinkonzentrationen mit der Höhe der Genexpression korreliert. Die Zeit zwischen der detektierten Hochregulierung der mRNA und der Zunahme der IL-10 Proteinkonzentration ist die Translationszeit. Es ist auch davon auszugehen, dass die definierten Zeitpunkte nicht immer die maximale Genexpression von IL-10 erfassen konnten. Außerdem wurden die im ELISA getesteten Zellkulturüberstände bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und anschließend für die Messung wieder aufgetaut. Alle vier Kinetiken wurden mit unterschiedlichen HIV-1 Isu-Homopolymeren durchgeführt, weil nicht ausreichende Mengen der gekoppelten Peptide hergestellt werden konnte. Diese unterschiedlichen Konformationen könnten einen Effekt auf den Verlauf der IL-10 Sekretion haben. Deshalb wurde in der Kinetik von Spender M.E. die PBMCs neben dem Isu-Homopolymer und den Kontrollen, zusätzlich mit HERV-K TM inkubiert. Die *in vitro* Initiation der IL-10 Genexpression und das Sekretionsmuster der biologisch aktiven IL-10 Proteine in Zellkulturüberständen, hervorgerufen durch HIV-1 Isu-Homopolymer und HERV-K TM sind ähnlich und deuten auf eine Isu-Homopolymer Konformation hin, die der nativen Konformation nahe kommt. Koutsonikolis et al. konnten eine maximale Konzentration von IL-10 mRNA bereits 4 h nach der Inkubation von PBMCs mit rekombinantem gp41, zeigen (Koutsonikolis et al. 1997). Diese Ergebnisse von Koutsonikolis korrelieren mit der durch HIV-1 Isu-Homopolymer und HERV-K TM Induzierten IL-10 Genexpression dieser Arbeit (Abbildung 3.4 D).

HI-Viren infizieren wichtige Zellen des Immunsystems, einschließlich  $\text{CD4}^+$  T-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen und Gewebe-Makrophagen. Durch die HIV-Replikation wird eine immunsuppressive Wirtsreaktion hervorgerufen und ist die wichtigste Eigenschaft des HI-Virus, um das Immunsystem zu supprimieren. Die Cytokinmodulation trägt zur Immundefizienz in der HIV-Infektion bei, noch bevor die fortschreitende Krankheit die  $\text{CD4}^+$  Population verringert. IL-10 ist ein immunsuppressives Cytokin. Während einer Infektion hemmt es die Aktivität von TH1-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen und alle erforderlichen Zellen zur optimalen Bekämpfung der Erreger. Diese Hemmung kann demnach dazu beisteuern, sogar Gewebe zu schädigen (Kevin et al., 2008). Eine Reihe von Studien zeigte eine konstitutive Expression von IL-10 bei HIV infizierten Patienten (Graziosi et al., 1994; Than et al. 1997). FIV infizierte Katzen zeigten ebenfalls eine erhöhte IL-10 Produktion, im Vergleich zu nicht infizierten Katzen (Dean und Pedersen, 1998; Levy et al., 1998). Dieser Anstieg in der IL-10 Genexpression konnte auch beobachtet werden, wenn PBMCs mit dem Hüllglykoprotein von HIV-1, gp160 (Ji, et al., 2005) bzw. dem HIV-1 Isu-Peptid (Denner et al.

1998) inkubiert wurden. Diese Werte können abhängig vom Immunstatus des Spender und der Charge des Isu-Homopolymers abweichen (Lauck, 2008). Die PBMCs wurden zwar von gesunden Spendern isoliert, jedoch kann ein bereits vorhandener Infekt zum Zeitpunkt der Blutabnahme nicht ausgeschlossen werden. Die IL-10 Induktion ist abhängig von der Isu-Homopolymer Konzentration (Abbildung 3.4 A-D).

Dean et al. konnten bei FIV infizierten Katzen *in vivo* eine konstitutive Erhöhung des IL-10 Proteins nachweisen (Dean et al., 2006), ähnlich wie bei HIV infizierten Patienten (Navikas et al., 1995).

IL-10 ist ein multifunktionales Cytokin mit verschiedenen biologischen Eigenschaften. Eine wichtige Wirkung von IL-10 ist die Hemmung der Expression von MHC II-Molekülen und der kostimulatorischen Faktoren CD86 und CD80 von Monozyten und Makrophagen (De Waal et al., 1991b). Weiterhin wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, und TNF- $\alpha$ , durch IL-10 inhibiert (De Waal et al., 1991a). Durch die inhibitorischen Effekte von IL-10 auf APCs, hemmt IL-10 indirekt die T-Zell-Aktivierung und die proinflammatorische Cytokinproduktion (Ding L et al., 1993). Des Weiteren gibt es noch direkte Effekte von IL-10 auf T-Zellen. Hierzu gehören die Hemmung der Transkription des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 und der CD28-Signaltransduktion (Joss et al., 2000). Außerdem führt die Anwesenheit von IL-10 während der T-Zell-Aktivierung zur Entstehung von regulatorischen T-Zellen. Diese Zellen sind in der Lage, andere T-Zellen über Zell-Zell-Kontakt oder lösliche Mediatoren zu hemmen (Read S, 2001).

Wie bereits beschrieben, unterliegt die *in vitro* Immunantwort nach der Isu-Homopolymer Inkubation spenderabhängigen Schwankungen. Um diese zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Einflüsse des HIV-1 Isu-Homopolymers auf die Milzzellen von C57BL/6 Mäusen untersucht. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Mauszellen, HIV-Proteine wie gp120 und gp41, binden können (Fraziano et al., 1996) und dass konjugiertes Isu-Peptid die Proliferation muriner Zellen hemmt (Denner et al., 1996). Daher wurde der Einfluss des Isu-Homopolymers auf die Milzzellen von C57BL/6 Mäusen untersucht. Der Vorteil einer Mauslinie als Versuchsobjekt besteht darin, dass genetisch unveränderte Inzuchtlinien konstantere Bedingungen schaffen können. Eine signifikante IL-10 Genexpression, nach der Isu-Homopolymer Inkubation, konnte bei den Milzzellen der Maus nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.9. A). Im Gegensatz dazu konnte eine erhöhte IL-10 Genexpression nach der Isu-Homopolymer Inkubation von Spender M.E. beobachtet werden (Abbildung 3.4 D). Beide Versuche wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, sodass der Vergleich der IL-10 Induktion zwischen den Organismen Mensch und Maus gezogen werden kann. Die deutlichen Unterschiede lassen eine spezifische Bindung des Isu-Homopolymers an die Membran humaner PBMCs vermuten.

Die IL-10 Induktion durch Isu-Homopolymere auf die Milzzellen konnte somit nicht beobachtet werden, jedoch könnte die Inkubation von Mäuse PBMCs statt der Milzzellen oder Zellen einer anderen Mauslinie mit dem Isu-Homopolymere ein anderes Ergebnis liefern.

### 4.3 IL-6 Cytokinmodulation durch HIV-1 Isu-Homopolymere

Der Anstieg des proinflammatorischen Cytokins, Interleukin-6, konnte bei HIV-1 infizierten Patienten nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten Merrill et al., dass nach einer HIV-1 Infektion von Leukozyten *in vitro* eine hohe IL-6 und TNF $\alpha$  Produktion stattfand (Merrill et al, 1995). Das Vorhandensein immunsuppressiver Cytokine wie TNF $\alpha$  oder IL-6 begünstigt außerdem die Induktion einer Virusreplikation in latent infizierten Zellen und verstärken das Ausmaß der Virusvermehrung in bereits infizierten Zellen (Kedzierska und Crowe, 2001).

In dieser Arbeit konnte eine Zunahme der IL-6 mRNA nach Inkubation mit dem Isu-Homopolymer beobachtet werden (Abbildung 3.8 A und B). Die Inkubation der PBMCs von Spender C.S mit dem Isu-Homopolymer zeigte eine geringe IL-10 Genexpression (Abbildung 3.4 B), dagegen konnte in dieser Kinetik eine hohe Zunahme des IL-6 Transkripts beobachtet werden (Abbildung 3.8 A). Nach Inkubation der PBMCs von Spender M.E. mit dem Isu-Homopolymer ergab sich eine gegenläufige Tendenz der Cytokinmodulation. Das IL-10 Gen war in dieser Kinetik mit am Stärksten hochreguliert (Abbildung 3.4 D), die IL-6 mRNA dagegen, wurde verglichen mit der Kinetik von Spender C.S., signifikant geringer exprimiert (Abbildung 3.8 B). Das HERV-K TM in der Kinetik von Spender M.E. induziert, verglichen mit dem Isu-Homopolymer, eine geringere IL-6 Genexpression.

Wie bereits erwähnt, konnte nachgewiesen werden, dass IL-10 eine Runterregulierung von TNF- $\alpha$  und IL-6 bewirkt (Moore et al., 1993). Untersuchungen von Levy et al. mit FIV und *Toxoplasma gondii* infizierten Katzen zeigten, dass die Runterregulierung von IL-6 mit der IL-10 Hochregulierung in Verbindung zu setzen ist (Levy et al., 2004). Außerdem konnte nach Inkubation von Monozyten mit dem rekombinanten HIV-1 Glykoprotein gp41 nachgewiesen werden, dass die IL-10 Hochregulierung die Expression des proinflammatorischen Cytokins IL-6 hemmt (Takeshita et al., 1995).

Die Beobachtung über die regulatorische Eigenschaft des Cytokins IL-10, die IL-6 Genexpression zu unterdrücken, konnte zwar nicht gezeigt werden, jedoch ist auffällig, dass bei einer geringen IL-10 Expression (Abbildung 3.4) eine höhere IL-6 Expression (Abbildung 3.8) beobachtet wurde.

#### 4.4 INF-1 $\alpha$ Cytokinmodulation durch HIV-1 Isu-Homopolymere

Eine HIV-1 Infektion führt zu einer Steigerung der Produktion verschiedener Cytokine und ihrer Rezeptoren, darunter auch Interferon-1 $\alpha$  (Graziosi *et al.*, 1996). Daher ist von Interesse, ob die HIV-1 Isu-Homopolymere *in vitro* die INF-1 $\alpha$  Expression ebenfalls induzieren können. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der PBMCs von Spender C.S. mit dem Isu-Homopolymer, die Genexpression von INF-1 $\alpha$  induzieren kann (Abbildung 3.7 A). Ein erhöhter Wert kann an zwei Zeitpunkten gemessen werden. In den Zeitpunkten dazwischen wurde es nachweisbar herunter reguliert. Interessanterweise konnte nach Inkubation mit dem Ran-Homopolymer zwar keine Hochregulation beobachtet werden, jedoch eine signifikante Unterdrückungen der Transkription des INF-1 $\alpha$  auf 3% im Vergleich zur unbehandelten Zelle (Abbildung 3.7 B). Eine mögliche Erklärung könnte in der Tatsache liegen, dass das Ran-Homopolymer an die Membran der PBMCs zwar bindet (Lauck, 2008), allerdings aufgrund der randomisierten Aminosäuresequenz keine biologisch aktive Konformation erlangt und somit die Wirkung von HIV-1 nicht mimikrieren kann. Die Unterdrückung könnte eventuell eine rudimentäre Reaktion darstellen. Eine niedrige Basalexpression der IFN-1 $\alpha$  Transkription in unstimulierten PBMCs wurde in einer Studie ebenfalls nachgewiesen (Brandt *et al.*, 1994). Die Relevanz dieser niedrigen IFN- $\alpha$  Transkriptionsraten in unstimulierten Zellen ist unklar. Es wird jedoch diskutiert, dass durch eine konstitutive IFN-1 $\alpha$  Produktion, die Zellen effizienter auf virale Infektionen reagieren können (Hata *et al.*, 2001; Taniguchi *et al.*, 2001). Bei der Inkubation der PBMCs von Spender C.K. mit dem Isu-Homopolymer zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der INF-1 $\alpha$  Genexpression, im Vergleich zu den Kontrollen verbleibt INF-1 $\alpha$  auf Basallevel (Abbildung 3.7 B). Es könnte sein, dass aufgrund der gewählten Zeitpunkte der Messungen die Hochregulierung nicht erfasst wurde oder die unterschiedlichen Ergebnisse spenderabhängig sind. Daher bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Einflüsse des Isu-Homopolymers auf die INF-1 $\alpha$  Expression zu untersuchen. Die Bedeutung der Sequenz-Homologie der HIV Isu-Domäne zu zwei der fünf  $\alpha$ -Helices von IFN- $\alpha$  ist unklar, eine antivirale Aktivität wie bei IFN- $\alpha$  konnte nicht gezeigt werden (unveröffentlicht).

Interferone sind Bestandteile eines Zytokinnetzwerkes, welches im Rahmen einer Virusinfektion für die Regulation zellulärer Funktionen, der Replikation und der Immunantwort verantwortlich sind. Interferon-1 $\alpha$  wirkt direkt antiviral auf HI-Viren durch die Hemmung der Virusreplikation und einer damit verbundene Freisetzung neuer Viruspartikel (Malmgaard, 2004). Interferon-1 $\alpha$  wird seit mehreren Jahren zur Therapie der chronischen Hepatitis B- und der akuten und chronischen Hepatitis C-Infektion eingesetzt (Poynard *et al.*, 1998). Dabei wird sowohl zelluläre als auch virale RNA abgebaut. Die Aktivierung einer Proteinkinase führt zur weiteren Inhibition der Proteinsynthese, wodurch die Entwicklung

weiterer Viruspartikel behindert wird. Interferon-1 $\alpha$  moduliert weiterhin die zelluläre Immunantwort durch vermehrte Expression von MHC-I-Antigen. Es fördert somit die Präsentation viraler Antigene durch HLA-Klasse-I-Moleküle und begünstigt damit die Zerstörung infizierter Leberzellen durch zytotoxische T-Zellen. Hierdurch wird neben der direkten Wirkung auf zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen, die spezifische T-Zell-vermittelte (zytotoxische und Suppressor-T-Zellen) Immunantwort verstärkt (Guterman, 1994).

#### **4.5 Induktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg durch HIV-1 Isu-Homopolymere**

In den Diplomarbeiten von Behrendt (2005), Dao Thi (2006) und Falenski (2007) konnten erste Hinweise erhalten werden, dass sich der Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in der Population von humanen PBMCs nach Inkubation mit Isu-Peptiden erhöht. Sie konnten auch eine geringe Veränderung der FoxP3-mRNA-Expression nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden beobachten. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels 24 Stunden Kinetiken untersucht, ob eine Hochregulierung des FoxP3 Transkripts erfolgt.

Die Toleranzvermittlung im Immunsystem kann durch regulatorische T-Zellen vermittelt werden. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 gilt als Markerprotein von Tregs und ist für die immunsuppressiven Funktion von Tregs entscheidend. (Sakaguchi et al., 2001). Die Überexpression von FoxP3 in naiven T-Zellen kann einen immunsuppressiven Phänotyp induzieren (Fontenot et al., 2003). Demnach ist FoxP3 nicht nur als ein Marker zu betrachten, sondern übernimmt eine wichtige Funktion in der Negativregulation des Immunsystems. HIV infizierte Patienten zeigten in vielen Studien einen prozentualen Anstieg der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellpopulation, parallel dazu konnte die Zunahme des Transkriptionsfaktor FoxP3 nachgewiesen werden (Eggena et al., 2005; Gaardbo et al., 2008).

Mexas et al. konnten nach der FIV Infektion der Katze eine höhere Viruslast in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, als in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen, beobachten (Mexas et al., 2008). Dies lässt auf eine Präferenzzielzelle von FIV oder auf eine erhöhte virale Replikation in diesen Zellen vermuten. Die Induktion von FoxP3 und eine Erhöhung der TGF- $\beta$  Expression konnte bereits eine Woche nach Infektion ebenfalls nachgewiesen werden, welches eine Aktivierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen zur Folge hat.

##### **4.5.1 FoxP3 Aktivierung durch HIV-1 Isu-Homopolymere**

Eine Hochregulierung der FoxP3 mRNA (Abbildung 3.11) und des durchflusszytometrisch gemessenen FoxP3-Proteins konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden (Abbildung 3.11).

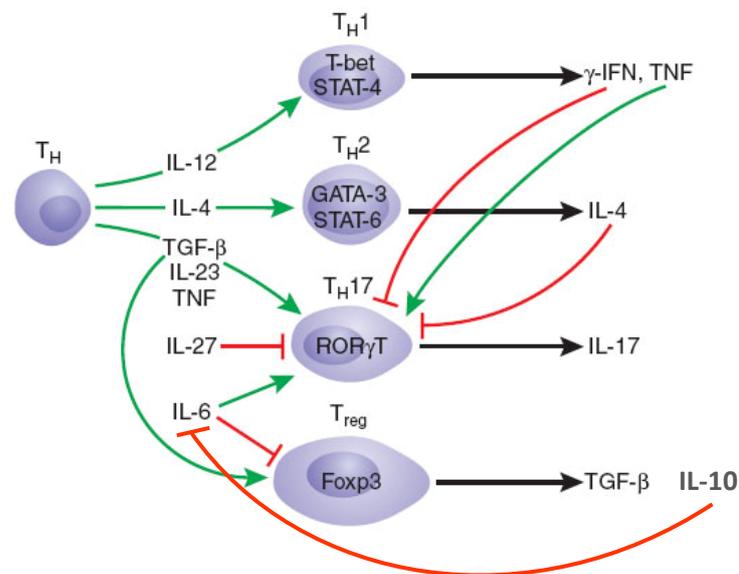
Wie bereits einleitend beschrieben, liegt die Population der natürlichen regulatorischen T-Zellen bei ungefähr 5%. Folglich hat bereits eine geringe Erhöhung der Treg-Population einen Effekt auf die Immunsuppression.

In den Kinetiken wurde das Genexpressionsmuster von FoxP3 nach der Isu-Homopolymer Inkubation der PBMCs im Vergleich zu den Kontrollen untersucht. Diese Untersuchung sollte zum einen Aufschluss über den Einfluss des Isu-Homopolymeres auf Tregs geben und zum anderen eine mögliche Stimulation der Treg Aktivierung durch die untersuchten Cytokine aufdecken. Die Kinetik mit den PBMCs von Spender S.S. zeigte, dass das Isu-Homopolymer im Vergleich zur Ran-Homopolymer und der Medium Kontrolle eine Hochregulierung des FoxP3 Transkripts induzierte (Abbildung 3.10 A). Diese FoxP3 Hochregulierung konnte in allen Kinetiken 6-12 Stunden nach der Inkubation beobachtet werden. Die Kinetik von Spender M.E. zeigte nach der Isu-Homopolymer Inkubation der PBMCs einen Anstieg der FoxP3 Expression, jedoch konnte nach der HERV-K TM Inkubation keine Hochregulierung nachgewiesen werden (Abbildung 3.10 D). In allen vier Kinetiken konnte beobachtet werden, dass die Höhe der FoxP3 mRNA Hochregulierung nicht mit der Höhe des IL-10 Gehaltes zu korrelieren scheint. Nach Inkubation der PBMCs von Spender S.S. mit Isu-Homopolymer konnte eine 8-fache FoxP3 Hochregulierung gemessen werden (Abbildung 3.10 A), bei einem IL-10 Proteingehalt von 120pg/ml (Abbildung 3.5 A). Die PBMCs von Spender M.E. zeigten dagegen nur eine 3-fache FoxP3 Hochregulierung (Abbildung 3.10 D), bei einem IL-10 Proteingehalt von 630pg/ml (Abbildung 3.5 D), nach der Isu-Homopolymer Induktion.

In supprimierend wirkenden  $CD4^+CD25^+$  Tregs konnte eine starke Expression von FoxP3 nachgewiesen werden (de Kleer et al., 2004). Morgan et al. konnten zusätzlich zeigen, dass humanes FoxP3 anders als das der Maus nicht nur in  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen exprimiert wird. Dennoch ist die FoxP3 Zunahme Ausdruck eines Aktivierungszustandes, weil das Gen in Tregs um ein Vielfaches höher exprimiert wird als in anderen humanen Zellen (Morgen et al., 2005). Außerdem kann eine Induktion der FoxP3 Expression in  $CD4^+CD25^-$  Zellen zu einer Konversion dieser Zellen zu einem Treg Phänotyp führen (Fontenot et al., 2003, Hori et al., 2003). Dabei scheint die Anwesenheit bestimmter Cytokine eine wichtige Rolle zu spielen. Vor allem TGF- $\beta$  wird in diesem Zusammenhang häufig diskutiert. So haben Chen et al. herausfinden können, dass TGF- $\beta$  durch Induktion der FoxP3 Expression in der Lage ist,  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen zu Tregs zu konvertieren (Chen et al., 2003).

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung von TH17 Zellen und Treg von TGF- $\beta$  induziert wird (Abbildung 4.2), wobei die Anwesenheit von IL-6 entscheidet, welcher Typ entsteht (Kimura et al., 2007). Die Anwesenheit von IL-6 lässt auf eine geringe IL-10 Produktion und eine vermehrte Differenzierung zu TH17 Zellen, statt zu Tregs, schließen. In dieser Arbeit konnte die Beobachtung von Takeshita et al. bestätigt werden, dass die IL-6 Produktion abhängig vom IL-10 Gehalt ist (Takeshita et al., 1995). Die Cytokinmodulation in

Richtung einer vermehrten IL-6 Freisetzung statt IL-10 nach der Inkubation der PBMCs mit dem Isu-Homopolymer kann unter Umständen auf einen unterschiedlichen Immunstatus der Spender zurückzuführen sein. Eine geringe IL-10 Sekretion könnte auf eine geringere Anzahl der Treg Population rückschließen lassen, sodass die Hochregulierung des FoxP3 Gens, induziert durch das Isu-Homopolymer vermehrt  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen induziert. Die Zunahme der Tregs in der Population von humanen PBMCs hätte zur Folge, dass mehr IL-10 hergestellt werden kann. Das Verhältnis zwischen  $T_H17$  Zellen und Tregs könnte neben dem Immunstatus des Spenders, die unterschiedliche Cytokinmodulation erklären.



**Abbildung 4.2: Cytokin induzierte Differenzierung verschiedener T-Zelltypen**  
(Steinman T, Nature Medicine 13:139, 2007)

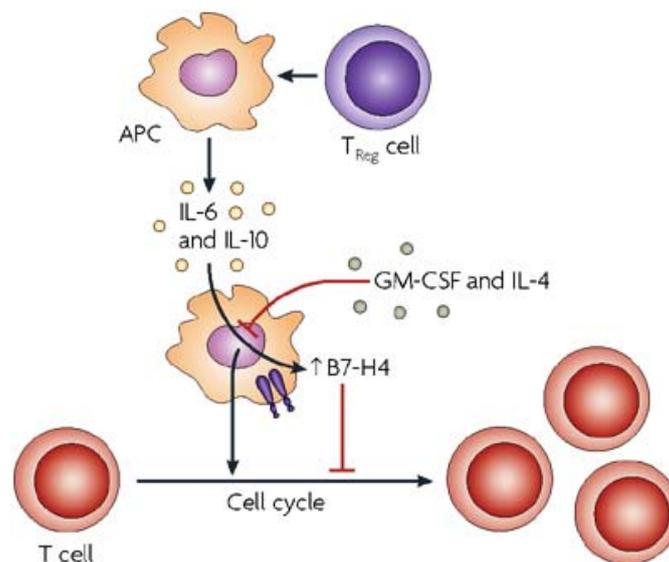
Die Rolle der  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Tregs bei der HIV-1-Erkrankung *in vivo*, ist wie bereits erwähnt durch das Fehlen von geeigneten Tiermodellen schlecht verstanden. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob die Inkubation mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer in Milzzellen von C57BL/6 Mäusen eine FoxP3 Expression induzieren kann. Die Ergebnisse zeigten eine geringfügige Zunahme des FoxP3 Transkripts nach Inkubation der Milzzellen mit dem Isu-Homopolymer, aber auch mit dem randomisierten Homopolymer konnte eine erhöhte Genexpression nachgewiesen werden (Abbildung 3.9). Die polymomische Darstellungsweise beider Peptide macht deutlich, dass keine signifikante Unterschiede zwischen Isu-Homopolymer und Ran-Homopolymer inkubierten Milzzellen in der FoxP3 Expression vorhanden ist. Ein spezifischer Effekt, induziert durch das Isu-Homopolymer, konnte somit nicht gezeigt werden. Jiang et al. konnten dagegen, nach der HIV-1 Infektion des Lymphknotens, einen signifikanten Effekt auf Tregs beobachten (Jiang et al., 2008). Sie verwendeten humanisierte „Rag2(-/-)gammaC(-/-) (DKO-hu HSC)“ Mauslinien. In dieser

Arbeit dagegen wurde die Standard C57BL/6 Mauslinie verwendet. Alternative Mauslinien könnten nach der Inkubation mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer eventuell einen messbaren biologischen Effekt aufzeigen.

#### **4.3.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Aktivierung durch HIV-1 Isu-Homopolymer**

Mittels durchflusszytometrischer Analysen konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach der Inkubation mit den HIV-1 Isu-Homopolymeren, im Vergleich zu den Kontrollen, sich nicht signifikant änderte (Abbildung 3.12 A, 3.13 A, 3.14 A). Die Induktion der PBMCs von Spender S.S über 24 Stunden mit dem HIV-1 Isu-Homopolymer zeigte eine signifikante Zunahme der CD25<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> Zellen, gemessen an der CD4<sup>+</sup> Population (Abbildung 3.12). Die beobachtete Zunahme des FoxP3<sup>+</sup> Anteils nach der Inkubation des Ran-Homopolymers deutet auf einen biologischen Effekt hin (Abbildung 3.12 C). Der Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen an der gesamt PBMC Population zeigt eine Verdopplung der Tregs, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, induziert durch das HIV-1 Isu-Homopolymer (Abbildung 3.12 D). In der Kinetik von Spender C.K. konnten reproduzierbare Ergebnisse ermittelt werden (Abbildung 3.13). Die PBMCs von Spender S.B wurden nach 24 und 72 Stunden untersucht, um einen Langzeiteffekt des Isu-Homopolymers zu ermitteln. Im Vergleich zu den vorherigen Messungen ist der Anteil der CD25<sup>+</sup> Zellen in dieser Untersuchung deutlich geringer. Die geringe CD25<sup>+</sup> T-Zellpopulation konnte mit keiner Messungen zuvor bestätigt werden, daher könnte eine denkbare Fehlerquelle die Abnahme der Fluoreszenzaktivität des Anti-CD25 sein. Dieser Effekt bewirkt eine geringere prozentuale Erfassung der dreifach positiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen. Dennoch kann nach der Inkubation der PBMCs mit Isu-Homopolymer die Aktivierung der Tregs nachgewiesen werden. Die 72 Stunden Messung zeigte, verglichen mit der 24 Stunden Messung, eine basale Zunahme des Anteils CD25<sup>+</sup> T-Zellen. Der Nachweis einer Aktivierung der Tregs, induziert durch das Isu-Homopolymer, konnte auch nach 72 Stunden erbracht werden. Die Inkubation der PBMCs mit dem Isu-Homopolymer zeigt eine doppelt so hohe Treg-Population im Vergleich zu den Kontrollen. Die letzte Messung macht die Schwierigkeit einer dreifach Positiven Markierung der Tregs deutlich. Diese Methode gibt zwar den charakteristischen Treg Anteil wieder, jedoch wäre die Analyse eines einzigen spezifischen Treg-Oberflächenproteins besser detektierbar. Nach Bruder et al. konnte mit dem Rezeptor Neuropilin-1 ein weiterer potentieller Marker für Treg gefunden worden sein (Bruder et al., 2004). Dieser Marker könnte ebenfalls bei der Identifizierung von Treg aus PBMCs in der Zukunft von Bedeutung erlangen.

Bei HIV positiven Patienten wurde ein Abfall der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit zunehmender Viruslast beobachtet (Perelson et al., 1997). Die Inkubation der PBMCs mit Isu-Homopolymere konnte wie erwartet diesen Effekt nicht hervorrufen (Abbildung 3.12, 3.13, 3.14). Das HIV-1 Isu-Homopolymer stellt einen Teilbereich des HIV-1 gp41 dar, bei der *in vitro* die Hemmung der Lymphocytenproliferation nachgewiesen werden konnte (Ruegg et al., 1989; Denner et al., 1994). Im Thymus aktive Tregs unterdrücken die Proliferation autoreaktiver Lymphocyten und naiver CD4<sup>+</sup> Helferlymphocyten, wodurch die Selbst-Toleranz aufrecht erhalten wird (O'Garra A et Vieira P, 2004). Regulatorische T-Zellen können die IL-6 und IL-10 Produktion von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) auslösen. Die daraus resultierende Hochregulierung von B7-H4 der APCs hemmt ebenfalls die Lymphocytenproliferation (Abbildung 44.3).



**Abbildung 4.3: Hemmung der Lymphocytenproliferation der Tregs über APCs** (Weiping Zou et Lieping Chen, 2008. *Nature Reviews Immunology*)

Außerdem sind Tregs, wie bereits beschrieben, in der Lage, naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in CD4<sup>+</sup> Tregs umzuwandeln. Analysen bei FIV positiver Katzen konnte die Aktivierung der phänotypischen Merkmale der Tregs, die IL-2 Rezeptor  $\alpha$ -Kette (CD25) auf ihrer Oberfläche und eine Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 nachweisen. Aus diesen Untersuchungen geht eine signifikante Hochregulierung weiterer Co-stimulierende Moleküle B7.1, B7.2 und CTLA4 auf ihrer Oberfläche hervor (Mexas et al., 2008; Vahlenkamp et al., 2004). Diese Berichte korrelieren mit der Aktivierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen nach der *in vitro* und *in vivo* HIV Infektion (Gaardbo et al., 2008; Kinter et al., 2004; Andersson et al., 2005). Die in dieser Arbeit durchflusszytometrisch detektierte *in vitro* Zunahme an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen induziert durch das Isu-Homopolymer zeigt, dass die HIV-1 Isu-Domäne an der Aktivierung der Tregs beteiligt ist.

## 5. Zusammenfassung

Infektionen mit HIV, FIV und anderen Retroviren haben häufig eine Immundefizienz zur Folge. Der Mechanismus dieser Immundefizienz ist weitestgehend unbekannt und vom besonderen Interesse für die HIV-Forschung. Erste Daten zeigten, dass ein hoch konservierter Bereich des transmembranen Hüllproteins gp41, die immunsuppressive Domäne (Isu-Domäne), *in vitro* immunsuppressive Eigenschaften aufweist. Der Einfluss dieser Domäne von gp41 auf die Cytokinmodulation und die Aktivierung der regulatorischen T-Zellen (Tregs), wurde deshalb in dieser Arbeit genauer untersucht.

Zur Charakterisierung der Wirkung der HIV-1 Isu-Domäne wurden synthetische Peptide, die die Sequenz der HIV-1 Isu-Domäne enthalten, zu Isu-Homopolymeren gekoppelt und das rekombinante HERV-K TM wurde aus Hefezellen exprimiert. Nachdem in einer Mikroarray Analyse in humanen PBMCs nach der Inkubation mit dem Isu-Homopolymer bzw. HERV-K TM etwa 440 Gene überexprimiert gefunden worden waren, darunter die Cytokine IL-6, IL-10, INF-1 $\alpha$  aber auch andere Proteine wie MMP-1, MMP-12 und TREM-1, wurden deren Expression in Kinetiken mittels real time RT-PCR und ELISA Analyse untersucht. Die Inkubation von PBMCs mit dem Isu-Homopolymer und dem HERV-K TM führte zu einer erhöhten Genexpression von IL-10 zwischen 6 und 10 Stunden, während eine Freisetzung von IL-10 Protein zwischen 10 und 24 Stunden beobachtet wurde. Eine direkte Übereinstimmung der IL-10 Genexpression und der gemessenen IL-10 Menge im Überstand konnte nachgewiesen werden. Die Mikroarray Analyse zeigte für IL-6 die stärkste Überexprimierung aller untersuchten Gene. Dies konnte im Rahmen der Kinetik bestätigt werden, bei der bereits 4 Stunden nach Inkubation eine signifikante Hochregulierung des IL-6 Transkripts detektiert wurde. Die Untersuchung des Cytokins INF-1 $\alpha$  zeigten in einer Kinetik ebenfalls eine Hochregulierung des Gens.

Die Rolle der Tregs bei der Immunpathogenese der retroviralen Infektion ist noch weitestgehend unbekannt. Unter anderem konnte eine Aktivierung der Tregs sowohl in HIV-infizierten Menschen als auch in FIV-infizierten Katzen gezeigt werden. In dieser Arbeit konnte eine signifikante FoxP3 Hochregulierung als Marker der Aktivierung von Tregs zwischen 6 und 12 Stunden nach Inkubation von PBMCs mit Isu-Homopolymeren bzw. mit HERV-K TM beobachtet werden. Außerdem wurde die Zahl der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen nach 24 Stunden und 72 Stunden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg der Tregs bestätigt werden, die mit den Daten der Expressionsanalyse von FoxP3 übereinstimmen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die HIV-1 Isu-Domäne *in vitro* an der Aktivierung immunsuppressiver Mechanismen beteiligt ist.

## 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, 78, 2454–2459.
- Aderem A , and Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response.  
Nature 2000, 406: 782-787.
- Akridge RE, Oyafuso LK, Reed SG. IL-10 is induced during HIV-1 infection and is capable of decreasing viral replication in human macrophages.  
J Immunol 1994, 153: 5782.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity.  
Cell 2006, 124: 783-801.
- Isaacs A, Lindenmann J, Valentine RC. Virus interference II. Some properties of interferon.  
Proc R Soc Lond B Biol Sci 1957, 147(927): 268-273.
- Andersson J, Boasso A, Nilsson J, Zhang R, Shire NJ, Lindback S, Shearer GM, Choungnet CA. The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients.  
J Immunol 2005, 174: 3143-3147.
- Ank N, West H, Paludan SR. IFN-lambda: novel antiviral cytokines  
J Interferon Cytokine Res 2006, 26: 373-379.
- Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells.  
J Exp Med 2004, 199(10): 1401-1408.
- Avery PR, Hoover EA. Gamma interferon/interleukin 10 balance in tissue lymphocytes correlates with down modulation of mucosal feline immunodeficiency virus infection.  
J Virol 2004, 78(8): 4011-4019.
- Bach JM, Hurtrel M, Chrakrabarti L, Ganiere JP, Montagnier L, Hurtrel B. Early stages of feline immunodeficiency virus infection in lymph nodes and spleen.  
AIDS Res. Hum. Retrovir. 1994, 10: 1731-1738.
- Barcova M, Kacani L, Speth C, Dierich MP. gp41 envelope protein of human immunodeficiency virus induces interleukin (IL)-10 in monocytes, but not in B, T, or NK cells, leading to reduced IL-2 and interferon-gamma production.  
J Infect Dis 1998, 177(4): 905-913.
- Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily  
Proc Natl Acad Sci U S A 1990, 87(18): 6934-6938.
- Bebell LM, Passmore JA, Williamson C, Mlisana K, Iriogbe I, van Loggerenberg F, Karim QA, Karim SA. Relationship between levels of inflammatory cytokines in the genital tract and CD4+ cell counts in women with acute HIV-1 infection.  
J Infect Dis 2008, 198(5): 710-714.
- Behrendt R, Immunsuppressive Eigenschaften transmembraner Hüllproteine von Retroviren, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald (2005 Juli)

Blaise S, Mangeney M and Heidmann T. The envelope of Mason-Pfizer monkey virus has immunosuppressive properties.

J Gen Virol. 2001, 82(Pt 7): 1597-1600.

Bogdan C, Mattner J, Schleicher U. The role of type I interferons in non-viral infections.

Immunol Rev 2004, 202: 33-48. Review.

Boasso A, Shearer GM. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis.

Clin Immunol 2008, 126(3): 235-242. Epub 2007 Oct 3. Review.

Brandt ER, Linnane AW, Devenish RJ. Expression of IFN A genes in subpopulations of peripheral blood cells.

Br J Haematol 1994, 86: 717-25.

Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf A, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boehmer H, Buer J, Hansen W. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells.

Eur J Immunol 2004, 34: 623-630.

Breen EC, Rezai AR, Nakajima K, Beall GN, Mitsuyasu RT, Hirano T, Kishimoto T, Martinez MO. Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production.

J. Immunol. 1990, 144:480-484.

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

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

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.

Nat Genet. 2001, 27(1): 68-73.

Burgess K, Price P, James IR, Stone SF, Keane NM, Lim AY, Warmington JR, French MA. Interferon-gamma responses to *Candida* recover slowly or remain low in immunodeficient HIV patients responding to ART.

J Clin Immunol. 2006, 26(2): 160-167.

Capobianchi MR, Ankel H, Ameglio F, Paganelli R, Pizzoli PM, Dianzani F. Recombinant glycoprotein 120 of Human immunodeficiency virus is a potent interferon inducer.

AIDS Res. Hum. Retroviruses 1992, 8:575-9.

Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity.

J Immunol. 2007, 178(1): 172-178.

Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.

Cell 1997, 89: 263-273.

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

AIDS Res Hum Retrovir. 1996, 12: 1141.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3.  
J Exp Med. 2003, 198(12): 1875-1886.

Chen YH, Wu W, Yang J, Sui SF, Sun J, Dierich MP. Antibodies against human IFN-alpha and -beta recognized the immunosuppressive domain of HIV-1 gp41 and inhibit gp41-binding to the putative cellular receptor protein p45.  
Immunol Lett. 1999, 69(2): 253-257.

Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu LC, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates.  
Cell 1996, 85: 1135-1148.

Cianciolo GJ, Copeland TD, Oroszlan S, Snyderman R. Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins.  
Science 1985, 230: 453-455.

Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy.  
Science 1995, 267: 483-489.

Cottrez F, Groux H. Specialization in tolerance: innate CD(4<sup>+</sup>)CD(25<sup>+</sup>) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells.  
Transplantation 2004, 77(1): 12-15. Review.

Daniel V, Naujokat C, Sadeghi M, Zimmermann R, Huth-Kuhne A, Opelz G. Normal or Even Increased Dendritic Cell and Peripheral Blood Lymphocyte Subsets With Regulatory Phenotype in Clinically Stable Long-Term HIV-Infected Patients With Hemophilia on Highly Active Antiretroviral Therapy.  
JAIDS 2008, 47(1): 1-15.

Dao Thi, V.L. Die Induktion von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen durch transmembrane Hüllproteine von Retroviren. Technische Universität Berlin 2006

De Cock KM, Adjorlolo G, Ekpini E, Sibailly T, Kouadio J, Maran M, Brattegaard K, Vetter KM, Doorly R, Gayle HD. Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic.  
JAMA 1993, 270: 2083-2086.

de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, de Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis.  
J Immunol 2004, 172(10): 6435-6443.

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

- de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. 1991, 174(4): 915-924.
- De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991, 174(5): 1209-1220.
- Dean GA, Reubel GH, Moore PF, Pedersen NC. Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus in lymphocyte subsets of blood and lymph node. *J Virol*. 1996, 70: 5165-5169.
- Dean GA, Pedersen NC. Cytokine response in multiple lymphoid tissues during the primary phase of feline immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 1998, 72: 9436-9440.
- Dean GA, LaVoy A, Yearley J, Stanton C. Cytokine modulation of the innate immune response in feline immunodeficiency virus-infected cats. *J Infect Dis*. 2006, 193(11): 1520-1527. Epub 2006.
- Denner J, Wunderlich V, Bierwolf D. Suppression of human lymphocyte mitogen response by disrupted primate retroviruses of type C (baboon endogenous virus) and type D (PMFV). *Acta Biol Med Ger*. 1980, 39(11-12): K19-K26.
- Denner J, Wunderlich V, Sydow G. Suppression of human lymphocyte mitogen response by retroviruses of type D. I Action of highly purified intact and disrupted virus. *Arch Virol*. 1985, 86(3-4): 177-186.
- Denner J, Wunderlich V, Bierwolf D. Suppression of human lymphocyte mitogen response by proteins of the type-D retrovirus PMFV. *Int J Cancer* 1986, 37(2): 311-316.
- Denner J. Immunosuppression by oncogenic retroviridae. In: Zschiesche W. Modulation of the immune responsiveness by infectious agents. Fischer Verlag 1987, Jena: 140-201.
- Denner J, Vogel T, Norley S, Ennen J, Kurth R. The immunosuppressive (ISU-) peptide of HIV-1: Binding to lymphocyte surface proteins. *J Cancer Res Clin Oncology* 1993, 119(1): 28.
- Denner J, Norley S, Kurth R. The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *AIDS* 1994, 8(8): 1063-1072.
- Denner J, Vogel T, Norley S, Hoffmann A, Kurth R. The immunosuppressive (ISU-) peptide of HIV-1: Binding proteins of lymphocytes detected by different methods. *J Cancer Res Clin Oncology* 1995, 121: 34.
- Denner J, Persin C, Vogel T, Haustein D, Norley S, Kurth R. The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation. *JAIDS Hum Retrovirol*. 1996, 12(5): 442-450.

- Denner J. Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 1998, 862: 75-86.
- Denner J. How does HIV induce AIDS? The virus protein hypothesis. *J Hum Virol.* 2000, 3(2): 81-82.
- Denner J. AIDS und die Vorstadien. Ein Leitfaden für Praxis und Klinik. Editorial: AIDS-Pathogenese noch immer unklar. L'ager-Stehr J und Helm EB 2002, 1-3. Springer-Verlag.
- Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol.* 1993, 151(3): 1224-1234.
- Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, Mugenyi P, Cao H. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol.* 2005, 174: 4407-4414.
- English RV, Nelson P, Johnson CM, Nasisse M, Tompkins WA, Tompkins MB. Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis* 1994, 170:543–552.
- Fahlén L, Read S, Gorelik L, Hurst SD, Coffman RL, Flavell RA, Powrie F. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2005, 201 pp. 737–746.
- Falenski A. Induktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen durch retrovirale transmembrane Hüllproteine. Freie Universität Berlin 2007
- Fiorentino DF, Bond MW, and Mosmann TR. Two types of mouse T-helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989, 170: 2081-2095.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y., Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003, 4(4): 330-336.
- Fraziano M, Montesano C, Lombardi VR. Epitope specificity of anti-HIV antibodies in human and murine autoimmune diseases. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1996, 12:491-496.
- Freed, E. O., Myers, D. J., and Risser, R. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87(12) 4650-4.
- Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat. Immunol.* 2006, 7 1250-1257.
- Gaardbo JC, Nielsen SD, Vedel SJ, Ersbøll AK, Harritshøj L, Ryder LP, Nielsen JO, Kolte L. Regulatory T cells in human immunodeficiency virus-infected patients are elevated and independent of immunological and virological status, as well as initiation of highly active anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol.* 2008, 154(1):80-6.

Germain, R. N., and D. H. Margulies. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation.

Annu. Rev. Imm. 1993,11:403-50.

Gershon RK, Kondo K.. Infectious immunological tolerance.

Immunology 1971, 21: 903-14.

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency.

N Engl J Med 1981, 1425-1431.

Graziosi C, Gantt KR, Vaccarezza M, et al. Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection.

Proc Natl Acad Sci USA. 1996, 93:4386–4391.

Graziosi, C., Pantaleo, G., Gantt, K.R., Fortin, J.P., Demarest, J.F., Cohen, O.J., Sekaly, R.P., Fauci, A.S.,. Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIVinfected individuals.

Science 1994, 265, 248–252.

Guery and Adorini, 1995. J.C. Guery and L. Adorini, Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells.

J. Immunol. 1995, 154 pp. 536–544.

Guery, J.C., Galbiati, F., Smiroldo, S., and Adorini, L. (1997). Non- Lalande, M. A reversible arrest point in the late G1 phase of MHC-linked Th2 cell development induced by soluble protein ad- the mammalian cell cycle.

Exp. Cell Res. 1990, 186, 332–339.

Gutterman, J.U.. Cytokine therapeutics: lessons from interferon-alpha.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91 1198-1205.

Haase, A.. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4<sup>+</sup> T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues.

Annu. Rev. Immunol. 1999, 17:625.

Haraguchi S, Good RA, Cianciolo GJ, Engelman RW, Day NK. Immunosuppressive retroviral peptides: immunopathological implications for immunosuppressive influences of retroviral infections.

J Leukoc Biol. 1997, 61(6):654-66. Review.

Haraguchi, S., et al., Differential modulation of Th1- and Th2-related cytokine mRNA expression by a synthetic peptide homologous to a conserved domain within retroviral envelope protein.

Proc Natl Acad Sci U S A 1995, 92(8): p. 3611-5.

Haraguchi, S., R.A. Good, and N.K. Day, Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns.

Immunol. Today 1995, 16(12): p. 595-603.

Harrell, R.A., et al., Suppression of the respiratory burst of human monocytes by a synthetic peptide homologous to envelope proteins of human and animal retroviruses.

J Immunol. 1986, 136(10): p. 3517-20.

- Harris, D.T., et al., Inhibition of human natural killer cell activity by a synthetic peptide homologous to a conserved region in the retroviral protein, p15E.  
J Immunol. 1987, 138(3): p. 889-94.
- Hata N, Sato M, Takaoka A, Asagiri M, Tanaka N, Taniguchi T.. Constitutive IFNalpha/beta signal for efficient IFN-alpha/beta gene induction by virus.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001, 285:518-25.
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response.  
Biochem J. 1990, 265(3):621-36. Review.
- Higuchi, R., C. Fokler, G. Dollinger, and R. Watson. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions.  
BioTechnology 1993, 11: 1026-1030.
- Hollier MJ, Dimmock NJ. The C-terminal tail of the gp41 transmembrane envelope glycoprotein of HIV-1 clades A, B, C, and D may exist in two conformations: an analysis of sequence, structure, and function.  
Virology. 2005, 337(2):284-96.
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S., Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.  
Science 2003, 299(5609): 1057-1061.
- H. Tang, B. Low, S. A. Rutherford, and Q. Hao. Thrombin induces endocytosis of endoglin and type-II TGF- $\beta$  receptor and down-regulation of TGF- $\beta$  signaling in endothelial cells.  
Blood 2005, 105,1977-1985.
- Janeway,C.A., Jr., and Medzhitov,R. Innate immune recognition.  
Annu. Rev. Immunol. 2002, 20: 197-216.
- Ji, J., G. K. Sahu, V. L. Braciale, and M. W. Cloyd. HIV-1 induces IL-10 production in human monocytes via a CD4-independent pathway.  
Int. Immunol. 2005,17: 729–736.
- Joshi, A., Vahlenkamp, T.W., Garg, H., Tompkins, W.A., Tompkins, M.B., Preferential replication of FIV in activated CD4(+)CD25(+)T cells independent of cellular proliferation.  
Virology. 2004, 321, 307–322.
- Joss a, A. M., Faith a, Blaser K, Akdis Ca. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway.  
Eur J Immunol. 2000, v.30, n.6, p.1683-90.
- Jutel, M. Akdis, F. Budak, C. Aebischer-Casaulta, M. Wrzyszczyk, K. Blaser and C.A. Akdis, IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy.  
Eur. J. Immunol. 2003, 33 pp. 1205–1214.
- Kedzierska, K., and Crowe, S.: Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications.  
Antivir Chem Chemother. 2001, 12 133-50.
- Kevin N. Couper, Daniel G. Blount,<sup>1</sup> and Eleanor M. Riley<sup>2</sup> IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection  
The Journal of Immunology 2008, 180: 5771–5777.

- Kimura A, Naka T, Kishimoto T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104:12099–12104.
- Kinter A, McNally J, Riggin L, Jackson R, Roby G, et al. Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104: 3390–3395.
- 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, 200, 331–343.
- Kishimoto, T., Taga, T. and Akira, S. Cytokine signal transduction *Cell* 1994, 76 (2), p. 253-62.
- Kleinerman, E.S., et al., A synthetic peptide homologous to the envelope proteins of retroviruses inhibits monocyte-mediated killing by inactivating interleukin 1. *J Immunol.* 1987, 139(7): p. 2329-37.
- Koutsonikolis, A., et al., HIV-1 recombinant gp41 induces IL-10 expression and production in peripheral blood monocytes but not in T-lymphocytes. *Immunol Lett.* 1997, 55(2): p. 109-13.
- Kowalski, M., J. Potz, L. Basiripour, T. Dorfman, W. C. Goh, E. Terweilliger, A. Dayton, C. Rosen, W. Haseltine, and J. Sodroski. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 1987, 237:1351–1355.
- Lasky, A. L., G. Nakamura, D. H. Smith, C. Fennie, C. Shimasaki, E. Patzer, P. Berman, T. Gregory, and D. J. Capon. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* 1987, 50:975–985.
- Lauck M. Interaktion des transmembranen Hüllproteins von HIV-1 mit humanen Immunzellen. Eberhart Karls Universität Tübingen 2008
- Launois, P., Swihart, K.G., Milon, G., and Louis, J.A. Early ministraton predicts susceptibility to *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* 1997, 159, 2147–2153.
- L. Cheung, L. McLain, M.J. Hollier, S.A. Reading and N.J. Dimmock, Part of the C-terminal tail of the envelope gp41 transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 is exposed on the surface of infected cells and is involved in virus-mediated cell fusion, *J. Gen. Virol.* 2005, 86 pp. 131–138.
- Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, Smith SM, Derynck R. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J.* 2007, 26(17):3957-67.
- Legrand FA, Nixon DF, Loo CP, Ono E, Chapman JM, et al. Strong HIV-1-Specific T Cell Responses in HIV-1-Exposed Uninfected Infants and Neonates Revealed after Regulatory T Cell Removal. 2006, 1:e102.

Levy, J.K., Ritchey, J.W., Rottman, J.B., Davidson, M.G., Liang, Y.H., Jordan, H.J., Tompkins, W.A., Tompkins, M.B., Elevated interleukin-10-to-interleukin-12 ratio in feline immunodeficiency virus-infected cats predicts loss of type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 1998, 178, 503–511.

Levy JK, Liang Y, Ritchey JW, Davidson MG, Tompkins WA, Tompkins MB. Failure of FIV-infected cats to control *Toxoplasma gondii* correlates with reduced IL2, IL6, and IL12 and elevated IL10 expression by lymph node T cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004, (1-2):101-11.

Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., Flavell, R.A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2006, 24:99-146.

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

Malmgaard, L.. Induction and regulation of IFNs during viral infections.

*J. Interferon Cytokine* 2004, Res. 24:439-454.

Mangency M and Heidmann T. Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95(25): 14920-14925.

Mangency 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, 82(Pt 10):2515-8.

Mangency M, Pothlichet J, Renard M, Ducos B, Heidmann T. Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 2005, 65(7):2588-91.

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

Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., and Rudensky, A.Y. TGF- $\beta$ 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2005, 201, 1061–1067.

Masur, H., Michelis, M.A., Greene, J.B., Onorato, I., Stouwe, R.A., Holzman, R.S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H.W., and Cunningham-Rundles, S. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med JID* 1981, 0255562 305, 1431-1438.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16 2002, 311-23.

- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition.  
Cell 1997, 91(3):295-8. Review.
- Merill JE, and Martinez-Maza O.: Cytokines in AIDS-associated neurons and immune system dysfunction. Neurobiology of Cytokines Part B: Methods in Neuroscience 1995, 243-266.
- Meroni, L., D. Trabattoni, C. Balotta, C. Riva, A. Gori, M. Moroni, M. Villa, M. Clerici, and M. Galli. Evidence for type 2 cytokine production and lymphocyte activation in the early phases of HIV-1 infection.  
AIDS 1995, 10:23-30.
- Mexas AM, Fogle JE, Tompkins WA, Tompkins MB. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells are infected and activated during acute FIV infection.  
Vet Immunol Immunopathol. 2008.
- Mitani M, Cianciolo GJ, Snyderman R, Yasuda M, Good RA, Day NK., Suppressive effect on polyclonal B-cell activation of a synthetic peptide homologous to a transmembrane component of oncogenic retroviruses.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987, 84(1):237-40.
- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Sumida, M., Hiraki, S., Tsubota, T., Kimura, I., Miyamoto, K., and Sato, J.. A novel T-cell line derived from adult T-cell leukemia.  
Gann JID 1980, 82:144-71, 155-156.
- Monell CR, Strand M., Structural and functional similarities between synthetic HIV gp41 peptides and defensins.  
Clin Immunol Immunopathol. 1994, 71(3):315-24.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal MR, Vieira P, Mosmann TR: Interleukin-10.  
Annu Rev Immunol. 1993, 11, 165-190.
- Morgan, Jolanda H.M. van Bilsen, Aleida M. Bakker, Bianca Heemskerk, Marco W. Schilham, Franca C. Hartgers, Berendina G. Elferink, Linda van der Zanden, René R.P. de Vries, Tom W.J. Huizinga, Tom H.M. Ottenhoff and René E.M. Toes Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells in humans.  
Human Immunology 2005, Volume 66, Issue 1, Pages 13-20.
- Moses HL, Serra R. Regulation of differentiation by TGF-beta.  
Curr Opin Genet Dev. 1996, (5):581-6. Review.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.  
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986, 51 Pt 1:263-73.
- Nakajima, K., M. O. Martinez, T. Hirano, E. C. Breen, P. G. Nishanian, G. J. Salazar, J. L. Fahey, and T. Kishimoto. Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor-2/IFN-beta 2) production in HIV.  
J. Immunol. 1989, 142:531-536.
- Navikas V, Link J, Persson C, Olsson T, Höjeborg B, Ljungdahl A, Link H, Wahren B. Increased mRNA expression of IL-6, IL-10, TNF-alpha, and perforin in blood mononuclear cells in human HIV infection.  
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1995, 9(5):484-9.

- O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med.* 2004, 10(8):801-5. Review.
- Ogasawara, M., et al., Inhibition of murine cytotoxic T lymphocyte activity by a synthetic retroviral peptide and abrogation of this activity by IL.  
*J Immunol.* 1990, 145(2): p. 456-62.
- Ohashi, T., R. Goitsuka, T. Watari, H. Tsujimoto, and A. Hasegawa. Elevation of feline interleukin 6-like activity in feline immunodeficiency virus infection.  
*Clin. Immunol. Immunopathol.* 1992, 65:207–211.
- Paul R. Avery and Edward A. Hoover. 2004. Gamma Interferon/Interleukin 10 Balance in Tissue Lymphocytes Correlates with Down Modulation of Mucosal Feline Immunodeficiency Virus Infection  
*J Virol.* 2004, 78(8): 4011–4019.
- Pedersen NC, E.W. Ho, M.L. Brown & J.K. Yamamoto: Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome.  
*Science* 1987, 235, 790-793.
- Perelson AS, Essunger P, Ho DD. Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo.  
*AIDS* 1997, 11:S17–S24.
- Petty, M.B. Tompkins and W.A. Tompkins, Transforming growth factor-beta/transforming growth factor-betaRII signaling may regulate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-regulatory cell homeostasis and suppressor function in feline AIDS lentivirus infection.  
*J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2008, 47.pp. 148–160.
- P. Tailor, T. Tamura, K. Ozato, IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells  
*Cell Res.* 2006, 16.134–140.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, 77, 7415-7419.
- Powell BR, Buist NR, Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy.  
*J Pediatr* 1982; 100: 731-737.
- Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT) *Lancet.* 1998, 352(9138):1426-32.
- Radtke, A.L., and O'Riordan, M.X. Intracellular innate resistance to bacterial pathogens.  
*Cell. Microbiol.* 2006, 8, 1720-1729.
- Read S, P. F. CD4(+) regulatory T cells.  
*Curr Opin Immunol.* 2001, v.13, n.6, p.644-9.

- Ritchey, J. W., J. K. Levy, S. K. Bliss, W. A. Tompkins, and M. B. Tompkins. Constitutive expression of types 1 and 2 cytokines by alveolar macrophages from feline immunodeficiency virus-infected cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001, 79:83–100.
- Roberts, A.B., TGF-beta signaling from receptors to the nucleus. *Microbes Infect*, 1999. 1(15): p. 1265-73. Heinrich, P.C., Castell, J.V. and Andus, T. Interleukin-6 and the acute phase response *Biochem. J.* 1990, 265 (3), p. 621-36.
- Roberts AB. TGF-beta signaling from receptors to the nucleus. *Microbes Infect.* 1999, 1(15):1265-73. Review.
- Rouse BT, Sarangi PP, Suvas S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev.* 2006, 212:272–286.
- Ruegg CL, Monell CR, Strand M., Identification, using synthetic peptides, of the minimum amino acid sequence from the retroviral transmembrane protein p15E required for inhibition of lymphoproliferation and its similarity to gp21 of human T-lymphotropic virus types I and II. *J Virol.* 1989, 63(8):3250-6.
- 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, 155: 1151-64.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, Y. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. Immunological tolerance maintained by CD25<sub>+</sub>CD4<sub>+</sub> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 2001, 182: 18–32.
- Schramm C, Huber S, Protschka M, Czochra P, Burg J, Schmitt E, Lohse AW, Galle PR, Blessing M. TGFbeta regulates the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *Int Immunol.* 2004, 16(9):1241-9. Epub 2004 Jul 12.
- 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, 3: 135-42.
- Siegal, F.P., Lopez, C., Hammer, G.S., Brown, A.E., Kornfeld, S.J., Gold, J., Hassett, J., Hirschman, S.Z., Cunningham-Rundles, C., and Adelsberg, B.R. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N Engl J Med JID* 1981, 0255562 305, 1439-1444.
- Sigurdsson, B., Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootological and pathological study. *Br. Vet. J.* 1954, 110. pp. 225–270.
- S.S. Chen, S.F. Lee and C.T. Wang, Cellular membrane-binding ability of the C-terminal cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane protein gp41, *J. Virol.* 2001, 75 pp. 9925–9938.

- Speth C, Joebstl B, Barcova M, Dierich MP., HIV-1 envelope protein gp41 modulates expression of interleukin-10 and chemokine receptors on monocytes, astrocytes and neurones.  
AIDS 2000, 14(6):629-36.
- Stein, B. S., and E. G. Engleman. Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor.  
J. Biol. Chem. 1990, 265:2640–2649.
- Stylianou, E., P. Aukrust, D. Kvale, F. Muller, and S. S. Froland. IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy.  
Clin. Exp. Immunol. 1999, 116:115–120.
- Takeshita S, Breen EC, Ivashchenko M, Nishanian PG, Kishimoto T, Vredevoe DL, Martinez-Maza O. Induction of IL-6 and IL-10 production by recombinant HIV-1 envelope glycoprotein 41 (gp41) in the THP-1 human monocytic cell line.  
Cell Immunol. 1995, 165(2):234-42.
- Taniguchi T, Takaoka A. A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited.  
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2001, 2:378-86.
- Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population.  
J Immunol. 2006, 176(10):5839-47.
- Than, S., Hu, R., Oyaizu, N., Romano, J., Wang, X., Sheikh, S. Pahwa, S.. Cytokine pattern in relation to disease progression in human immunodeficiency virus-infected children.  
J. Infect. Dis. 1997, 175, 47–56.
- Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity.  
Annu Rev Immunol. 2005, 23:307-36. Review.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production.  
J. Exp. Med. 1998, 188:287-296.
- Tompkins, M. B., P. D. Nelson, R. V. English, and C. Novotney. Early events in the immunopathogenesis of feline retrovirus infections.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 1991, 199:1311–1315.
- Tone M, Tone Y, Adams E, Yates SF, Frewin MR, Cobbold SP, Waldmann H. Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells.  
Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100 15059-64.
- Van Snick, J. and Nordan, R.P. Interleukin-6. In: Habenicht, A., ed. Growth factors, differentiation factors and cytokines.  
Springer Verlag Berlin 1990.
- Van Snick J. Interleukin-6: an overview.  
Annu Rev Immunol. 1990, 8:253-78. Review.

Veronese, F. D., A. L. DeVico, T. D. Copeland, S. Oroszlan, R. C. Gallo, and M. G. Sarngadharan. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV/LAV envelope gene. *Science* 1985, 229:1402–1405.

Weiss L, Donkova-Petrini V, Caccavelli L, Balbo M, Carbonneil C, et al. 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, 104: 3249–3256.

Zheng, S.Z. Josefowicz, A. Kas, T.T. Chu, M.A. Gavin and A.Y. Rudensky, Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 2007, 445 (7130) pp. 936–940.

## Danksagung

---

### **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Reinhard Kurth und Herrn Dr. Denner für die Bereitstellung des interessanten Themas der Diplomarbeit und der freundlichen Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Weiterhin möchte ich mich vor allem bei Herrn Dr. Denner für die ausgezeichnete Betreuung und die interessanten Diskussionen bedanken.

Ich danke Prof. Dr. Mutzel für die Bereitschaft, als Gutachter dieser Arbeit tätig zu sein.

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

Ich danke der Arbeitsgruppe P13 des Robert Koch-Instituts, Martina Lau, Christa-Maria Schmidt, Kerstin Petsch, Debora Mihica, der PERV-Gruppe, Hyunmi Ryu und Michael Lauck.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und allen die mich während dieser Zeit unterstützt haben.