

## **Biologie**

# Immunsuppressive Eigenschaften transmembraner Hüllproteine von Retroviren

## **Diplomarbeit**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Diplom Biologe  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von

Rayk Behrendt  
(Matrikel: 525100)

Berlin, Juli 2005

**Abkürzungsverzeichnis**

ad	addieren auf ein Gesamtvolumen von
AIDS	acquired immune deficiency syndrom
AITR	humaner GITR
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
CBP	Calmodulin-Bindeprotein
CCR	Chemokinrezeptoren für CC-Chemokine (Chemokingruppe mit zwei aufeinanderfolgenden Cysteinen)
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHR	C-terminale Helixregion
Ct	threshold cycle=der Reaktionszyklus einer Realtime-PCR in dem das Fluorezenssignal die Signifikanzgrenze übersteigt
CTL	Cytotoxische T-Zellen
CXCR	Chemokinrezeptoren für CXC-Chemokine (Chemokingruppe bei der zwei aufeinanderfolgende Cysteine durch eine Aminosäure getrennt sind)
Cys	Cystein
d.h.	das heißt
DAB	3, 3´-Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle
ddH <sub>2</sub> O	Aqua bidest
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
E1	Epitopregion 1 im N-terminalen Bereich der HIV-1 gp41 [Fiebig et al.,2003]
E2	Epitopregion 2 im C-terminalen Bereich der HIV-1 gp41 [Fiebig et al.,2003]
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Env	envelope protein, Hüllprotein
Fab	fragment antigen binding, Antigenbindendes Fragment von Immunglobulinen
FeLV	feline leukemia virus, Katzen-Leukämie-Virus
FeLV	Felines endogenens Retrovirus
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FIV	feline immune deficiency virus, Katzen-Immundefizienz-Virus
FKS	fötales Kälberserum
FP	Fusionspeptid
Gag	group specific antigen, Gruppenspezifisches Antigen
GITR	Glucocorticoid Induced Tumornecrosisfactor Receptor
gp	Glykoprotein
HAART	highly active anti retroviral therapy, Hochaktive antiretrovirale Therapie
HAT	Hypoxanthin, Azaserin, Thymidin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HEPS	Hochgradig HIV-exponierte seronegative Personen
HERV-K	Humanes endogenes Retrovirus-K
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
HTLV	human T cell leukemia virus, humane T-Zell-Leukämie-Virus
IFN	Interferon

---

Ig	Immunglobulin
IN	Integrase
IR	Infrarot
ISU	immunsuppressiv
kB	Kilo-Base
kD	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KLH	Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin)
KoRV	Koala-Retrovirus
Kü	Kulturüberstand
LTR	long terminal repeat
M	molar
MCS	multiple cloning site
MES	Morpholinoethanosulfonsäure
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
Mio	Millionen
ml	Milliliter
Mrd	Milliarden
mRNA	messenger RNA
MuLV	murines Leukämievirus
Nef	negativer Faktor
ng	Nanogramm
NHR	N-terminale Helixregion
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NIH	National Institute of Health
OPD	o-Phenylendiamin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAK	Primärantikörper
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PERV	Porzines endogenes Retrovirus
pg	Picogramm
PHI	Primäre HIV-Infektion
POD	Meerrettichperoxidase
Pol	Polymerase
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	(engl. rotations per minute) Umdrehungen pro Minute
RPMI1640	Zellkulturmedium für Säugerzellen (RPMI = Roswell Park Memorial Institut)
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
sAK	Sekundärantikörper
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SIV	simian immune deficiency virus, Affen-Immundefizienz-Virus
Tat	Transaktivator
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-tetra-Methylethylendiamin
TM	Transmembranes Hüllprotein
TMB	tetra-Methylbenzidin
Tris	tris(Hydroxymethyl-)aminomethan
ÜN	über Nacht
UNAIDS	United Nations Department of AIDS
Vif	virion infectivity factor

---

v/v	Volumen anteilig vom Gesamtvolumen
w/v	Masse anteilig am Gesamtvolumen
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

**Einbuchstabencode der häufigsten Aminosäuren in Proteinen**

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

Die Basen der Nukleinsäuren:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

## Inhaltsverzeichnis

### 1. Einleitung

<b>1.1</b>	<b>Viren</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Aufbau.....	1
1.1.2	Genome.....	1
1.1.3	Klassifizierung.....	2
1.1.4	Infektionszyklus.....	2
<b>1.2</b>	<b>Retroviren</b> .....	<b>4</b>
1.2.1	Einteilung der Retroviren.....	4
1.2.2	Aufbau der Viruspartikel.....	5
1.2.3	Genomstruktur.....	5
1.2.4	Virusproteine.....	7
<b>1.3</b>	<b>Immunantwort</b>	
1.3.1	Überblick humanes Immunsystem.....	11
1.3.2	Neutralisierende Antikörper gegen Env von HIV.....	12
1.3.3	Humane CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorische T-Zellen.....	16
1.3.4	Retrovirus induzierte Immunsuppression.....	18
1.3.5	Immunsuppressive (ISU-)Domäne.....	19
1.3.6	Cytokinmodulation durch TM-Proteine und ISU-Peptide.....	20
<b>1.4</b>	<b>Zielstellung</b> .....	<b>22</b>

### 2. Material und Methoden

<b>2.1</b>	<b>Material</b>	
2.1.1	Antikörper.....	23
2.1.2	Chemikalien.....	23
2.1.3	Kommerzielle Kits.....	24
2.1.4	Geräte.....	24
2.1.5	Bakterien.....	25
2.1.6	Vektoren.....	25
2.1.7	Datenbanken und Software.....	26
2.1.8	Primer & Sonden.....	27
2.1.9	Peptide.....	28
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	
<b>2.2.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	30
2.2.1.3	Gel-Extraktion.....	31
2.2.1.4	Restriktionsverdau.....	31

2.2.1.5	Ligation.....	32
2.2.1.6	Herstellen kompetenter Bakterien.....	32
2.2.1.7	Transformation.....	33
2.2.1.8	Plasmid-Präparation.....	33
2.2.1.9	Sequenzierung.....	34
2.2.1.10	Proteinexpression in Bakterien.....	34
2.2.1.11	Isolation von Nukleinsäuren aus eukaryontischen Zellen.....	34
2.2.1.12	Reinigen von DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion.....	35
2.2.1.13	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren.....	35
2.2.1.14	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	35
2.2.1.15	Reverse Transkription.....	36
<b>2.2.2</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	
2.2.2.1	Kopplung von Peptiden.....	36
2.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	37
2.2.2.3	Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
2.2.2.4	ECL-Entwicklung.....	38
2.2.2.5	CBP-Affinitätschromatographie.....	39
2.2.2.6	Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose.....	40
2.2.2.7	Molekulargewichtsausschluss-Zentrifugation.....	41
<b>2.2.3</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	
2.2.3.1	Enzym Linked Immunosorbend Assay (ELISA).....	41
2.2.3.2	IL-10-Cytokin-ELISA .....	41
2.2.3.3	Analyse am Durchflusscytometer.....	42
2.2.3.4	Epitop-Kartierung.....	42
2.2.3.5	Western-Blot.....	43
<b>2.2.4</b>	<b>Virologische Techniken</b>	
2.2.4.1	<i>in vitro</i> -Neutralisationstest.....	44
<b>2.2.5</b>	<b>Zellkulturtechniken</b>	
2.2.5.1	FEA-Zellen.....	46
2.2.5.2	C8166-Zellen.....	47
2.2.5.3	293-Zellen.....	47
2.2.5.4	Drosophila Schneider 2 (S2) Zellen.....	48
2.2.5.5	Isolation humaner PBMCs.....	49
<b>2.2.6</b>	<b>Immunsierungen</b>	
2.2.6.1	Versuchstiere.....	50
2.2.6.2	Immunsierung.....	50
2.2.6.2	Gewinnung von Seren aus Rattenblut.....	50

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
<b>3.1</b>	<b>Modulation der Immunantwort durch Peptidhomopolymere und rekombinante transmembrane Hüllproteine von Retroviren <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>.....</b>	<b>51</b>
3.1.1	Einfluss von Peptid-Homopolymeren und rekombinanten transmembranen Hüllproteinen auf die IL-10-Produktion humaner PBMCs <i>in vitro</i> .....	<b>51</b>
3.1.1.1	Herstellung der HIV-ISU- und HIV-RAN-Homopolymere.....	<b>51</b>
3.1.1.2	Einfluss der HIV-ISU- und HIV-RAN-Homopolymere auf die IL-10-Produktion humaner PBMCs <i>in vitro</i> .....	<b>53</b>
3.1.2	Einfluss rekombinanter transmembraner Hüllproteine von PERV und FeLV-A und der immunsuppressiven Domäne auf die IL-10-Produktion humaner PBMCs <i>in vitro</i> .....	<b>55</b>
3.1.2.1	Klonierung von FeLV- $\Delta$ isu-15E in den <i>Drosophila</i> Expressionsvektor pMT/Bip/V5-HisC.....	<b>56</b>
3.1.2.2	Transfektion, Expression und affinitätschromatographische Reinigung von PERV-p15E und FeLV- $\Delta$ isu-p15E.....	<b>58</b>
3.1.2.3	Analyse der Wirkung von endotoxinfrei exprimiertem PERV-p15E auf die IL-10-Expression humaner PBMCs.....	<b>61</b>
3.1.3	Einfluss rekombinanter transmembraner Hüllproteine von FeLV-A auf die humorale Immunantwort <i>in vivo</i> .....	<b>61</b>
3.1.4	Einfluss rekombinanter transmembraner Hüllproteine von FeLV-A auf die humorale Immunantwort gegen ein nicht verwandtes Antigen <i>in vivo</i> .....	<b>63</b>
<b>3.2</b>	<b>Induktion regulatorischer T-Zellen durch ISU-Peptide von HIV-1 und rekombinantes PERV-p15E <i>in vitro</i>.....</b>	<b>64</b>
3.2.1	Induktion von regulatorischen T-Zellen durch HIV-ISU-Peptid-Homopolymere <i>in vitro</i> .....	<b>65</b>
3.2.2	Induktion von regulatorischen T-Zellen durch rekombinantes PERV-p15E.....	<b>66</b>
3.2.3	Veränderung des Expressionsmusters von FoxP3 durch ISU-Peptid-Homopolymere und rekombinantes, endotoxinfreies PERV-p15E.....	<b>66</b>
<b>3.3</b>	<b>Induktion neutralisierender Antikörper gegen retrovirale transmembrane Hüllproteine.....</b>	<b>69</b>
3.3.1	Induktion neutralisierender Antikörper gegen das FeLV-p15E.....	<b>69</b>
3.3.2	Induktion neutralisierender Antikörper gegen HIV-1 gp41.....	<b>70</b>
3.3.2.1	Generierung rekombinanter KoRV-p15E-Proteine.....	<b>70</b>
3.3.2.2	Induktion neutralisierender Antikörper gegen HIV-1 gp41 durch rekombinante KoRV-p15E-Proteine.....	<b>74</b>

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
<b>4.1</b>	<b>Cytokinmodulation durch transmembrane Hüllproteine und ISU-Peptide</b>	
4.1.1	Reproduzierbarkeit von Kopplungen mit der EDC-Methode.....	<b>78</b>
4.1.2	Monomere vs. Homopolymere: Ist eine Kopplung zu Peptid-Homopolymeren notwendig? .....	<b>79</b>
4.1.3	Funktionalität der Peptid-Homopolymere.....	<b>80</b>
4.1.4	Proteinexpression im Drosophila-Expressions-System als kostengünstige Alternative zum Einsatz von Peptiden.....	<b>82</b>
4.1.5	Hydrophobe Proteine und biologische Testsysteme.....	<b>83</b>
4.1.6	Cytokinmodulation durch rekombinantes PERV-p15E.....	<b>85</b>
4.1.7	<i>in vivo</i> Versuche mit den bakteriell exprimierten Proteinen FeLV-p15E und FeLV- $\Delta$ isu-p15E.....	<b>86</b>
<b>4.2</b>	<b>Induktion CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen durch HIV-ISU-Homopolymere und PERV-p15E</b>	
4.2.1	Veränderungen der Zusammensetzung der Lymphocytenpopulation.....	<b>86</b>
4.2.2.	GITR als Marker für die Aktivierung CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen in der Durchflusscytometrie .....	<b>87</b>
4.2.3	FoxP3 und alternative Marker.....	<b>89</b>
<b>4.3</b>	<b>Induktion neutralisierender Antikörper gegen transmembrane Hüllproteine von Retroviren</b>	
4.3.1	Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von FeLV-A.....	<b>90</b>
4.3.2	Rekombinante p15E/gp41 Konstrukte.....	<b>91</b>
4.3.3	Neutralisierende Antikörper gegen HIV-1 gp41.....	<b>92</b>
4.4	Ausblick.....	<b>94</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	
6.1	Paper.....	<b>96</b>
6.2	Lehrbücher.....	<b>110</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>111</b>
	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>113</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>114</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Viren**

Der Begriff Virus kommt aus dem Lateinischen und bedeutet „Gift“ bzw. „Schleim“. Schon diese gewählte Bezeichnung deutet auf die mitunter lebensbedrohlichen Folgen einer Begegnung von Lebewesen mit diesen Strukturen hin. Tatsächlich handelt es sich bei Viren um infektiöse Partikel mit einer Größe zwischen 16 und 300 nm bestehend aus Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren. Obwohl sie die Strategie der Weitererhaltung ihrer Spezies verfolgen und replizieren können, werden Viren nicht als Lebewesen klassifiziert. Für die Replikationsvorgänge sind sie auf einen Wirtsorganismus angewiesen, da ihnen ein eigener Energiestoffwechsel fehlt und sie nur eine Art von Nukleinsäure im infektiösen Partikel besitzen, entweder RNA oder DNA. Somit wird ihnen eine Sonderstellung in der Natur an der Grenze zwischen der belebten und unbelebten Natur zu Eigen. Sie verbringen ein „geborgtes Leben“, das des Wirtes.

#### **1.1.1 Aufbau**

Wie überall in der Natur ist die strukturelle Diversität auch unter den Viren hoch. Dennoch gibt es grundlegende Ähnlichkeiten zwischen einigen Spezies, welche es ermöglichen, generelle Prinzipien des Partikelbaus darzustellen. Das Minimalvirus besteht aus einem proteinösen Capsid und dem darin eingeschlossenen viralem Genom. Das Capsid besitzt entweder eine helikale Symmetrie oder eine Rotationssymmetrie und ist bei einigen Vertretern noch von einer Lipidmembran umgeben, welche sich von zellulären Membranen ableitet. Wobei es sich hierbei nicht immer um ein Derivat der äußeren Zellmembran handelt.

#### **1.1.2 Genome**

Viren besitzen zwar nur einen Typ von Nukleinsäure im infektiösen Partikel, dafür ist die Ausprägung dieses Merkmals sehr vielseitig. Das Genom kann entweder als DNA oder als RNA vorliegen. Bei den DNA-Viren kann die Erbinformation entweder auf einem Einzelstrang, einem Doppelstrang oder einem teilweise doppelsträngig vorliegendem Genom codiert sein. Zusätzlich kann die DNA in lineare und ringförmige Moleküle unterschieden werden. Bei RNA-Viren ist die Diversität sogar noch größer. Die RNA kann auch hier wieder als Einzel- oder Doppelstrang vorliegen. Die einzelsträngige Form ist entweder positiv oder negativ in Bezug auf die Translationsorientierung angelegt, wobei als positiv die Leserichtung der mRNA definiert wird. Viren mit positiv orientiertem RNA-Genom sind direkt infektiös, da die Erbinformation ohne Zwischenschritt translatiert werden kann. Bei RNA-Viren mit einem negativ orientierten Genom (- RNA-Viren) muß das Genom bevor es translatiert werden kann erst durch eine virale RNA-abhängige RNA-Polymerase in eine mRNA transkribiert werden. In zwei Virusfamilien, den Bunya- und den Arenaviren, findet sich hierbei die Besonderheit, dass das Genom in beide Leserichtungen für virale

Proteine codiert. Diese Art der Verschlüsselung nennt man ambisense. Zusätzlich kann das Genom in bis zu 8 Segmente geteilt sein, welche oftmals im Virion über sequenzkompatible Enden in einer quasizirkulären, pfannenstilartigen Struktur gehalten werden. Trotzdem kann man sagen, dass alle bis heute beschriebenen relevanten RNA-Viren grundsätzlich lineare Nukleinsäurestrukturen aufweisen.

### **1.1.3 Klassifizierung**

Die bereits dargestellten strukturellen Ähnlichkeiten zwischen einigen Viren werden auch zu ihrer Einteilung herangezogen, reichen aber nicht aus, um ein möglichst naturgetreues Abbild der Evolution von Viren zu erstellen. Somit muss man sich weiterer Merkmale bedienen um ein System zu erstellen. Die Festlegung dieser Kriterien erfolgt durch das International Comitee on Taxonomy of Viruses (ICTV). So werden auf die Empfehlung dieses Komitees die Familien aufgrund der Einzigartigkeit einer Kombination aus Genommerkmalen, Symmetrieform des Capsides und des Vorhandenseins einer Lipidmembran unterschieden. Die sehr speziellen serologischen Unterschiede und Sequenzhomologien der Genome dienen zur weiteren Gliederung der Familien in Genera und Spezies.

### **1.1.4 Infektionszyklus**

Da ein Virus nicht autonom in Bezug auf die Replikation ist, muss es eine Strategie verfolgen, die ihm fehlenden Strukturen zu finden und zu nutzen. Da alle Viren obligate Zellparasiten sind, gibt es bestimmte Stadien, die, seien sie auch noch so unterschiedlich, in allen Replikationszyklen vorkommen. Grundsätzlich ähnelt der Ablauf fast einem Algorithmus eines Computerprogramms: Adsorption - Penetration - Realisierung der genetischen Information - automatischer Zusammenbau - Freisetzung. Hierbei gibt es natürliche, virusspezifische Variationen und Zwischenschritte. Der Infektionszyklus des HIV-1 kann in zwei Hauptphasen gegliedert werden, die frühe Phase und die späte Phase (Abbildung 1.1).

Die Adsorption erfolgt durch bestimmte Oberflächenproteine auf der exponierten Struktur des Virus an einen Hauptrezeptor und Corezeptoren auf der Zelloberfläche. Die Kombination und das Vorhandensein bestimmter Rezeptoren sind spezifische Marker für den Tropismus eines Virus. Beim folgenden Prozess, der Penetration, gibt es verschiedene Möglichkeiten des Ablaufs: Sie kann als Verschmelzung der viralen mit der zellulären Membran ablaufen oder als rezeptorvermittelte Endocytose. Im Ergebnis liegt das Virus in der Zelle vor. Werden Viren via rezeptorvermittelter Endocytose aufgenommen, müssen die sich aus dem Endosomen befreien, um dem proteolytischen Abbau zu entgehen. Dieser Prozess geht einher mit einer Ansäuerung des Endosoms, dem sogenannten „pH-downshift“ und der sich dadurch einstellenden Desintegration der Endosomenmembran. Das nun im sauren Cytoplasma vorliegende Capsid durchläuft den als „uncoating“ bezeichneten Prozess, welcher die Freisetzung des Capsidinhaltes bewirkt. Das virale Genom wird nun entweder in den Zellkern transportiert oder direkt im Cytoplasma transkribiert. Die Festlegung dieses Ortes erfolgt aufgrund der Orientierung des Genoms der Viren und deren Ausstattung mit Proteinen des Replikationsapparates.



längere Zeit zur eigenen Replikation nutzen. Der Abschluss eines Replikationszyklus variiert zeitlich stark zwischen den Viren. Rotaviren und Influenzaviren replizieren innerhalb von Stunden und überfluten den Wirtsorganismus mit neuen Virionen, wohingegen z.B. Herpesviren wie das Humane Herpesvirus 1 oder Retroviren wie HIV entweder latent oder persistent die Wirtszelle infizieren. Das bedeutet, dass sie zwar ständig replizieren, dass aber nur in geringem Maße. Dadurch ist es dem Immunsystem möglich die Infektion zu kontrollieren. Ein Ausbruch assoziierter Symptome ist unter Umständen erst Jahre nach der Primärinfektion festzustellen.

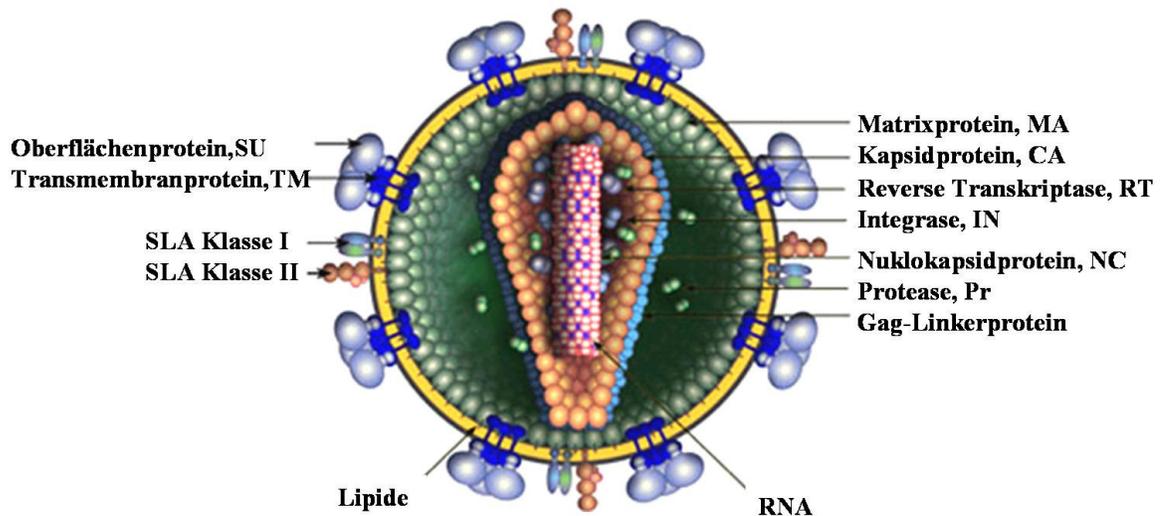
## **1.2 Retroviren**

Ellermann und Bang beschrieben 1908 zum ersten Mal die Übertragung der Mäuseleukämie durch Ultrafiltrate. Viel bekannter wurde aber das von Rous 1911 beschriebene Retrovirus, welches er in Sarkomextrakten erkrankter Hühner nachwies, indem er mittels ultrafiltrierter Extrakte das Sarkom auch auf gesunde Hühner übertragen konnte. Das war die erste Induktion eines Bindegewebstumors mittels Ultrafiltraten, was 1966 mit dem Nobelpreis für Medizin für Peyton Rous und der Verleihung des Namens Rous-Sarkom-Virus für das isolierte Virus gewürdigt wurde. Bis heute sind viele weitere Retroviren beschrieben worden. Sie alle zeichnen sich durch zwei grundlegende, ihnen eigene Merkmale aus: Die Transmission kann außer auf dem exogenen Weg (horizontal) auch endogen erfolgen (vertikal). Alle Retroviren besitzen eine Reverse Transkriptase, deren Aktivität sich auch im Namen dieser Familie widerspiegelt. Sie durchbricht das genetische Dogma DNA zu RNA zu Protein, indem sie die virale RNA in DNA umschreibt, den Pfad des genetischen Dogmas quasi zurückgeht - „Retrovirus“.

### **1.2.1 Einteilung der Retroviren**

Retroviren bilden aufgrund des relativ hohen Alters dieser Familie eine sehr komplexe Familie der Viren. Sie unterteilt sich in die sieben Genera  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Retroviren sowie die Lenti- und Spumaviren. Die Einteilung beruht nicht nur auf den bereits vorher erwähnten taxonomischen Kriterien zur Differenzierung von Viren, sondern auch auf den unterschiedlichen klinischen Symptomen, die eine Infektion mit dem jeweiligen Genus charakterisiert. Von Bedeutung sind dabei heute hauptsächlich die Vertreter, deren Infektion mit einer Immundefizienz, einer Tumorerkrankung oder einem neurologischen Effekt korreliert. Eine weitere wichtige Einteilung innerhalb der Retroviren ist die zwischen endogenen und exogenen Retroviren, welche auf der Restriktion der Transmissionsmöglichkeiten beruht. Endogene Retroviren werden horizontal und vertikal, also über die Keimbahn übertragen, während exogene Retroviren auf den horizontalen Infektionsweg beschränkt sind. Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist ein exogenes Retrovirus, während es sich bei dem Koala Retrovirus (KoRV) und dem porzinen endogenem Retrovirus (PERV) um endogene Retroviren handelt. Das feline Leukämievirus (FeLV) kann sowohl auf dem endogenen, als auch auf dem exogenen Weg übertragen werden.

### 1.2.2 Aufbau der Viruspartikel



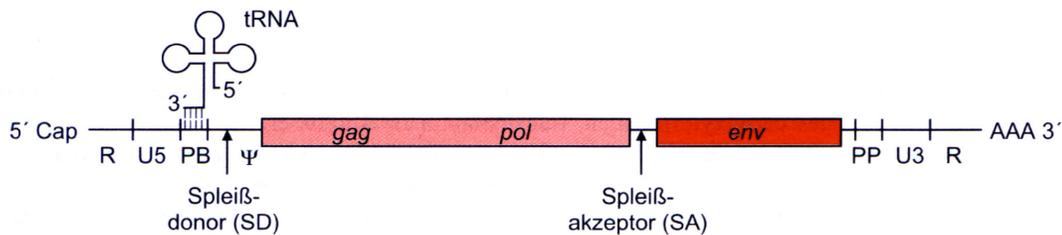
**Abbildung 1.2 : Schematischer Aufbau des Humanen-Immundefizienz-Virus**

modifiziert nach: <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/STRUCTURE/INDEX.HTML>

Das infektiöse Partikel hat eine Größe von ca. 100nm und ist von einer Lipidmembran umhüllt die sich von der Zellmembran der Wirtszelle ableitet. In diese Membran eingelagert befindet sich das homotrimere transmembrane Hüllprotein an dessen Ectodomäne nichtkovalent das ebenfalls homotrimere externe Glycoprotein assoziiert ist. Bei den Gammaretroviren FeLV-A, PERV und KoRV wird das transmembrane Hüllprotein und das externe Glycoprotein aufgrund des Molekulargewichts als p15E und gp70 bezeichnet. Beim Lentivirus HIV-1 handelt es sich hierbei um das gp41 und das gp120. Die virale Hüllmembran wird von dem Matrixprotein ausgekleidet. Bei HIV wurde ein Link-Protein identifiziert, welches das virale Capsid mit dem Matrixprotein assoziiert. Dieser auch als Core bezeichnete Bestandteil baut sich aus dem Capsidprotein auf. Darin eingeschlossen werden während der Morphogenese der infektiösen Virionen die virale Protease, der reverse Transkriptase-Komplex und die Integrase. Das Vorhandensein dieser Enzyme ist essentiell für die ersten Schritte des Replikationszyklus der Retroviren. Außerdem befinden sich zwei identische Kopien der viralen Erbinformation im Capsid. Sie sind mit vielen Kopien eines Proteins assoziiert und formen das Nucleocapsid.

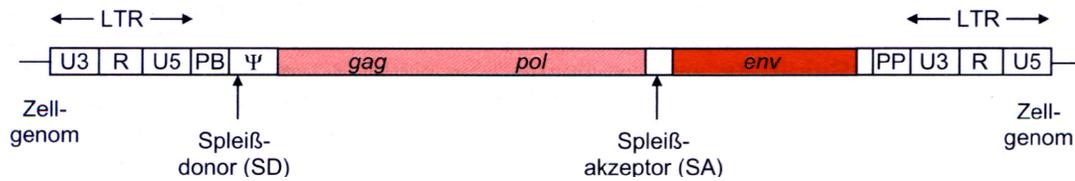
### 1.2.3 Genomstruktur

Retroviren verschlüsseln ihre genetische Information im Virion in Form von RNA. Im Capsid befinden sich zwei im Rahmen der Transkriptionsgenauigkeit der RNA-Polymerase identische RNA-Moleküle. Die Länge variiert innerhalb der Familie von 7000 bp bis 12000 bp. Das Lentivirus HIV-1 zählt zu den Retroviren mit dem längsten Genom. Es umfasst ca. 9181 Basenpaare.



**Abbildung 1.3: RNA-Genom eines infektiösen HIV-1 Partikels  
(aus Modrow und Falke, 2.Auflage, Seite 395, 2003)**

Die RNA ist am 5'-Ende mit einer Cap-Struktur und am 3'-Ende mit einem poly-A-Schwanz versehen (Abbildung 1.3). Auf dem Genom lassen sich verschiedene funktionelle und codierende Bereiche definieren. Es gibt drei Regionen, in welchen die Hauptbestandteile der Virionen codiert sind. Sie werden von 5' nach 3' als *gag/pol* und *env* bezeichnet. *Gag* und *pol* codieren in unterschiedlichen Leserahmen und ihre Genprodukte werden von der selben monocistronischen mRNA translatiert. *Gag* codiert für die Gruppenspezifischen Antigene wie das Matrixprotein (MA), das Capsidprotein (CA), das Nucleocapsidprotein (NC) und, sofern vorhanden das Link-Protein (Li). Durch den *pol*-Bereich werden die Enzyme Integrase, reverse Transkriptase und virale Protease verschlüsselt. Letzterer Bereich wird auch als *pro*-Bereich von dem *pol*-Genlocus abgegrenzt um der Bedeutung der viralen Protease für die Replikation somit auch auf dieser Ebene Ausdruck zu verleihen. Die *gag*- und *gag/pol*-Genprodukte werden als Polyproteine synthetisiert und müssen um ihre Funktionalität zu erlangen durch die virale Protease in ihre biologisch aktiven Einheiten gespalten werden. Das *env*-Genprodukt wird ebenfalls als Polyprotein synthetisiert. Dieses wird aber durch eine zelluläre Furin-Protease in das transmembrane Hüllprotein und das externe Glycoprotein prozessiert. Zusätzlich zu den Strukturgenen, gibt es genusspezifische regulatorische Sequenzen oder akzessorische Elemente. Sie sind für den Replikationszyklus essentiell und werden von mehrfach gespleißten mRNA-Spezies translatiert. Flankiert werden die strukturgenenthaltenden Regionen von den beim Provirus als Long Terminal Repeats (LTR) bezeichnete Bereiche. Diese Bereiche lassen sich in funktionelle Subklassen einteilen. Ausgehend von den Strukturgenen findet man weiter fortschreitend in Richtung 5'-Terminus die Bereiche  $\psi$  (psi) in der Leader Sequenz, Primer Bindestelle (PB), U5-Region und Redundant (R). Beim Provirus schließt sich eine weitere U3-Region an. In gleicher Weise kann man die LTR des 3'-Terminus unterteilen. Es folgen Polypurintrakt (PP), U3-Region, Redundant (R) und beim Provirus noch die U5-Region aufeinander. Die Funktionen dieser Bereiche finden sich hauptsächlich während der Integration in das Wirtsgenom (U5, U3), der reversen Transkription (PB, PP), der Interaktion des Genoms mit des Nucleocapsidproteinen ( $\psi$ ) und der Aktivierung und Transkription des Provirus (U3) (Abbildung 1.4).



**Abbildung 1.4: Provirus eines infektiösen HIV-1 Partikels**  
(aus Modrow und Falke, 2.Auflage, Seite 395, 2003)

### 1.2.4 Virusproteine

#### Gag/Pol - Proteine

Der Bereich, welcher die meisten viralen Proteine codiert ist *gag*. Hier finden sich die vier bereits namentlich erwähnten Strukturproteine MA, CA, NC und LI mit einer Größe zwischen 6 und 30 kD. Retroviren sind zwar nicht so autonom in Bezug auf den Replikationsapparat, wie z.B. die Pockenviren, bringen aber auch eine Vielzahl von viralen Enzymen mit dem Capsid in die Wirtszelle. Sie werden im *pol*-Bereich codiert. Die aktive virale Protease kommt als Dimer vor. Ihre Bedeutung wurde bereits im vorigen Abschnitt näher beschrieben. Die Integrase besitzt eine Endonuclease- und eine Ligase-Funktion. Der Reverse-Transkriptase-Komplex erfüllt während der Virusreplikation verschiedene Funktionen. Er besitzt die namensgebende  $Mg^{2+}$ - oder  $Mn^{2+}$ -abhängige reverse Transkriptase-Aktivität, eine RNaseH-Aktivität und zusätzlich zur RNA-abhängigen auch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität. Im Vergleich zur zellulären DNA-abhängigen DNA-Polymerase hat das virale Enzym RNA-abhängige DNA-Polymerase, die reverse Transkriptase (RT), eine hohe Fehlerrate. Sie liegt bei einem Fehler alle  $10^3$ - $10^4$  Basen, während zelluläre Polymerasen zum Beispiel nur eine Fehlsynthese mit dem Faktor  $10^{-9}$  begehen. Hier findet sich eine Ursache, warum Retroviren auf Selektionsdruck so schnell reagieren können. Bei immunologischem Druck durch den Wirt treten schneller Fluchtmutanten in ihrer Quasispezies auf als bei Viren, welche komplett auf den Replikationsapparat des Wirtes angewiesen sind. Die sich daraus ergebende strukturelle Variabilität ist eins der Hauptprobleme bei der Bekämpfung von HIV.

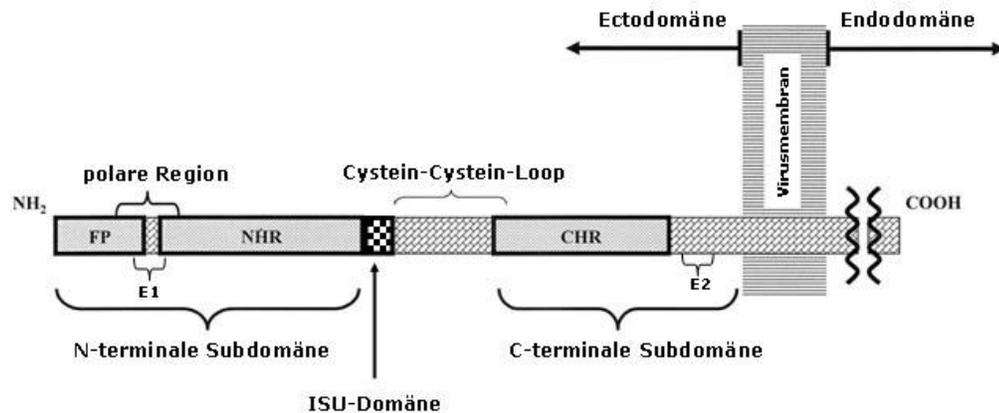
Die Essentialität dieser Proteine macht sie zu einem perfekten Ziel, wenn es darum geht, eine virale Infektion mit diesen Viren zu kontrollieren. Es wurden bereits Hemmer der viralen Protease, der reversen Transkriptase und Fusionshemmer entwickelt um eine antiretrovirale Therapie bei HIV positiven Patienten durchführen zu können. Es gibt RT-Hemmer die auf Nukleosid-Analoga basieren (Nukleosid Reverse Transkriptase Inhibitoren = NRTI) und RT-Hemmer, die nicht auf Nukleosid-Strukturen basieren (nicht nukleosid Reverse Transkriptase Inhibitoren = NNRTI). Bei den meisten HAART (highly active antiretroviral therapy) werden diese in Kombination eingesetzt.

## Env-Proteine

Andere Angriffspunkte für eine Therapie sind die Oberflächenstrukturen der Viren. Bei Retroviren sind es das externe Glycoprotein und das transmembrane Hüllprotein. Auf die immunologischen Eigenschaften dieser Proteine wird gesondert eingegangen (Abschnitt 1.3.2). Das externe Glycoprotein gp120 des HIV-1 verdeckt beim infektiösen Partikel das transmembrane Hüllprotein gp41. Es ist für die Adhäsion des Virus an den Hauptrezeptor CD4 und die Chemokin-Corezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 zuständig [Feng et al., 1996; Alkhatib et al., 1996; Simmons et al., 1996]. Das gp120 lässt sich in eine innere und eine äußere Domäne gliedern. Die äußere Domäne weist jeweils 5 verschiedene Bereiche auf, welche als c-(constant) und v-(variabel) Regionen bezeichnet werden. Die C3-Region des gp120 stellt die CD4-Rezeptorbindestelle dar. Die hoch immunogenen und exponierten Regionen dieses Proteins sind die V-Domänen, hierbei insbesondere die V3-Region [Hwang et al., 1991]. Sie wird als Loop durch eine Disulfidbrücke vom zentralen Teil des Proteins abgegrenzt und definiert über die Aminosäuresequenz, welchen Corezeptor das Virus bindet [Hartley et al., 2005]. CCR5-trophe Viren können Macrophagen infizieren und stellen somit die frühen Populationen einer Infektion dar, da das Virus hauptsächlich sexuell übertragen wird und somit zu erst mit der Schleimhaut des neuen Wirtes in Kontakt gerät [Levy et al., 1989]. Im Verlauf der Infektion breitet es sich über die Blutbahn aus und es etablieren sich durch Mutationen im V3 Bereich die CXCR4-tropen Viren, welche dann die CD4<sup>+</sup>-T-Lymphocyten befallen [Weber et al., 2001].

Im V3-Zentrum befindet sich eine  $\beta$ -Schleife, welche durch die für diese Strukturen sterisch definierte, hochkonservierte Aminosäurefolge Glycin-Prolin-Glycin definiert wird. Um diesen Bereich herum ist V3 extrem variabel. Diese stark exponierte Region induziert hauptsächlich neutralisierende Antikörper und unterliegt somit dem größten Selektionsdruck [Evans et al., 2001]. Zusammen mit der hohen Fehlerrate der viralen Enzyme der Transkription führen diese Faktoren zu den bereits erwähnten Fluchtmutanten und Antikörper gegen gp120 sind häufig nur in der Lage eine Subpopulation zu neutralisieren. Glycosylierungen an den 28 potentiell identifizierten Stellen machen knapp 50% des Gesamtgewichts des Proteins aus. Auch sie spielen eine Rolle bei der Induktion von neutralisierenden Antikörpern und der Etablierung von Fluchtmutanten [Leonard et al., 1990].

Der Aufbau des HIV-1 gp41 stellt sich anders dar. Grundsätzlich gliedert man die TM-Proteine in Endodomäne und Ectodomäne, welche durch den Transmembranbereich voneinander getrennt werden (Abbildung 1.5). Sie ähneln im Aufbau Transmembranproteinen anderer Virusfamilien (zum Beispiel Hämagglutinin 2 von Influenza und Masern) [Gallaher et al., 1989; Benit et al., 2001]. Funktionell wichtig ist die N-terminal gelegene 175 AS große Ectodomäne. Sie wird vom N-Terminus zum C-Terminus in Fusionspeptid, N-terminale Helixregion (NHR) mit immunsuppressiver (ISU-) Domäne [Denner et al., 1994], immundominante Schleife (oder Cystein-Loop), C-terminale Helixregion (CHR) und tryptophanreichen Abschnitt gegliedert. Die letzten 20-30 Aminosäuren des N-Terminus bilden das Fusionspeptid, welches als hydrophober Anker in die Wirtszellmembran eindringt [Freed et al., 1990; Pereira et al., 1997].

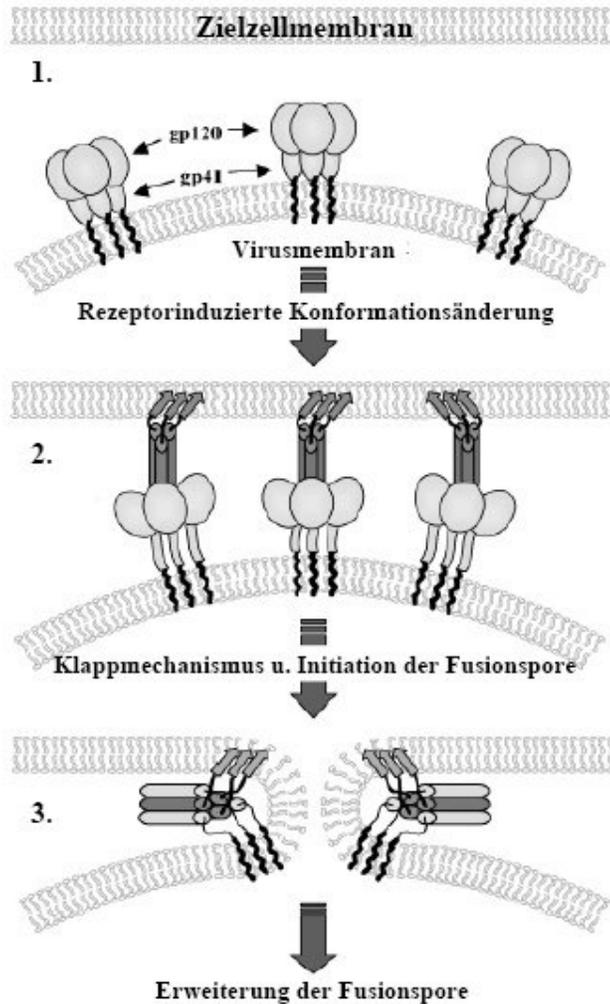


**Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau der Ectodomäne des gp41 von HIV-1**

FP – Fusionspeptid, NHR – N-terminale Helixregion, CHR – C-terminale Helixregion; ISU-Domäne – immunsuppressive Domäne; E1 und E2 – Epitopbereiche nach Fiebig et al. [2003] (modifiziert, Schnaper et al., 2001)

Im membranproximalen Bereich findet sich eine tryptophanreiche,  $\alpha$ -helicale Region. Sie interagiert mit der Hüllmembran des Virus und stabilisiert den Membrandurchgang [Schibli et al., 2001]. 1999 konnte die Essentialität dieses Bereiches für die Infektiosität von HIV-1 beschrieben werden [Salzwedel et al., 1999]. Der cytoplasmatische Teil des HIV-1 gp41 enthält zwei amphiphatische Helices und ein proximal zur Virusmembraninnenseite gelegenes konserviertes Endocytosesignal (AS 721-724 des HIV-1 IIIB Referenzgenoms). Die Endocytose dieses Moleküls verringert wahrscheinlich die Immunogenität infizierter Zellen [Hunter et al., 1997].

Die durch die Rezeptor und Corezeptorbindung des gp120 induzierten Konformationsänderungen im gp41 bewirken zum einen die Dissoziation des gp120 vom gp41 (*shedding*) und das Eindringen des hydrophoben Fusionspeptides in die Wirtszellmembran. Die Konformation des Proteins wird im Hinblick auf die folgenden intramolekularen Umlagerungen als Prä-*Hairpin*-Struktur bezeichnet [Jones et al., 1998; Kwong et al., 2000; Finnegan et al., 2002]. Das als Homotrimer vorliegende Protein bildet eine proteaseunempfindliche, kompakte, entropisch günstige Sechshelix-Konformation. In dieser Ausrichtung lagern sich drei N-terminalen Helices zu einer *Coiled-Coil*-Struktur zusammen. Diese wird durch hydrophobe Wechselwirkungen verschiedener konservierter Aminosäuren in der Helix stabilisiert [Weissenhorn et al., 1997]. Je zwei Helices der NHR bilden an ihren Kontaktstellen eine außen verlaufende Furche. Darin lagern sich die CHR antiparallel ein. Es bildet sich eine Schleife zwischen den beiden Helices, welche durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird. Dieser Bereich interagiert im Membran-Modellsystem mit der Lipidphase und wird von den meisten Seren HIV-1-Infizierter erkannt. Er wird deshalb als „immundominante Schleife“ bezeichnet [Santos et al., 1998].



**Abbildung 1.6: HIV-1 gp41 vermittelter Fusionsvorgang und Klappmechanismus zur Porenbildung [Sackett et al., 2003]**

1. Native Konformation der Oberflächenproteine gp120 und der TM-Proteine gp41

2. Prä-Hairpin-Struktur: Das Eindringen des N-terminalen Fusionspeptides (grauer Pfeil) von gp41 in die Zielzellmembran wird durch dessen Freilegung nach der Bindung von gp120 an den Hauptrezeptor CD4 und den Corezeptor induziert.

3. Klappmechanismus: Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den NHR (dunkelgrau) und CHR (hellgrau) bewirken eine Annäherung von Virusmembran und Zielzellmembran. Es kommt zur Ausbildung der Fusionspore. Nach erfolgreicher Fusion liegt das gp41 als Sechshelices-Bündel auf der Zielzellmembran vor.

Durch die hydrophoben Wechselwirkungen der NHR-Taschen und der CHR-Regionen klappt die lineare Struktur des Proteins zusammen. Der Abstand zwischen Virusmembran und Wirtszellmembran wird verringert (Abbildung 1.6.). Es kommt zur Bildung einer Fusionspore. Das gp41 liegt nach der Fusion, wie oben beschrieben, als Sechshelices-Bündel (Six-Helix-Bundle) auf der Wirtszellmembran vor [Chan et al., 1997; Weissenhorn et al., 1997, Sackett et al., 2003]. Ein ähnlicher Mechanismus wird auch für andere umhüllte Viren, wie zum Beispiel Corona-, Influenza- und Ebolaviren postuliert [Wilson et al., 1981; Kliger et al., 2003].

Untersuchungen mit Fusionshemmern haben gezeigt, dass der gesamte Fusionsprozess von SIV gp41 bei 37°C 19 Minuten dauert [Raviv et al., 2002]. Bereits vorher konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine für Fusionshemmer zugängliche Konformation erst nach der CD4-Bindung entsteht [Furuta et al., 1998]. Trotz der vielen Untersuchungen bleibt der Fusionsprozess weitergehend unverstanden. Eine mögliche Theorie bietet das von Gallo et al. [2003] postulierte „Stalk-Pore“ Paradigma. Es geht davon aus, dass als erstes die *cis*-Monolayer der Lipidmembranen verschmelzen, während die *trans*-Monolayer intakt bleiben. Diese Struktur wird als Hemifusions-Diaphragma bezeichnet. Die vollständige Fusionspore bildet sich durch den Bruch der *trans*-Monolayer aus. Die hierfür benötigte Energie zur Öffnung der

Membranpore kommt aus den Umlagerungsprozessen des gp120 und wird vorher in der veränderten Struktur des gp41 gespeichert [Gallo et al., 2003].

Eine immunmodulatorische Eigenschaft dieser Proteine geht von einer konservierten Sequenz aus, die zwischen der NHR-Domäne und dem Cytein-Loop liegt. Speziell dieser Region konnte man immunsuppressive Eigenschaften nachweisen [Denner et al., 1994] und bezeichnet sie deshalb auch als immunsuppressive-Domäne (ISU-Domäne). Auf die Wirkung dieser Domäne während der Persistenz und Latenz der Viren im Wirt wird gesondert eingegangen.

## **1.3 Immunantwort**

### **1.3.1 Überblick humanes Immunsystem**

Jede Sekunde hat sich der Körper des Menschen mit ihm fremden Organismen und Strukturen auseinander zu setzen. Dabei muss er stets die Balance zwischen einer akkuraten Abwehr und der Toleranz von Antigenen bewahren. Zur Abwehr von als fremd erkannten Agenzien stehen dem menschlichen Organismus zwei Systeme zur Verfügung, die wenn sie richtig reguliert sind eine normale Funktion des Körpers ermöglichen.

Zum einen ist das die als unspezifische, nichtadaptive Immunreaktion bezeichnete Antwort auf Fremdanigene. Sie wird auch als angeborene Immunität bezeichnet und wird erst aktiv, nachdem zum Beispiel ein Virus bereits in den Organismus eingedrungen ist. Die aktiven zellulären Faktoren dieser Komponente sind die Makrophagen, die Natürlichen Killerzellen (NK), die Dendritischen Zellen (DC) und die Mono- und Granulozyten. Weitere nichtzelluläre Bestandteile sind die Akutphaseproteine, das Komplementsystem sowie die Cytokine und Interferone. Das Komplementsystem ist eine Enzymkaskade aus verschiedenen proteolytischen Spaltungen von immunologisch aktiven Faktoren in deren Ergebnis z.B. eine infizierte Zelle als solche markiert, opsoniert und letztendlich durch Makrophagen, Mono- und Granulozyten durch Phagozytose zerstört wird. Auf die Funktion von Cytokinen wird in Abschnitt 1.3.6 gesondert eingegangen.

Die zweite große Gruppe zur Abwehr von Fremdem ist die adaptive Immunantwort. Sie wirkt spezifisch gegen einen Infekt, was wiederum bedeutet, dass sie erst aktiv werden kann, wenn z.B. ein Bakterium oder ein Virus sich bereits im Wirt etabliert. Die Ausprägung dieser Immunantwort bedarf im Schnitt 10-14 Tage und bietet Erregern mit einer kurzen Inkubationszeit bei Erstkontakt die Möglichkeit den Wirt schwer zu schädigen, sofern die Abwehrmechanismen der unspezifischen Immunantwort umgangen werden können. Der Grund für diese Latenz der Adaptation liegt in dem Prozess der durchlaufen werden muss, um diese Immunität voll auszuprägen. Hauptsächlich beteiligt an diesem Mechanismus sind zum einen die antikörperproduzierenden B-Zellen. Sie sezernieren nach Kontakt mit Fremdanigen spezifische Antikörper und bilden somit das humorale adaptive Immunsystem. Die zellulären Komponenten der adaptiven Immunantwort sind die T-Lymphocyten, welche sich grundsätzlich in die  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen und die  $CD8^+$  cytotoxischen T-Lymphocyten unterscheiden lassen. Die T-Helfer-Zellen übernehmen die Funktion der Antigenpräsentation und binden mit dem  $CD4$ -Protein an MHC-Klasse-II-Antigene,

wohingegen die cytotoxischen T-Lymphocyten über CD8 an MHC-Klasse-I-Antigene binden und die präsentierende Zelle lysieren.

Der Unterschied zwischen den beiden MHC-Antigenklassen liegt in der Herkunft der präsentierten Antigene, welche kurze Peptide sind, und in den Zellen, die diese Komplexe präsentieren. MHC-Klasse-I ist auf allen Zellen vertreten, während MHC-Klasse-II Moleküle nur auf Zellen des Immunsystems zu finden sind. Letzteres Merkmal ist ursächlich im ersten Merkmal begründet. Im Falle von MHC-Klasse-I handelt es sich um Peptide neu synthetisierter Proteine. Die Beladung erfolgt im endoplasmatischen Reticulum und kann somit nur in einer infizierten Zelle erfolgen in welcher gerade Virusreplikation abläuft. Dazu im Stande ist also per se jede Zelle. MHC-Klasse-II Moleküle präsentieren hingegen phagozytierte Peptide und kommen dadurch nur auf Zellen vor, die in der Lage sind phagozytotisch aktiv zu sein. CD8<sup>+</sup> T-Lymphocyten grenzen somit die Ausbreitung einer viralen Infektion durch die Tötung von virusproduzierenden Zellen ein.

CD4<sup>+</sup>-Zellen besitzen neben der antigenpräsentierenden Funktion ebenfalls die Möglichkeit die Aktivität des Immunsystems zu regulieren. Im Zuge des Kontaktes mit Antigenen reifen naive T-Zellen (T<sub>H0</sub>) zu T<sub>H1</sub> oder T<sub>H2</sub> heran und sezernieren spezifische Cytokine. T<sub>H1</sub>-Zellen stimulieren die Proliferation von T-Helfer-Zellen, cytotoxischen T-Zellen und Makrophagen, wohingegen T<sub>H2</sub>-Zellen die Prä-B-Zelle zur Proliferation und Reifung zu Plasmazellen anregen. Sie sind also die wichtigen Zellen, welche zum großen Teil zu der Eingangs erwähnten Balance der immunologischen Reaktionen beitragen. Umso tragischer ist es, wenn Erreger gerade sie als Wirtszelle benutzen und so ihre Funktion unterbinden, wie es z.B. bei einer Infektion durch das Lentivirus HIV-1 der Fall ist. Die exakte Regulation dieser Vorgänge ist ein Grund für die Latenz von ca. 10 Tagen bis zur Etablierung einer wirksamen Population von spezifischen B- und T-Zellen. Der Vorteil hierbei ist, dass nach dem Erstkontakt und dem Ausprägen dieser Immunantwort einige reife B-Zellen weiterhin im Blut zirkulieren. Sollte nun der gleiche Erreger versuchen, erneut den Organismus zu befallen, läuft der Vorgang schneller ab, da die B-Zelle nicht mehr die klonale Selektion durchlaufen muss und sofort nach Antigenkontakt zu proliferieren beginnt. Der Erreger kann so innerhalb einer kürzeren Zeitspanne bekämpft werden. Man bezeichnet das auch als das für Vertebraten charakteristische „Immunologische Gedächtnis“.

### **1.3.2 Neutralisierende Antikörper gegen Env von HIV**

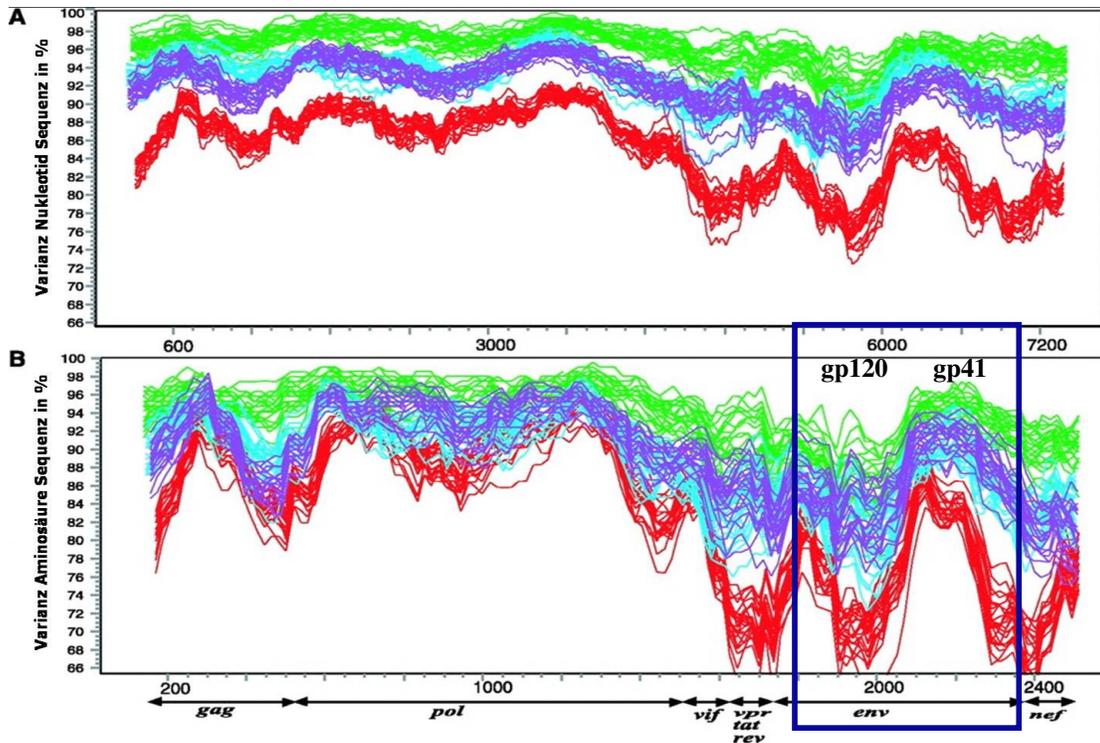
Die humorale Komponente der adaptiven Immunantwort ist ein unverzichtbarer Bestandteil zur Kontrolle von Infektionen. Sie werden generell in die Klassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM nach Funktion, Vorkommen und Struktur unterteilt. Trotz intensiver Forschung während der letzten 20 Jahre, ist es nicht gelungen eine HIV-Vakzine zu entwickeln, die einen Schutz durch die Induktion neutralisierender Antikörper bewirkt. Grundlage dieser Idee ist der Befund, dass hohe Titer neutralisierender Antikörper im Serum Infizierter die HIV-Pathogenese verzögern [Reitz et al., 1988; Watkins et al. 1996; Poignard et al., 1999; Dianzani et al., 2002]. Bei einer HIV-Infektion zeigt sich deutlich, dass sich viele neutralisierende Antikörper bilden, deren Neutralisationsspektrum aber auf eine oder wenige Quasispezies

begrenzt ist. Antikörper mit breitem Neutralisationsspektrum sind deutlich unterrepräsentiert [Trkola et al., 1995].

Wenige dieser Antikörper konnten bisher isoliert werden. Gelungen ist das für die gegen gp120 gerichteten monoklonalen Antikörper (IgG1)2G12, (IgG1)b12 und (IgG1)17b. Die Bindung dieser Antikörper ist nicht nur sequenzspezifisch, sondern auch modifikationsspezifisch. Es müssen für eine Bindung von 2G12 an sein Epitop in der C4/V4-Region von gp120 die Positionen N295, N332 und N392 mit  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 2 Mannose-Resten glycosyliert sein [Scanlan et al., 2002; Trkola et al., 1996]. Die neutralisierende Wirkung und das Virusspektrum, welches 2G12 in der Lage ist zu neutralisieren, konnte durch einen rekombinanten Isotypenwechsel von IgG zu IgM deutlich gesteigert werden. [Wolbank et al., 2003] Die dadurch verbesserten Eigenschaften ermöglichten es sogar, in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 (nächster Abschnitt) eine klinische Studie (Phase I) durchzuführen [Stiegler et al., 2002; Armbruster et al., 2002]. Der monoklonale Antikörper (IgG1)b12 erkennt ein Epitop in der CD4-Rezeptor Region von gp120 [Burton et al., 1994; Kessler et al., 1997]. Der postulierte Bindungsmechanismus geht von einer dritten, fingerartigen, hypervariablen Schleife der schweren Kette aus. Eine dort lokalisierte Tyrosinseitenkette reicht bis in die hydrophobe CD4-Rezeptortasche des gp120 und konkurriert mit dem Hauptrezeptor um die Bindung [Zwick et al., 2003].

Ein anderer Bindungsmechanismus wurde für den aus einem HIV-positiven Patienten isolierten monoklonalen Antikörper (IgG1)17b beschrieben [Thali et al., 1993]. Weitere Gründe warum viele Antikörper gegen gp120 nicht breit neutralisieren, wurden mit der hochkomplexen Quartärstruktur erklärt. Die Oligomerisierung des Proteins zu Trimeren auf der viralen Oberfläche [Sattentau et al., 1995; Fouts et al., 1997; Parren et al., 1999] sowie die 28 determinierten, potentiellen Glycosylierungs-Stellen in den V-Regionen [Leonard et al., 1990] zeigten sich hauptverantwortlich für die Resistenz des Virus gegen die gebildeten Antikörper. Da diese Mechanismen ausreichend stark verhindern, dass breit neutralisierende Antikörper gegen gp120 von HIV gebildet werden können, erscheint es sinnvoll, als alternatives Ziel das gp41 heranzuziehen. Das transmembrane Hüllprotein ist während der Infektion für die Fusion der viralen und zellulären Membran verantwortlich und eine Blockierung dieses Vorgangs würde ebenfalls alle nötigen Kriterien zum Schutz des Organismus vor einer Infektion beinhalten [Wild et al., 1995]. Ein Grund, warum es keinem so hohen immunogenem Selektionsdruck unterliegt, ist die Maskierung des gp41 durch das gp120 bis kurz vor dem Fusionsvorgang. Untersuchungen zeigten, dass gerade die Ectodomäne des gp41 verschiedener HIV-1 Subtypen die geringste Varianz in der Aminosäuresequenz aufweist (Abbildung 1.7) [Gaschen et al., 2002; Gallo et al., 2003]. Trotzdem blieb auch hier die Induktion neutralisierender Antikörper bzw. der Versuch der Isolation solcher lange erfolglos. Das gelang mit dem aus Patientenserum isolierten monoklonalen Antikörper 2F5 [Muster et al., 1993]. Es dauerte 8 Jahre bis ein weiterer monoklonaler Antikörper, 4E10, gegen das gp41 isoliert werden konnte [Zwick et al., 2001]. Die Epitope beider Antikörperisolate liegen membranproximal nur wenige Aminosäuren auseinander. Für 2F5 wurde das Epitop mit der Konsensussequenz ELDKWAS und für 4E10 NWFNIT identifiziert [Muster, 1993; Zwick et al. 2001]. 2F5 ist in der Lage verschiedene Subtypen von HIV-1 zu neutralisieren. Der Grund hierfür liegt in der Konserviertheit des Epitops. Es konnte gezeigt werden,

dass die Aminosäuren (L)DKWA für die Bindung und Neutralisation unerlässlich sind [McGaughey et al., 2003]. Es reicht eine Aminosäuresubstitution in dem Bereich, und der Antikörper kann nicht mehr neutralisieren. Das erklärt die Unwirksamkeit dieses Immunglobulins gegen den Subtyp O [Trkola et al., 1995; Parren et al. 1998].



**Abbildung 1.7: Vergleich zwischen der Variation der Nukleotid- (A) und Aminosäuresequenz (B) verschiedener HIV-1-Isolate des Subtyps C aus Südafrika, Botswana, und Indien mit der Consensussequenz (C und B) sowie verschiedenen Impfstoffsequenzen [Gaschen et al., 2002]**

Sequenzhomologien der Isolate zur Consensussequenz des Subtyps C sind in grün und zur Consensussequenz des Subtyps B in rot dargestellt. Die Variabilitäten zu zwei potentiellen Impfstoffen sind in blau (hellblau und dunkelblau) abgebildet. Die Sequenzen der Env-Proteine sind eingrahmt. Die Variabilität des Oberflächenproteins von HIV-1 beträgt innerhalb eines Subtyps bis zu 20%, subtypübergreifend 35%. Deutlich stärker ist die Ectodomäne des HIV-1 gp41 konserviert.

Für das  $\gamma$ -Retrovirus FeLV konnten neutralisierende Antikörper gegen das TM-Protein (p15) bereits 1986 induziert werden [Elder et al., 1986]. Erst kürzlich wurden Daten mit dem FeLV Modell gewonnen, die zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen HIV-1 gp41 beitragen könnten. Ein dort kartiertes ebenfalls membranproximales Epitop auf dem FeLV-A p15E, WFEWGN, entspricht in seiner Lage dem NWFNIT Epitop des neutralisierenden Antikörpers 4E10 gegen gp41 von HIV [Langhammer et al., 2005]. Die dort durchgeführten Versuche basierten auf den Experimenten von Fiebig et al. [2003]. Sie konnten bereits zuvor neutralisierende Antikörper gegen das TM-Protein von PERV induzieren [Fiebig et al., 2003]. Eines der Epitope der gegen PERV p15E gerichteten Antikörper, FEGWFN, ist ebenfalls membranproximal lokalisiert. Beide besitzen sogar Sequenzhomologie zum 4E10 Epitop. Das in PERV erkannte Epitop ist zu 50% dem 4E10-Epitop homolog. Dieser Bereich, in welchem bei gp41 HIV auch das Bindungsmotiv von 2F5 lokalisiert ist, wird

in den weiteren Ausführungen entsprechend der Nomenklatur von Fiebig et al. folgend als E2-Bereich bezeichnet. Zusätzlich detektierten alle Epitopkartierungen im N-terminalen Bereich weitere Bindungsstellen. Die neutralisierende Wirkung von Ziegenseren gegen PERV konnte durch die gleichzeitige Zugabe von aus dieser Region und aus der E2-Region abgeleiteten Peptiden stärker inhibiert werden im Vergleich zu der Applikation nur eines dieser Peptide [Fiebig et al., 2003]. In Bindungsstudien des monoklonalen Antikörpers 2F5 konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit aus beiden detektierten Regionen abgeleiteter Peptide eine Bindung an dessen Epitop deutlich verstärkt wurde. Auch dessen Neutralisationsvermögen wurde durch die Anwesenheit beider Peptide in gleicher Weise herabgesetzt wie es für das anti-PERV-Serum gezeigt werden konnte [Fiebig et al., 2003]. Der N-terminal gelegene Bereich wird im Folgenden als E1-Bereich bezeichnet.

<b>Antikörper / Serum</b>	<b>Zielprotein</b>	<b>Epitop(e)</b>	<b>Neutralisationsbreite</b>
2G12 [Trkola et al., 1995]	HIV-1 gp120	C4/V4-Region; Glycosylierung an N295, N332, N392	HIV-1 Subtypen : A,B,F [Binley et al., 2004]
b12 [Burton et al., 1994]	HIV-1 gp120	CD4-Rezeptorregion	HIV-1 Subtypen : A,B,C,D [Binley et al., 2004]
17b [Thali et al.,1993]	HIV-1 gp120	Chemokinrezeptor- Region	HIV-1 Subtypen : A,B,C,D,E,F,G [Moulard et al., 2002]
2F5 [Muster et al., 1993]	HIV-1 gp41	ELDKWA	HIV-1 Subtypen : alle außer O [McGaughey et al., 2003]
4E10 [Zwick et al., 2001]	HIV-1 gp41	WNWFNIT	HIV-1 Subtypen : A,B,C,D,E,F,G,J [Binley et al., 2004]
Ziege 20 [Fiebig et al., 2003]	PERV p15E	E1: GPQQLEK E2: FEGWFN	PERV-A; PERV-B
Ziege 27 [Langhammer et al., 2003]	FeLV-A p15E	E1: LETAQFRQL E2: KQRQQL	FeLV-A

**Tabelle 1.1: Zielproteine, Epitope und Neutralisationsspektren der monoklonalen Antikörper 2G12, b12, 17b, 2F5, 4E10 sowie der Seren von Ziege20 und Ziege 27**

Das breiteste Neutralisationspektrum weisen die gegen das TM-Protein von HIV-1 gerichteten monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 auf. Die Ziegenseren detektieren partiell sequenzhomologe Epitope zu HIV-1 gp41 in den TM-Proteinen der Retroviren PERV und FeLV. Zusätzlich zu diesen C-terminalen Regionen (E2) wird eine während des Fusionsprozesses in räumlicher Nähe liegende Region im N-terminalen Bereich (E1) erkannt. E1 und E2 bilden möglicherweise ein Konformationsepitop für neutralisierende Antikörper gegen TM-Proteine der untersuchten Retroviren.

Diese Daten weisen auf ein Konformationsepitop hin, in welchem der E1-Bereich die Bindung neutralisierender Antikörper im E2-Bereich der Präfusionskonformation des TM-Proteins stabilisiert. Diese Interpretation wurde auch für HIV diskutiert [Zwick et al. 2001]. Ein weiterer Hinweis für diesen Mechanismus findet sich in der postulierten, durch gp41 vermittelten Fusionsreaktion. Hierbei wird von einer

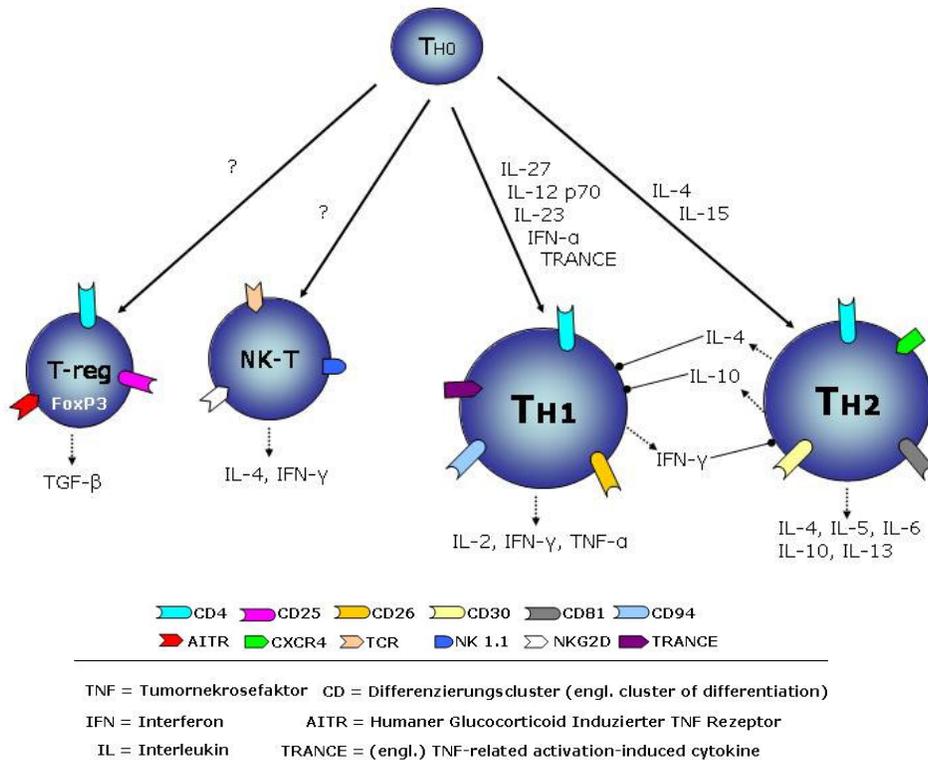
Umlagerung der NHR- und CHR-Regionen der gp41-Ectodomäne ausgegangen (Abschnitt 1.2.3). In dem entstandenen *6-Helix-Bundle* liegen die postulierten Epitope E1 und E2 in räumlicher Nähe [Chan et al., 1989; Tan et al., 1997; Caffrey, 1998; Fiebig et al., 2003] (Abbildung 1.6-3). Außerdem konnten in Immunsierungsversuchen mit den einzelnen korrespondierenden Peptiden zu den Epitopen der monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 keine neutralisierenden Antikörper induziert werden [Liao et al., 2000; Lu et al., 2000; Tian et al., 2001; Xiao et al., 2000].

Ein Fusionsblocker auf Peptidbasis wurde bereits erfolgreich getestet. T20 (=DP178, Klasse der Enfurvirtide) entspricht in seiner Sequenz der CHR und dem membranproximalen Bereich des HIV-1 gp41 (AS 636-671), in welchem sich auch das Epitop des monoklonalen, neutralisierenden Antikörpers 2F5 befindet. Es ist heute für die HAART zugelassen. [Foy et al., 2004]. Verschiedene, auf der Basis von rekombinanten Proteinen durchgeführte Impfstoffstudien in Tiermodellen schienen Erfolg im Kampf gegen die HIV-Pandemie zu versprechen. Nur zwei Ansätze konnten bis in die klinische Phase III gebracht werden. Das Vakzin bestand aus einem rekombinanten Protein, das Sequenzen aus dem externen Glycoprotein und dem TM-Protein von HIV-1 Subtyp B enthielt [AIDSVAX B/B ; VaxGen, Brisbane, CA, USA]. Die mit AIDSVAX B/B behandelten Probanden der Studie zeigten keinen Schutz vor Infektion im Vergleich zu Probanden der Placebogruppe [AIDS Alert, 2003]. 1999 startete eine zweite klinische Phase III Studie in Bangkok, Thailand. Hierbei wurde auch auf der Basis des gp160 von HIV-1 Subtyp B und E vakziniert [AIDSVAX B/E; VaxGen, Brisbane CA USA]. Hier konnte ebenfalls kein Schutz vor Infektion erreicht werden. Auch andere Vakzine kamen nicht über die klinische Phase I oder II hinaus. Alle basierten ganz oder zum Teil auf den Strukturen des gp120. Dessen Variabilität und die sich daraus ergebenden Fakten bezüglich der Induktion und Wirksamkeit neutralisierender Antikörper wurde bereits zuvor demonstriert (Abschnitt 1.3.2). Die Ergebnisse der Studien stellen somit ein weiteres starkes Indiz dafür dar, dass ein humoraler Schutz gegen die HIV-Infektion mit rekombinanten Konstrukten besser auf der Basis von HIV-gp41 zu erreichen sein könnte.

Auch die Tatsache, dass Bereiche der transmembranen Hüllproteine immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, macht sie für genauere Untersuchungen interessant [Denner et al., 1994].

### **1.3.3 Humane CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen**

Eine besondere Subpopulation der CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen rückte in den letzten Jahren ins Zentrum der immunologischen Forschung, als man begann zu verstehen, welche wichtige Funktion ihnen bei der Regulation der Immunantwort zu Teil wird. Es handelt sich um CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> doppelpositive T-Lymphocyten, welche als regulatorische T-Zellen (T-reg) bezeichnet werden. Charakterisiert werden sie durch verschiedene Oberflächenmarker wie die konstitutive Expression von CD4-Moleküls und dem IL-2 Rezeptor CD25 [Baecher-Allan et al., 2002]. Weitere Moleküle auf der Oberfläche der Zellen sind zum Beispiel der Humane Glucocorticoid Induzierte Tumornekrosefaktor Rezeptor (GITR) und CTLA-4 [Li et al., 2003; Read et al., 2000].



**Abbildung 1.8: Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Marker der humanen T-Zellen Lymphocyten**

Dargestellt ist eine Auswahl an Oberflächenmarkern und Transkriptionsfaktoren zur Unterscheidung der T-Zell-Subpopulationen.

GITR wird konstitutiv in hohem Maße auf regulatorischen T-Zellen exprimiert. Dessen Expression wird infolge einer Aktivierung noch gesteigert [Shimizu et al., 2002; McHugh et al., 2002]. Es hat keinen Einfluss auf die Suppressorfunktion der T-reg [Ronchetti et al., 2004]. In verschiedenen Ansätzen wurde gezeigt, dass GITR ein Negativregulator der T-reg ist. Aktivierung von GITR, dem murinen paralogen Molekül, durch den GITR-Liganden (GITRL) unterdrückt durch murine T-reg vermittelte Suppression *in vitro* [Kim et al. 2003, Ji et al., 2004].

Es gibt einen spezifischen Transkriptionsfaktor, welcher ebenfalls konstitutiv in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> humanen regulatorischen T-Zellen exprimiert wird. Er wird als FoxP3 bezeichnet. Dieses X-chromosomal codierte Molekül ist am „*finetuning*“ der Expression immunologisch relevanter Gene in T-Lymphocyten beteiligt und bewerkstelligt die Ausdifferenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyten zu CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen [Hori et al., 2004]. Eine Mutationsfolge in der C-terminalen DNA-Bindedomäne des als Dimer aktiven Moleküls führt zur Inaktivierung und zur Ausprägung einer Immundysregulation welche als IPEX (Immundysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrom) bezeichnet wird. Heterozygote Frauen sind bei dem Defekt asymptomatisch, während die Klinik bei Männern durch Diarrhoe, chronische Lymphocytenaktivierung, Thyroiditis und starken Autoimmunreaktionen charakterisiert ist und für gewöhnlich tödlich verläuft. Der Tod tritt hier durch eine Überproduktion autoinflammatorischer Cytokine ein [Wildin et al., 2002; Tommasini et al., 2002]. Die Expression von FoxP3 in der Maus konnte als spezifisch für regulatorische T-Zellen

beschrieben werden. Ein erhöhter FoxP3 Gehalt wurde bei viralen Infekten beobachtet [Hori et al., 2003; Fontenot et al. 2003]. Während der Infektion von Katzen mit dem Felinen Immundefizienz-Virus (FIV) konnte eine Aktivierung von regulatorischen T-Zellen dokumentiert werden [Vahlenkamp et al., 2004]. Auch bei HIV-Positiven wurde eine Korrelation zwischen der Viruslast und der Anzahl an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen in Lymphknoten gezeigt [Andersson et al., 2005]. Hieraus ergibt sich eindeutig die Frage nach der biologischen Funktion diese Zellen. Gezeigt werden konnte eine Herunterregulierung des Immunsystems bei Autoimmunreaktionen, denn durch das Entfernen, Unterdrücken oder das gänzliche Fehlen regulatorischer T-Zellen (IPEX) erhöhte sich die Frequenz autoreaktiver T-Lymphocyten drastisch [Wildin et al., 2002]. Durch *in vitro* Gentransfer von *foxP3* in naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnten regulatorische T-Zellen erzeugt werden, welche gleichzeitig die Abstoßung von allogenen Transplantaten *in vivo* unterdrückten [Chai et al., 2005]. Aus an Arthritis erkrankten Patienten konnten regulatorische T-Zellen isoliert werden, welche *in vitro* die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyten hemmten [Woo et al., 2002]. Zur Signaltransduktion zwischen den Effektor- und Zielzellen dieser Phänomene ist noch wenig bekannt. Man geht im Moment von einer Wirkung auf die Zielzellen über den T-Zell-Rezeptor (engl. TCR), also direkten Zell-Zell-Kontakt aus [Baecher-Allan et al., 2002].

### **1.3.4 Retrovirus induzierte Immunsuppression**

Trotz der zuvor beschriebenen Möglichkeiten die dem befallenen Organismus zur Verfügung stehen um sich von einer Infektion zu befreien oder sie sogar von vorn herein zu verhindern, breitet sich AIDS weiter aus. Es gibt 42,1 Mio infizierte und jährlich sterben weltweit ca. 3,1 Mio an AIDS (WHO, Welt-AIDS-Bericht 2004). Was beeinflusst das Virus während Pathogenese, dass das Immunsystem nicht in der Lage ist, den Erreger komplett aus dem Organismus zu entfernen? Retroviren sind genau wie der Wirt selbst (1.3.3.) in der Lage modulierend in die Ausprägung der Immunantwort einzugreifen und versuchen sie herunterzuregeln [Khan et al., 1983; Barre-Sinoussi, 1983]. Wird das Immunsystem wie hier beschrieben unterdrückt spricht man von Immunsuppression. Dadurch ist es natürlich leichter für andere Erreger den Organismus zu befallen. Opportunistische Infektionen sind häufig ein Grund für den Tod von immundefizienten Patienten und gerade bei an AIDS erkrankten Menschen war zum Beispiel das Kaposi-Sarkom welches durch das Humane Herpes-Virus 8 ausgelöst wird ein häufiges Symptom der Immunschwäche. Im Zuge der Ausbreitung der AIDS-Pandemie gewann die Forschung auf diesem Gebiet stark an Bedeutung, doch die ersten Arbeiten dazu begannen bereits in den 1960er Jahren. Durch die direkte Applikation von Leukämie Viren konnte in Mäusen die humorale und zelluläre Immunantwort stark heruntergeregelt werden [Dent et al., 1965; Peterson et al., 1963]. Auch FeLV, ein  $\gamma$ -Retrovirus, löst in Katzen eine Immunsuppression aus [Cotter et al., 1975]. Das Sterben der Koala-Bären in Australien ist teilweise in der Aktivierung eines Retrovirus begründet. Das sogenannte Koala-Retrovirus (KoRV) zeigt eine Prävalenz in den untersuchten Kolonien von 100% und löst eine tödlich verlaufende Immunschwäche aus [Canfield et al., 1988; Hanger et al., 2000]. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit inaktivierten Viren lassen darauf schliessen, dass

es Komponenten der Virionen sind, die direkt immunsuppressiv wirken. Im Ergebnis der *in vitro* Experimente mit inaktivierten FeLV- und Rauscher-Leukämievirus-(RLV) Partikeln stand die Hemmung der durch Mitogen induzierten Proliferation von murinen und felines Lymphocyten [Orosz et al., 1985]. Ähnliche Ergebnisse waren zuvor für inaktivierte Primatenretroviren beschrieben worden [Denner et al., 1980]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte mit inaktivem FeLV die IL-2 induzierte Proliferation von T-Zellen, die Chemotaxis von Monocyten und NK-Zellen, den „respiratorischen Burst“ von Monocyten, die gemischte Lymphocytenreaktion (engl. MLR) sowie die B-Zell Stimulierung hemmen [Oostendorp et al., 1993]. Letztlich konnten für viele Retroviren ähnliche immunsuppressive Effekte in infizierten Wirten beschrieben werden [Denner, 1998]

### 1.3.5 Immunsuppressive (ISU-) Domäne

Genauere Untersuchungen der Struktur und Sequenz der TM-Proteine von Retroviren (Abschnitt 1.2.3) definierten einen Bereich in der Ectodomäne des Proteins, welcher zwischen dem Cysteinloop und der NHR lokalisiert ist, als besonders konserviert. Vergleiche der Sequenzen verschiedener Retroviren zeigten eine hohe Konservierung der Aminosäuresequenz (Abbildung 1.9) Die immunsuppressive Wirkung konnte auf eine Folge aus 17 Aminosäuren eingegrenzt werden, welche dann als immunsuppressives (ISU-)Peptid CKS-17 für die Konsensussequenz bezeichnet wurde [Cianciolo et al. 1985]. Eine hohe Homologie fand sich zum Beispiel bei HTLV, PERV und FeLV. Mit Abweichungen konnte die Sequenz auch bei HIV-nef [Collette et al., 1996] und gp41 gefunden werden [Denner et al., 1994]. Auch für das membranständige LMP des Eppstein-Barr-Virus, welches Sequenzhomologien zu CKS-17 aufweist, konnte eine immunsuppressive Wirkung beschrieben werden [Dukers et al., 2000].

CKS 17	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
PERV-A	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
KoRV	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
MuLV	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
FeLV-A	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
HTLV-1	<b>A</b>	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	<b>W</b>	<b>E</b>	<b>Q</b>	G	G	L
HIV-1	L	Q	<b>A</b>	R	<b>I</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	L	K	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	L
(env583-599)																	
EBV-LMP	-	-	-	-	-	-	L	<b>A</b>	L	L	F	<b>W</b>	<b>L</b>	-	-	-	-

**Abbildung 1.9: Sequenzvergleich der immunsuppressiven (ISU)-Domänen**

Von der CKS-17 Abweichende Aminosäuren sind fett gedruckt. Aus diesem in vielen transmembranen Hüllproteinen von Retroviren abgeleitetem Bereich wurde die CKS-17 Konsensussequenz für ISU-Peptide abgeleitet.

Für das von dieser Sequenz abgeleitete Peptid konnten verschiedene Effekte beschreiben werden. So konnte eine direkte Inhibition der IL-2 und Allogantigen abhängigen Proliferation von murinen und humanen T-Lymphocyten, des „respiratory Burst“ von humanen Monocyten und der Aktivität von NK-Zellen beobachten [Cianciolo

et al., 1985; Ruegg et al., 1989; Harrell et al., 1986; Harris et al., 1987; Ogasawara et al., 1990]. Von HTLV und HIV-gp41 abgeleitete Peptide konnten *in vitro* die Zellproliferation von T-Lymphocyten und die *mixed lymphocyte reaction* (MLR) unterdrücken [Ruegg et al., 1989; Ruegg et al., 1991; Wang et al., 1995; Denner et al., 1996]. Die ISU-Domäne von HIV-1-gp41, AS 583-599, schließt in N-terminaler Orientierung direkt an die immundominante Region, AS 598-607 an. Für aus dieser Sequenz abgeleitete Peptide konnte gezeigt werden, dass sie *in vitro* die Proliferation durch mitogene und lymphokine Stimulation von humanen und Mäuse lymphocyten hemmen [Denner et al., 1994]. Die immunsuppressive Eigenschaft der HIV-ISU-Domäne konnte auf ein N-terminal gelegenes Octamer als Minimalsequenz eingegrenzt werden [Ruegg et al., 1989; Denner et al., 1994]. Außerdem konnte eine Interspeziesreaktivität der proliferationshemmenden Wirkung [Denner et al.; 1994, 1996] und eine Hemmung des cytotopatischen Effekts von HIV-1 auf MT4-Zellen durch das HIV-ISU-Peptid beobachtet werden [Denner et al., 1994]. Letzterer Effekt wurde später durch das Auffinden der antiviralen Peptide T20 und T21 (DP107, DP178) bestätigt [Wild et al., 1995].

### 1.3.6 Cytokinmodulation durch TM-Proteine und ISU-Peptide

Wie gezeigt, beeinflussen TM-Proteine und Peptide, die aus der ISU-Domäne abgeleitet wurden, die Funktionalität von PBMCs. Die häufigste Veränderung, die man durch die Exposition von Lymphocyten beobachten konnte, waren veränderte Sekretionsmuster der Cytokine. Wie zuvor erwähnt, funktioniert das Immunsystem als komplexes Netzwerk aus verschiedenen Regulationsprozessen. (Abschnitt 1.3.1.) Greift eine fremde Komponente in dieses Netzwerk ein, kann es leicht zu Dysregulationen kommen, welche in diesem Fall zu schweren Immunsuppressionen führen können. Die Mediatoren der Regulation sind die Interferone und Interleukine. Sie sind für die Kommunikation der Immunzellen untereinander verantwortlich. Somit ist es leicht vorstellbar dass zum Beispiel ein Ungleichgewicht von zum Teil antagonistischen Cytokinen wie die  $T_H1$  (=Typ1) und  $T_H2$  (=Typ2) Cytokine die Progression eines Infektes begünstigen kann [Faxvaag et al., 1995; Clerici et al., 1994, 1997]. Für Typ1-Cytokine konnte man nachweisen, dass ihre Sekretion *in vitro* verringert wird, wenn eine Lymphocytenpopulation dem CKS-17 Peptid exponiert wird. Speziell wurde das für IL-2, IL-12 und IFN- $\gamma$  gezeigt, welche maßgeblich an der zellvermittelten Immunität (CMI) beteiligt sind [Kleinerman et al., 1987; Haraguchi et al. 1992, 1995]. Gleichzeitig wurde ein Anstieg an Typ2-Cytokinen wie IL-10 und IL-6 gemessen, nicht aber an IL-4, IL-5 oder IL-13 [Haraguchi et al., 1992, 1995; Koutsonikolis et al. 1997]. Experimente mit rekombinantem gp41 von HIV-1 konnte ebenfalls die IL-6 und IL-10 Sekretion induzieren [Takeshita et al., 1995, Denner et al., unveröffentlicht]. Gerade IL-10 ist ein wichtiger Mediator bei der Gegenreaktion einer immunologischen Aktivierung und spielt bei der Toleranz eine Rolle [Ren et al., 1996]. Erhöhte Level der IL-10 Transkription bei humanen Monocyten- und T-Zelllinien konnten durch *in vitro* Versuche mit HIV-1 beschrieben werden [Borghini et al., 1995; Barcellini et al., 1994; Graziosi et al., 1994]. Auch für eine HIV-Infektion ist ein Anstieg der IL-10 Transkription und Sekretion charakteristisch [Clerici et al., 1994; Denis et al., 1994; Maggi et al., 1994; Masood et al., 1994]. Durch den Einsatz von

Cytokinarrays konnte gezeigt werden, dass auch durch das HIV-ISU-Peptid das Verhältnis von Typ1- zu Typ2-Cytokinen verändert wird. Cytokine wie IL-2 und TNF- $\alpha$  werden im Gegensatz zu IL-10, IL-4, IFN $\alpha$  und IFN $\gamma$  heruntergeregelt [Denner et al., unveröffentlicht]. Die beobachteten Veränderungen korrespondierten mit dem berichteten Einfluss von HIV-1 gp41 auf die Cytokinexpression [Takeshita et al., 1995]. Damit wurde weiterer ein Hinweis erarbeitet, dass die ISU-Domäne des HIV-1 gp41 für dessen immunsuppressive Eigenschaft verantwortlich ist.

## 1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen immunsuppressive Eigenschaften transmembraner Hüllproteine von Retroviren und von ihnen abgeleiteter Peptide untersucht werden. Hierzu sollen rekombinante transmembrane Hüllproteine und Homopolymere der synthetischen immunsuppressiven (ISU-)Peptide hergestellt werden. Für die rekombinanten Proteine soll ein eukaryontisches, endotoxinfreies Expressionssystem etabliert werden. Dafür müssen die Proteine in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert, exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt werden. Immunsuppression kann durch die Messung von Cytokinen dargestellt werden. Dazu werden humane PBMCs mit den Homopolymeren und den rekombinanten transmembranen Hüllproteinen inkubiert, und die Expression des Cytokins IL-10 wird mittels Capture-ELISA gemessen. Neben diesen *in vitro* Versuchen soll in einem weiteren Ansatz die Wirkung der immunsuppressiven Domäne *in vivo* charakterisiert werden. Hierfür sollen rekombinante transmembrane Hüllproteine, sowohl mit als auch ohne ISU-Domäne, im Rattenmodell eingesetzt werden. Die Stärke der gegen sie und gegen ein nicht verwandtes Antigen gerichteten humoralen Immunantwort ist mittels ELISA und Western Blot zu charakterisieren.

Des Weiteren soll getestet werden, ob die ISU-Peptid-Homopolymere und die endotoxinfrei exprimierten, rekombinanten transmembranen Hüllproteine CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> doppelpositive regulatorische T-Zellen (T-reg) induzieren und auf diesem Weg immunsuppressiv wirken können. Ein Ansatz hierbei soll die Charakterisierung der Lymphocyten-Subpopulation durch Immunmarkierung der spezifischen Oberflächenmarker CD25 und GITR sein. Die eingesetzten Homopolymere und rekombinanten Proteine sollen zuvor in den *in vitro* Tests auf Aktivität geprüft werden. Die Quantifizierung der Populationen soll am Durchflusscytometer erfolgen. Als zweiter Marker zur Induktion regulatorischer T-Zellen soll die Expressionsveränderung des Transkriptionsregulators FoxP3 untersucht werden. Hierfür soll ein SYBR-Green-*Realtime*-System etabliert werden, mit dem sich die FoxP3-Amplifikate nach reverser Transkription der aus humanen PBMCs isolierten Gesamt-RNA quantifizieren lassen. Es soll untersucht werden, ob es einen Unterschied gibt, in der FoxP3-Expression zwischen humanen PBMCs, die mit HIV-ISU-Homopolymeren oder rekombinanten transmembranen Hüllproteinen inkubiert wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Im zweiten Teil der Arbeit soll ein Beitrag zur Entwicklung einer Vakzine zum Schutz vor HIV-1-Infektionen geleistet werden. Es sollen rekombinante Proteine hergestellt werden, welche die Epitope der HIV-1 breit neutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10 tragen. Als Gerüstprotein soll aufgrund von Sequenzhomologien zu den Epitopen von 2F5 und 4E10 das transmembrane Hüllprotein des Koala-Retrovirus (KoRV) dienen. Die rekombinanten Proteine sollen exprimiert, gereinigt und anschließend zur Induktion neutralisierender Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von HIV-1 im Rattenmodell eingesetzt werden. Die induzierten Antikörper sollen in Peptid- und Protein-ELISAs auf spezifische Bindung getestet werden. Mit einem Neutralisationstest, basierend auf einer *Realtime*-PCR, soll das Neutralisationspotential der induzierten Antikörper bestimmt werden. Zur weiteren Charakterisierung sollen die erkannten Epitope der induzierten Antikörper auf einer Pepspot-Membran kartiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

Bezeichnung	Herkunft/ Firma	Verdünnung / Menge
<u>Primärantikörper:</u>		
anti-V5	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	1:5000
2F5	Zur Verfügung gestellt durch das <i>AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAD, NIH: HIV gp41 monoklonaler Antikörper (2F5) von Dr. H. Katinger (Muster, et.al, 1993)</i>	0,2 µg/ml
Ziege 20	Uwe Fiebig, RKI, Berlin, Deutschland (Fiebig et al., 2003)	1:100
Ziege 27	Stefan Langhammer, RKI, Deutschland	1:100
<u>Sekundärantikörper:</u>		
α-Rabbit IgG HPRT	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	1:5000
α-Mouse IgG HPRT	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	1:5000
α-Goat IgG HPRT	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	1:5000
α-Human IgG-HPRT	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	1:5000
<u>Fluorochrom-Konjugate:</u>		
anti-GITR/GITR-FITC	eBioscience, Cornerstone, San Diego	0,50 µg / 10 <sup>6</sup> Zellen
anti-CD3-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich	0,25 µg / 10 <sup>6</sup> Zellen
anti-CD4-APC	Immunotech, Marseille, Frankreich	0,25 µg / 10 <sup>6</sup> Zellen
anti-CD25-PE	BD-Biosciences, San Jose, USA	0,25 µg / 10 <sup>6</sup> Zellen

#### 2.1.2 Chemikalien

100bp DNA Ladder	Fa. Gibco BRL, Großbritannien
1kbPlus Ladder	Fa. Gibco BRL, Großbritannien
BAKERBOND Abx 40µ	Baker Chemikalien, Gross-Gerau, Deutschland
Restriktionsendonucleasen	NEB, Frankfurt a.M., Deutschland
BigDye-Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Bradford-Lösung	Bio-Rad, München, Deutschland
BSA	Serva, Heidelberg, Deutschland
DAB	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTP Mix (10mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
ECL™Western Blotting Detection	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England
EGTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethidiumbromidlösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

CL-XPosure™Film	PIERCE, Illinois, USA
FKS	BioChrom, Berlin, Deutschland
G418 /Geneticin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gentamycin	BioChrom, Berlin, Deutschland
Imject ® Freund ´s adjuvans	PIERCE, Illinois, USA
IPTG	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Luminometerplatten	Optiplate™-96, Packard
NEB-Puffer	NEB, Frankfurt a.M., Deutschland
Nunclon™ Surface Flachboden	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Nunclon™ Surface Rundboden	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
OPD	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
pCal-n-Vektor	Stratagene, La Jolla, USA
PCR-Puffer (10fach mit MgCl <sub>2</sub> )	Applied Biosystems, New Jersey, USA
Penicillin (10000U/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Pepspot-Membranen	Jerini, Berlin, Deutschland
pMT/Bip/V5-His-C-Vektor	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RPMI	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SAP	Usb, Cleveland, USA
SAP-Puffer	Usb, Cleveland, USA
Streptomycin(10mg/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Taq Polymerase AmpliTaq ®Gold	Applied Biosystems, New Jersey, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Magermilchpulver	Fa. Sucofin, Zeven, Deutschland
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin 0,25%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	TPP, Midwest Scientific St. Louis, MO, USA
Blasticidin S HCl	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.3 Kommerzielle Kits

JetQuick-Plasmid-Mini-Kit	GENOMED GmbH, Bad Oeyenhausen, Deutschland
JetQuick-PCR-Purification-Kit	GENOMED GmbH, Bad Oeyenhausen, Deutschland
JetQuick-Gel-Extraction Kit	GENOMED GmbH, Bad Oeyenhausen, Deutschland
SYBR-Green-PCR-Master Mix	Stratagene, La Jolla, USA
DNA-Whole Blood Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
EndoFree-Plasmid-Maxi-Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Plasmid-Maxi-Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
OptEIAM™ human IL-10 Set	BD Biosciences, San Jose, USA

### 2.1.4 Geräte

<i>Realtime</i> -PCR-Cycler MX4000	Stratagene, La Jolla, USA
------------------------------------	---------------------------

FACScalibur	BD-Biosciences, San Jose, USA
ELISA Reader Spectra Classic	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Entwicklungsmaschine Curix 60	Agfa, Köln, Deutschland
Fraktionssammler SuperFrac	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Gel Doc 2000	Bio-Rad, München, Deutschland
CO <sub>2</sub> Incubator MCO-20AIC	Sanyo, München, Deutschland
Inversmikroskop ID 03	Zeiss, Jena, Deutschland
Konzentrator <i>Concentrator</i> 530	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Kühlzentrifuge Centrifuge 5403	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
EP-Gradient-S PCR	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Schüttelinkubator Innova 4330	New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
Sterilbank Steril Gard Class2	The Baker Company, Sanford, Maine USA
Tischzentrifuge <i>Centrifuge</i> 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Branson Sonifier II 250	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Branson Modell 102C	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20xP	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro, Langenselbold, Deutschland

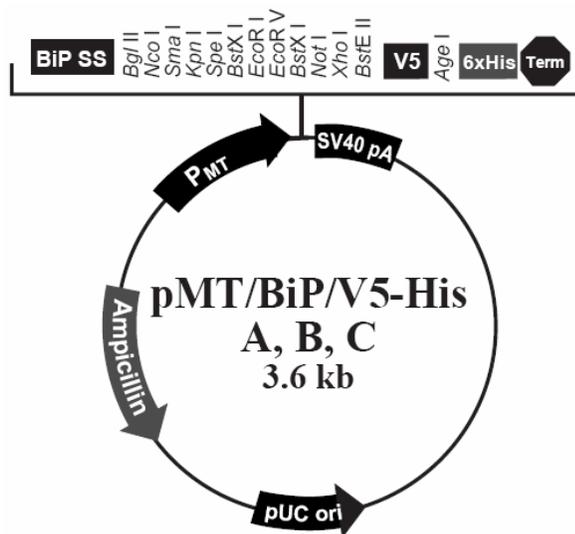
### 2.1.5 Bakterien

<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RP	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli oneShot</i> ® TOP10	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.6 Vektoren

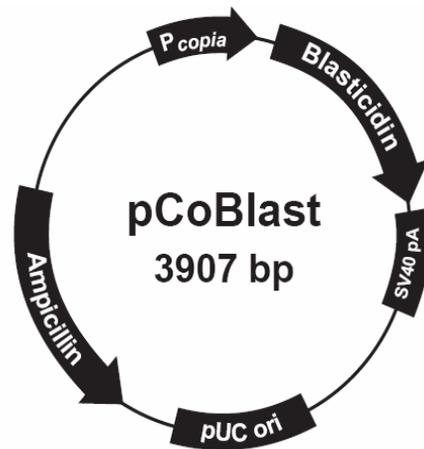
pMT/Bip/V5/HisC (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Der Vektor ist Teil des Drosophila-Expressions-Systems (DES). Es ist der Expressionsvektor in den in dieser Arbeit die rekombinanten Proteine PERV-p15E und FeLV-Δisu-p15E über die Restriktionsstellen BglII und XhoI kloniert wurden. Die Konstrukte erhalten durch den Vektor N-terminal ein Exportsignal und C-terminal einen V5-Tag zur Detektion und einen 6xHis-Tag zur Affinitätschromatographischen Reinigung der Proteine. Zur Selektion nach bakterieller Transformation enthält der Vektor eine Ampicillin- Resistenzcassette. Die Expression wird durch einen Metallothionin-Promotor kontrolliert.



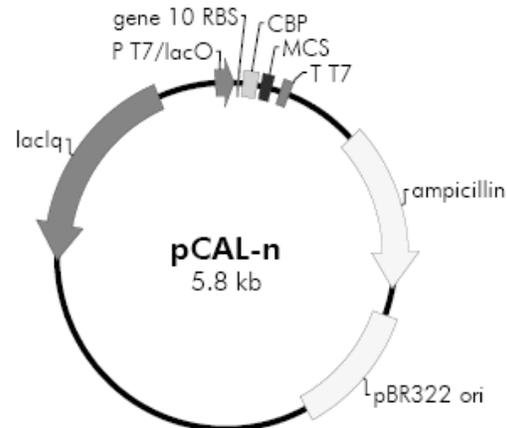
pCoBlast (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Dieser Vektor gehört ebenfalls zum Drosophila-Expressions-System (DES). Er beinhaltet eine Blasticidin-Resistenzcassette unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors *copia* zur Selektion positiv transfizierter Zellen. Zusätzlich besitzt er eine Ampicillin-Resistenzcassette zur Amplifikation in Bakterien. Um stabil transfizierte Zelllinien zu generieren, muss dieser Vektor mit dem Expressionsvektor cotransfiziert werden. In dieser Arbeit wurde zusätzlich mit Hilfe einer Blasticidin-spezifischen PCR der Nachweis einer erfolgreichen Transfektion von Drosophila-Zellen mit pCoBlast vollzogen.



pCal-n (Stratagene, La Jolla, USA)

Der bakterielle Expressionsvektor wurde in dieser Arbeit verwendet, um die rekombinanten Proteine FeLV-p15E, FeLV-Disu-p15E, KoRV-p15E2-AB und KoRV-p15E2-ABC zu exprimieren. Die Konstrukte wurden alle über die Restriktionsstellen EcoRI und BamHI kloniert. Der Vektor trägt eine Ampicillin-Resistenzcassette als Selektionsmarker. Zusätzlich wird C-terminal das Calmodulin-Bindeprotein (CBP) an das jeweilige rekombinante Protein fusioniert. Damit können alle Konstrukte über eine Calmodulin-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Außerdem trägt der Vektor einen T7-Promotor und einen T7-Terminator, die in dieser Arbeit als Binderegion für die Primer zur Sequenzierung verwendet wurden. Die Expression steht unter der Kontrolle des Lac-Repressors (LacI). Die Induktion erfolgt durch Zugabe des Allolactose Strukturanalogs IPTG, durch welches der Repressor aufgrund von höherer Affinität zum Induktor vom Operator titriert wird. Dadurch wird der Promotor freigegeben und die Transkription der *Downstream*-Sequenzen kann beginnen.



### 2.1.7 Datenbanken und Software

Für die Sequenzvergleiche wurde der BLAST-Algorithmus des National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) genutzt. Es wurden dort sowohl Nukleotid- als auch Proteinsequenzalignments durchgeführt. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

Für die Analyse der Konformation von Domänen und Hydrophobizitätsindizes wurden SwissProt Tools genutzt: [www.expasy.org/](http://www.expasy.org/)

Die Sequenzanalysen, Primerdesign, Restriktionstests und Konstruktdesign wurden mit dem Lasergen Softwarepaket (Madison, USA) durchgeführt

Statistische Auswertungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt.

### 2.1.8 Primer & Sonden

Name	Sequenz (5' - 3')	Ziel	Abschnitt
FeLV-for-BglII	GCAGATCTCTTGAAACAGCCCAGTT CAGACAA	FeLV- $\Delta$ isu-p15E Produkt: 223 bp	3.1.2.1
FeLV-rev-XhoI	CGCTCGAGCAGGGGGACTTGTTGA ACCATCC		
RB-Blast-For	TCAGCTGTCGACGATCCGGTGCGT GGTGGTTTCATG	Blasitcidin- Resistenzcassett e auf pCoBlast Produkt: 795 bp	3.1.2.2
RB-Blast-Rev	CTGATCGCTCTTCGTCGGCATCTAC TCCCTTGCG		
KoRV-p15E-for	GCGGATCCCTAATAAAAGGGCCCA TAGACCT	Mutageneseprim er für KoRV- p15E;	3.3.2.1
KoRV-p15E2-AB	TAGAATTCTCAACTTGCCCACTTAT CGAGCTCTGACGCCCACTTATCTAA CTCTTC	Produkte: AB: 313 bp	
KoRV-p15E2-ABC	TAGAATTCTCATGTTATGTTGAACC ATCCCTCGTACCAACTTGCCCACTT ATCGAG	ABC: 341 bp	
hs GAPDH 2 (+)	GCGGATGCTGGCGCTGAGTAC	humanes <i>GAPDH</i>	3.2.3
hs GAPDH 2 (-)	TGGTCCACACCCATGACGA	Produkt: 149 bp	
FoxP3-for	TCAAGCACTGCCAGGCG	FoxP3 mRNA/ cDNA; Produkt: 195 bp	3.2.3
FoxP3-rev	CAGGAGCCCTTGTCGGAT		
FeLV-RT-for	TCAAGTATGTTCCCATGAGATACAA	exogene U3- Region der LTR des Provirus; Produkt: 185 bp	3.3.1
FeLV-RT-rev	GAAGGTCGAACTCTGGTCAACT		
FeLV-U3-Sonde	FAM-TTAAGCACCTGGGCCCGGC- DQ		
SK68i	GGARCAGCIGGAAGCACIATGG	HIV-1 <i>pol</i> ; Produkt: 137 bp	3.3.2.2
SK69i	CCCCAGACIGTGAGITICAACA		
HIV-pol-Sonde	FAM- TGACGCTGACGGTACAGGCCAGAC -DQ		
KoRV-5-for	CTAATAAAAGGGCCCATAGA	KoRV-p15E; Produkt 341 bp	3.3.2.2
KoRV-6-rev	GTTGAACCATCCCTCGTACC		
KoRV-p15E-Sonde	FAM- CCATGGATACAGACCTTAGGGCCC- DQ		

### 2.1.9 Peptide

Die Monomere der folgenden aus HIV-1 gp41 abgeleiteten Peptide wurden von der Firma Jerini (Berlin, Deutschland) bezogen.

HIV-ISU:  $NH_2$ -**KQLQARILAVERYLKDQQL**-CONH  
 HIV RAN:  $NH_2$ -**LQRLRKQQYIDKQAALVLE**-CONH  
 E2-long:  $NH_2$ -**CNEQELLELDKWASLWNWFDITNWL**-CONH

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

##### Standard-PCR

Zur exponentiellen Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten wurde die PCR-Technik angewendet. Dabei wird in einer *in vitro* Reaktion in einem zyklische Prozess das Aufschmelzen einer doppelsträngigen DNA-Matrize, das Anlagern spezifischer Oligonucleotide, den Primern, sowie das Verlängern der freien 3'-OH-Enden mehrfach wiederholt. Hierzu werden in den Reaktionsansatz eine thermostabile DNA-Polymerase, ein Puffer für das Enzym, dNTPs sowie speziell für das gewünschte Amplifikat abgeleitete Primer zum *Template* gegeben. Die Grundlage dieses Verfahrens sind die Ideen von Kary Mullis, der 1993 für die Entwicklung der PCR den Nobelpreis für Chemie erhielt und die Molekularbiologie mit der Erstbeschreibung dieser Technik bereits 1986 revolutionierte [Mullis et al.1986].

Die *Settings* einer Standard-PCR in einem 25 µl Reaktionsansatz wurden, sofern nicht anders vermerkt, folgendermaßen gewählt:

<i>Template</i>	x µl (50 ng - 100 ng)
Primer	1 µl Primermix (10 pmol)
Puffer	2,5 µl 10x Polymerasebuffer
dNTPs	1 µl (2 mM)
MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl (optional)
Polymerasen:	
Ampli-Taq-Gold	0,25 µl
House-Taq	1 µl
Fire-Taq	0,5 µl
nukleasefreies ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

Die Menge des *Templates* richtete sich nach dem Molekül auf dem die Reaktion ablaufen soll. Von fertigen Konstrukten bzw. Plasmiden wurden zwischen 50 und 100 ng eingesetzt.

Amplifikation von FeLV-Δisu-p15E au pCal-n (Abschnitt 3.1.1)

Um die Sequenz des von FeLV-Δisu-p15E in den Drosophila Expressionsvektor zu klonieren, mussten die Schnittstellen und der Leserahmen verändert werden. Der Vektor pMT/Bip/V5-HisC hat eine 100 Basenpaare umfassende *Multiple-Cloning-Site* (MCS). Damit wären alle Fusionskonstrukte jenseits der letzten C-terminalen Restriktionsstelle außerhalb des Leserahmens des rekombinanten Proteins. Wenn man das V5-Epitop und den Histidin-Taq an das gewünschte Protein fusionieren will, muss über den *reverse*-Primer eine Leserahmenverschiebung von +2 bzw. -1 induzieren. Zusätzlich wurde das Fragment mit den Schnittstellen BglII und XhoI versehen.

*Template:* pCal-n-FeLV-Δisu-p15E.  
*Primer:* FeLV-A-for\_BglII  
 FeLV-A-rev\_XhoI  
*Zyklus* 95°C/10min-**95°C/30s-52°C/30s-72°C/30s**-72°C/10min  
 -----**40x**-----

Amplifikation und Mutation von KoRV-p15E (Abschnitt 3.3.2)

Um die Epitope der monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 in die Ectodomäne des KoRV-p15E einzubringen, wurden sequentiell zwei Mutagenese-PCRs durchgeführt.

## 1. Generierung von KoRV-p15E2-AB:

*Template:* pCal-n-KoRV-p15E  
*Primer:* KoRV-p15E-for  
 KoRV-p15E2-AB  
*Zyklus (40x):* 95°C/10min-**95°C/30s-42°C/60s-72°C/45s**-72°C/10min  
 -----**40x**-----

## 2. Generierung von KoRV-p15E2-ABC

*Template:* KoRV-p15E2-AB (aus 1.)  
*Primer:* KoRV-p15E-for  
 KoRV-p15E2-C  
*Zyklus (40x):* 95°C/10min-**95°C/30s-48°C/60s-72°C/45s**-72°C/10min  
 -----**40x**-----

Kolonie-PCR

Zum Schnelltest transformierter Bakterien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Der Ansatz entsprach einer Standard-PCR im 25 µl Maßstab. Dabei wurde ein Bakterien-Klon mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Die an der Spitze heftende Kolonie wurde leicht im fertigen PCR-Ansatz verrieben. Durch den initialen Denaturierungsschritt wurden die Bakterien lysiert und die Plasmid-DNA, welche dann als *Template* dient, freigesetzt, sofern die Transformation zuvor erfolgreich war.

SYBR-Green-Realtime-PCR

Die SYBR-Green-*Realtime*-PCR ist der ursprünglichen Methode der *Realtime*-PCR am nächsten. Sie basiert auf der Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes. Die ersten *Realtime*-Assays verwendeten Ethidiumbromid, heutzutage ist es das sensitivere SYBR-Green. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich ebenfalls in den DNA-Doppelstrang ein. Es kommt mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg. Da die Einlagerung in die DNA nur unspezifisch erfolgt, kann man anhand der Fluoreszenz keine Unterscheidung der entstandenen PCR-Produkte treffen. Zur Überprüfung der Spezifität wird eine Schmelzkurvenanalyse des Reaktionsansatzes nach jedem Lauf durchgeführt. Denaturieren die Doppelstränge bei ihrer spezifischen Schmelztemperatur wird der interkalierte Farbstoff freigesetzt und es kommt zu einem plötzlichen Fluoreszenzabfall. Somit ist jeder Signal-Peak (=Intensitätsveränderung) für ein Produkt spezifisch. In dieser Arbeit wurden die *Realtime*-PCR-Analysen zur Quantifizierung der FoxP3 mRNA mit diesem System durchgeführt.

Es wurde für jede Probe die gleiche Menge an cDNA als *Template* eingesetzt. Zusätzlich zu der Amplifikation von FoxP3 wurde GAPDH mitgeführt und von jedem Gen wurden dreier Replikate gemessen. Nach jedem Lauf wurde zur Spezifitätsverifizierung eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Ct-Werte der mit ISU-Homopolymer oder PERV-p15E inkubierten Proben wurde auf die der unbehandelten Probe bezogen und der  $\Delta$ Ct-Wert gebildet.

Reaktionsansatz:

<i>Template</i>	x $\mu$ l (50-70 ng)
2x Mastermix (Stratagene, La Jolla, USA)	12,5 $\mu$ l
Reference Dye (Rox, 1:500)	0,375 $\mu$ l
Primermix (FoxP3-for und FoxP3- rev; 10pMol)	1 $\mu$ l
nukleasefreies Wasser	ad 25 $\mu$ l

Reaktionszyklus:

95°/10min–95°C/30s–**55°C/45s–72°C/30s–72°C/10min**–ab 56°C (Schmelzkurve)  
 -----**40x**-----

### 2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Ein Verfahren zur Trennung von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld ist die Agarosegelelektrophorese. 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 Wanderungsgeschwindigkeit wird durch verschiedene Faktoren, wie die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung, beeinflusst. Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarosegel indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres

Molekulargewichtes. Die bei der Agarosegelelektrophorese eingesetzte Agarosekonzentration ist abhängig von dem DNA-Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Trennung der Fragmente erfolgen soll.

Zur Trennung von PCR-Produkten <500 Bp wurden 1,5%ige (w/v) und zur Trennung von Plasmiden und großen DNA-Molekülen 1 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in der entsprechenden Konzentration in TAE-Puffer aufgekocht und dann zum Erstarren ( $T < 40^{\circ}\text{C}$ ) luftblasenfrei in die vorbereitete Gießkammer dekantiert. Die Proben wurden alle in der entsprechenden Menge mit 10x-DNA-Ladepuffer versehen und anschließend die Geltaschen beschickt. Die Elektrophorese wurde bei 5-8 V/cm<sup>2</sup> durchgeführt, das entspricht einer eingestellten Spannung von ~80 V für ein kleines Gel (BioRad Kammern) und ~120 V für ein großes Gel (BioRad-Kammern). Zur Auswertung des Gels wurde es für 20 min in einem Ethidiumbromid-Bad getränkt. In dieser Zeit interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff in die große Furche der DNA bzw. lagert sich an die negativ geladenen Einzelstränge der Nukleinsäure durch die positive Eigenladung an. Mit einem Transilluminator können die Moleküle durch eine Fluoreszenzanregung mit ultraviolettem Licht (254nm) sichtbar gemacht werden. Die abgestrahlte Wellenlänge ist energieärmer und somit im sichtbaren Bereich  $E_{\text{max}}=590\text{nm}$ . Die Gele wurde mittels Videoprint oder digital mit dem BioRad GelDoc200 dokumentiert.

#### 50xTAE-Puffer

2M Tris  
1M Acetat  
50mM EDTA

#### 10xDNA-Ladepuffer

5 ml  
350  $\mu\text{l}$   
250  $\mu\text{l}$   
200  $\mu\text{l}$   
ad 10ml

Glycerol  
gesättigte Brohmphenolblaulösung  
10%ige Xylen-Cyanol-Lösung  
50x TAE  
ddH<sub>2</sub>O

### **2.2.1.3 Gel-Extraktion**

Um DNA-Fragmente aus dem Agarose-Gel zu extrahieren, wurde mit dem DNA-Extraction-Kit von Genomed (Bad Oeyenhausen, Deutschland) gearbeitet. Es basiert auf dem Aufschmelzen der Agarose und dem Binden der DNA an eine Matrix. Während Agarose nicht oder nur unspezifisch an die Matrix bindet und durch Waschschrte entfernt wird, kann DNA im letzten Schritt spezifisch von der Matrix eluiert werden. Es wurde nach dem Hersteller-Protokoll verfahren und immer mit 50 $\mu\text{l}$  und auf 70°C erwärmten ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### **2.2.1.4 Restriktionsverdau**

Um DNA zu schneiden, werden vorzugsweise Restriktionsendonucleasen vom Typ II verwendet. Der Vorteil, den diese Subklasse der Enzyme besitzt besteht darin, dass sie im Unterschied zu den ebenfalls beschriebenen Typen I und III zum Schneiden kein ATP benötigen und die Aktivität direkt in der zumeist palindromischen Erkennungssequenz entfalten. Aufgrund der verschiedenen spezifischen Schnittparameter die ein Enzym besitzt, können durch das Schneiden entweder sogenannte glatte Enden („*blunt ends*“) oder klebrige Enden („*sticky ends*“) entstehen.

Desweiteren sind Ionenkonzentration, geregelt durch enzymespezifische Puffer und Inkubationstemperatur entscheidend für eine optimale Aktivität. In dieser Arbeit wurde alle Restriktionsspaltungen bei 37°C für 2 h mit 5 U Enzym in dem jeweilig geforderten Puffer inkubiert. Die DNA Menge betrug, soweit nicht anders beschrieben 1µg pro Ansatz. Kontrolliert wurden die Restriktionen mittels Agarosegelelektrophorese.

### 2.2.1.5 Ligation

Dieser Vorgang umschreibt das enzymatisch gesteuerte, kovalente Verknüpfen zweier DNA-Moleküle miteinander und wird von dem Enzym DNA-Ligase realisiert. Diese Verknüpfung wird dadurch spezifisch, dass beide DNA-Moleküle zuvor mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten wurden, bzw. mit einem Restriktionsenzym das kompatible Enden zum anderen erzeugt. Spezifische Kompatibilität entsteht demzufolge bei Enzymen, die „sticky ends“ erzeugen. Die Ligase ist in der Lage eine Phosphodiesterbindung zwischen der 5´-Phosphat-Gruppe und der 3´OH-Gruppe der Desoxyribose zu knüpfen. Verwendet wurde hier die T4-DNA-Ligase der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland). Ein Reaktionsansatz hatte soweit nicht anders beschrieben ein Volumen von 20µl und enthielt ca. 50 ng Vektor, dazu 3-5 facher molarer Überschuss an *Insert*, 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Buffer (NEB, USA) und die Differenzmenge zu 20 µl ddH<sub>2</sub>O. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei konstant 16°C in einem PCR-Cycler um optimale Bedingungen zu schaffen.

### 2.2.1.6 Herstellen kompetenter Bakterien

Um Bakterien artifizuell kompetent zu machen, wurde nach dem Rubidiumchlorid-Protokoll (Qiagen, Hilden, Deutschland) gearbeitet. Aus einer Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Medium 1:1000 angeimpft und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD600 von 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde für 5 min auf Eis gekühlt und die Bakterien Beckman-Zentrifuge pelletiert (10 min, 4.000 g, 4°C). Anschließend folgte die Resuspendierung des Pellets in 30 ml TFB I-Puffer. Der Ansatz wurde für 90 min auf Eis inkubiert und die Bakterien anschließend erneut pelletiert (10 min, 4.000 g, 4°C). Das Pellet wurde daraufhin in 4 ml eiskaltem TFB II-Puffer resuspendiert und zu je 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Beide Lösungen müssen steril filtriert und bei 4°C gelagert werden.

#### TFB I (pH 5,8)

100 mM	RbCl
50 mM	MnCl <sub>2</sub>
30 mM	Kaliumacetat
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
15 % (v/v)	Glycerol

#### TFB II (pH 6,8)

10 mM	RbCl
10 mM	MOPS
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
15 % (v/v)	Glycerol

### 2.2.1.7 Transformation

Bakterien sind in der Lage, freie DNA aufzunehmen. Diese Fähigkeit nennt man Kompetenz. Es gibt natürlich kompetente und artifiziell kompetente Bakterien. Durch die gezielte Veränderung von Inkubationsparametern der Bakterien zusammen mit der DNA kann man sie dazu bringen, diese aufzunehmen. Dieser Vorgang ist als Transformation definiert. Die hier verwendeten Bakterien vom Stamm *Escherichia coli* One Shot® Top10 wurden ausschließlich nach dem folgenden Protokoll transformiert: Die bei -80°C gelagerten Zellaliquote (je 100µl) wurden auf Eis aufgetaut und 30 min mit 10µl des Ligationsansatzes auf Eis inkubiert. Anschließend folgten 45s Hitzeschock bei 42°C und eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Danach wurde der Ansatz mit 500 µl auf 37°C vorgewärmten LB vermischt und für 60 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Dann wurden die Bakterien mit einer Tischzentrifuge pelletiert (1min / 16000xg) und in 100 µl LB resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf einer LB-Platte mit geeignetem Selektionsmarker ausgestrichen.

Wurde eine erneute Transformation eines bereits isolierten *Insert*-tragenden Plasmids durchgeführt, unterschied sich diese nur in der applizierten DNA Menge, die hier im Bereich um 1 ng pro Transformationsvorgang lag.

### 2.2.1.8 Plasmid-Präparation

Plasmid-Mini-Präparation (Genomed, Bad Oeyenhausen, Deutschland)

Die Plasmidisolierung mit diesem Kit basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien und der anschließenden Reinigung der Plasmid-DNA über eine Anionenaustauscher-Matrix. Sie wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte immer mit 50 µl auf 70°C erhitztem ddH<sub>2</sub>O.

Plasmid-Maxi-Präparation

Das Prinzip dieser Reinigung gleicht dem der Plasmid-Mini-Präparation. Der Unterschied liegt hier in der maximal einzusetzenden Kulturmenge. Eine Plasmid-Maxi-Prep wurde mit einer 100 ml Übernachtskultur der plasmidtragenden Bakterien durchgeführt. In dieser Arbeit wurde das Plasmid-Maxi-Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet.

Endo-Free Plasmid-Maxipräparation

Um eukaryontische Zellen mit einem heterologen Plasmid zu transfizieren, empfiehlt es sich, das bakteriell amplifizierte Plasmid endotoxinfrei zu isolieren. Endotoxin setzt die Transfektionseffizienz stark herab und kann bei Transfektionen mit geringer Effizienz zum Mislingen des Versuches führen.

Vor der Elution wird ein Schritt zum Entfernen des Endotoxins mittels eines speziellen Puffers geschaltet. In dieser Arbeit wurde das Endo-Free-Maxi-Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet.

### 2.2.1.9 Sequenzierung

Zur finalen Analyse von Klonierungen wurde die Nukleotidsequenz eines Konstruktes überprüft. Die hier verwendete Methode basiert auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger [Sanger et al., 1977]. Dabei werden unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide in das Reaktionsgemisch gegeben. Durch den Einbau eines Didesoxy-Nukleotids in eine Polynukleotidkette während einer PCR-Reaktion bricht die Polymerisierung ab, da der Polymerase kein freies 3'-OH Ende als Substrat zur Verfügung steht. Die Syntheseabbrüche erfolgen statistisch. Die entstandenen unterschiedlich langen Bruchstücke werden mittels Kapillarelektrophorese getrennt und analysiert. Diese beiden Schritte wurden vom hauseigenen Service übernommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels des Edit-Sequence-Programms der DNA-Star-Software (Laser Gene, Madison, USA).

#### Ansatz zur PCR

Plasmid:	200 ng
Primer:	5 pMol
BigDye®	2 µl (Terminator v3.1 Nukleotidgemisch, Applied Biosystems)
5xPuffer	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

### 2.2.1.10 Proteinexpression in Bakterien

Die bakterielle Expression rekombinanter Proteine erfolgte mit *E.coli* BL21 Zellen. Einen Tag vor der Expression wurden 3 ml Übernachtskulturen eines charakterisierten Klon einer Transformations-Platte oder eines Glycerol-Stocks in verschiedenen Verdünnungsstufen in LB-Amp (100µg/ml Ampicillin) angeimpft. Am Tag der Expression wurde die Hauptkultur aus einer log-Phase-Vorkultur 1:1000 in LB-Amp (100µg/ml Ampicillin) angeimpft. Das Expressionvolumen betrug, soweit nicht anders vermerkt, 500 ml. Die Kultur wurde bei 37°C und 220 rpm bis zur OD<sub>600</sub>=0,5 geschüttelt. Dann erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1mM. Nach 3 Stunden wurden die Bakterien pelletiert (6000 x g; 15 min; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.11 Isolation von Nukleinsäuren aus eukaryontischen Zellen

Zur Isolation von Nukleinsäuren wurden Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) eingesetzt. Zur Isolation der DNA kam das DNA-Whole-Blood-Kit zum Einsatz. Die gesamte RNA wurde mittels des RNeasy-Kits aus den Zellen extrahiert. Alle Isolationen erfolgten nach den Herstellerangaben. Bei der Verwendung des RNeasy-Kits wurde der optionale Schritt des DNase-Verdau auf der Säule stets durchgeführt.

### 2.2.1.12 Reinigen von DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion stellt eine Methode zur Reinigung von DNA-Molekülen dar. Eingesetzt wurde sie hier zur zusätzlichen Reingung von Plasmid-DNA von zellulären Proteinen, proteinkomplexierter genomischer DNA und zum Entfernen von Restriktionsenzymen, Ligasen oder anderer DNA-modifizierender Enzyme. Die DNA-haltige Lösung wurde mit gleichem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, Sigma, Steinheim) versetzt. Kleine Volumina wurden zunächst auf mindestens 100 µl mit Wasser aufgefüllt. Nach intensivem Mischen wurde durch Zentrifugation (14000xg, 2 min, RT) wieder eine Phasentrennung erreicht. Die obere DNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Ethanol-fällung unterzogen.

### 2.2.1.13. Ethanol-fällung von Nukleinsäuren

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

### 2.2.1.14 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch bestimmt. Hierbei wird das Lambert-Beer'sche Gesetz zur Berechnung angewendet. Es beschreibt die durch eine chemische Verbindung bedingte Lichtabsorption beim Durchqueren der Küvette:

$$\Delta E = \epsilon_{\text{mol}} * c * d$$

(E: die im Photometer gemessene Extinktion, bzw. die Extinktionsdifferenz;  $\epsilon_{\text{mol}}$ : der molare Extinktionskoeffizient in  $\text{L} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ ; c: die Konzentration der chemischen Verbindung in mol/L; d: Schichtdicke der Küvette in cm )

Bei Nukleinsäuren werden die Wellenlängen  $\lambda = 260 \text{ nm}$  (Nukleinsäuren) und  $280 \text{ nm}$  (kontaminierende Proteine) bestimmt. Die Schichtdicke der verwendeten Küvetten betrug 10 mm. Zusätzlich kann der Reinheitsgrad des Isolats durch den Quotienten aus  $\lambda = 260 \text{ nm}$  und  $280 \text{ nm}$  angegeben werden. Optimal ist eine Ratio um 1,9.

### **2.2.1.15 Reverse Transkription**

Für die Analysen der Transkriptionsfrequenz von FoxP3 wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. cDNA ist stabiler als RNA und somit leichter zu handhaben. Hierfür wurde das First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Das Kit basiert auf der reversen Transkriptase von MuLV. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers zur cDNA Synthese mit anschließender Verwendung in einem PCR-Verfahren gearbeitet. Für die Umschreibung wurden die mitgelieferten Random-Hexamer-Primer verwendet. Die RNA-Mengen wurden aufeinander abgeglichen, so dass in jeder Probe die gleiche Menge Gesamt-RNA zur Verfügung stand. Die generierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### **2.2.2 Biochemische Methoden**

#### **2.2.2.1 Kopplung von Peptiden**

Aus früheren Versuchen der der Arbeitsgruppe zeigte sich, dass Peptide mit einem Molekulargewicht unter 4 kDa allein nicht in der Lage sind, Effekte an Immunzellen zu induzieren [Denner. et al., 1994]. Deshalb müssen sie an größere Trägerproteine gekoppelt oder selbst zu Polymeren verknüpft werden. In dieser Arbeit wurde die Kopplung zu Homopolymeren gewählt, um eine höhere Valenz (Multiplizität) an wirksamen Peptiden in den Assays zu erreichen.

Für die Untersuchung zur Immunsuppression wurden Peptide verwendet, die in ihrer Sequenz der immunsuppressiven (ISU-)Domäne von HIV-1 entsprachen. Als Kontrollpeptide wurde ein HIV-RAN-Peptid (RAN für „random“) verwendet, welches aus den gleichen Aminosäuren aufgebaut ist, deren Reihenfolge aber nicht der in HIV-1 codierten Sequenz entspricht. Somit entsprachen Molekulargewicht und Gesamtladung dem Original-ISU-Peptid. Die hier verwendete Methode zur Kopplung beruht auf dem Einsatz eines reaktiven Carbodiimid, dem EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid). Der Crosslinker EDC reagiert mit den Carboxylgruppen der Peptide und bildet ein reaktives Zwischenprodukt, welches mit primären Aminen eine Amidbindung eingehen kann.

Die HPLC-gereinigten Monomere der Peptide wurden über die Firma Jerini (Berlin, Deutschland) bezogen. Das mittlere Molekulargewicht betrug 2,3 kDa. Um eine effektive Kopplung zu erreichen wurde folgendermaßen vorgegangen: 8 mg Peptid wurden mit 38,4 mg EDC versetzt und gemischt. Durch die Zugabe von Sulfo-NHS, einem Succinimidanalogon, konnte die Halbwertszeit des reaktiven Esters in den Stunden Bereich erhöht werden. Die Ausbeute der bei neutralem pH-Wert ablaufenden Reaktion konnte somit auf ca. 20% erhöht werden. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 Tage gegen 1x PBS bei 4°C dialysiert (MWCO:10000 Da). Anschließend wurden Aliquots hergestellt und diese einer Proteinbestimmung unterzogen.

### 2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in wäßrigen Lösungen wurden zwei verschiedene Methoden herangezogen, zum einen der Bio-Rad Protein Assay und zum anderen der BCA Protein Assay Kit von Pierce. Die Bestimmung erfolgte jeweils mittels einer Eichgeraden, für die als Standard für die Quantifizierung bei beiden Methoden BSA in Konzentrationen von 200, 400, 600, 800, 1000 und 1200 µg/ml eingesetzt wurde. Von allen Proben wurden Dreifachbestimmungen angefertigt.

#### Bio-Rad Protein Assay

Der Bio-Rad Protein Assay nutzt eine von Bradford et al. beschriebene Methode [Bradford, 1976], die auf einer Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau R-250 an Seitenketten von Proteinen basiert, wodurch das Absorptionsmaximum von 470 nm nach 595 nm verschoben wird. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte pro Well 195 µl des Bradfordreagenz (1:5 Verdünnung der Stammlösung in Wasser) vorgelegt und mit 4 µl Probe, Standard oder Wasser gut durchmischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei RT. Dann wurden die Proben im Tecan Elisa Reader bei 560 nm vermessen und die Proteinkonzentration im Vergleich zur Eichgeraden bestimmt.

#### Pierce Protein Assay

Die Proteinbestimmung nach Pierce beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen durch die Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin. Die einwertigen Kupferionen werden jeweils durch zwei Moleküle BCA in der Biuret-Reaktion chelatiert, dieser Komplex hat ein Absorptionsmaximum von 562 nm. Für den Pierce Protein Assay wurde zuerst die Gebrauchslösung aus BCA Reagenz A und BCA Reagenz B hergestellt, hierfür wurden 50 Teile Reagenz A mit einem Teil Reagenz B gemischt. Von der Gebrauchslösung wurden 200 µl pro Well einer Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend 10 µl Probe, Standard oder Wasser zugegeben und die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben im Tecan Elisa Reader bei 570 nm mit einer Referenz von 492 nm vermessen und die Proteinkonzentration im Vergleich zur Eichgeraden bestimmt.

### 2.2.2.3 Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Darstellung der rekombinanten Proteine wurde die diskontinuierliche Tricin-Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet [Schagger et al., 1987]. Hierbei werden die Proben durch ein Reduktionsmittel wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) denaturiert und bilden einen Komplex mit dem negativ geladenen SDS. Pro Aminosäure ist das denaturierte Protein mit ca. zwei Molekülen SDS beladen. Somit steht die Länge der Peptidkette in einem festen Verhältnis zur Ladung und die Eigenladung des Proteins wird in der Regel vernachlässigbar. Die Trennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Wanderungszeiten der nun gleich geladenen Moleküle durch die Polyacrylamidmatrix

im elektrischen Feld. Bei konstanter Stromstärke und konstantem Vernetzungsgrad der Matrix hängen die Wanderungszeiten nur noch von der Gesamtladung des Moleküls ab, welche sich aus der Länge der Polypeptidkette ergibt. Damit erreicht man eine Trennung der Moleküle nach dem Molekulargewicht. Tricin bezeichnet das verwendete Puffersystem und diskontinuierlich steht für eine Fokussierung der Proteine vor der eigentlichen Trennung in einem Sammelgel. Sammel- und Trenngel unterscheiden sich hierbei im pH-Wert was zu einer zeitweisen Ausbildung eines Feldstärkegradienten im Sammelgel führt, der es den Proteinen in einer Spur ermöglicht, in etwa zur gleichen Zeit in das Trenngel einzutreten.

Die Stärke der Gele betrug 1,5 mm. Die Trenngele hatten, soweit nicht anders vermerkt, einen Polyacrylamidanteil von 10% und die Sammelgele von 4%. Zur Abschätzung der Molekulargewichte wurde als Massenstandard 10 µl des Markers SeeBlue® Plus2 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit gleichem Volumen Tricin-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

Die Trennung erfolgte vertikal bei einer Stromstärke von 0,03 A im Sammelgel und 0,05 A im Trenngel in der Gelapparatur Hoefer SE 250. Durch eine Coomassie-Blau Färbung wurden die getrennten Proben sichtbar gemacht. Die Färbung erfolgte für 30 min und die anschließende Entfärbung für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur. Alternativ konnte das Gel auch zur Western-Blot Detektion eingesetzt werden.

#### Kathodenpuffer

100 mM Tris-Base (pH=8,25)  
100 mM Tricin  
0,1% (w/v) SDS

#### Anodenpuffer

200 mM Tris-Base (pH=8,9)

#### 2 x Tricin-Probenpuffer

100 mM Tris-Base (pH=6,8)  
24 % (w/v) Glycerol  
08 % (w/v) SDS  
0,04% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250  
10 % (v/v) β-Mercaptoethanol

#### Gelpuffer

3 M Tris-Base (pH=8,45)  
0,3% (w/v) SDS

#### Färbelösung

50% (v/v) Methanol  
10% (v/v) Essigsäure  
0,2% (v/v) Coomassie Brilliantblau G-250

#### Entfärbelösung

25% (v/v) Methanol  
10% (v/v) Essigsäure

### **2.2.2.4 ECL-Entwicklung**

Auch dieser Methode liegt eine enzymatische Reaktion zu Grunde. Dabei entstehen Photonen während einer Spaltung von Wasserstoffperoxid unter Verwendung einer Substratlösung aus Luminol (5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion) und

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die beiden Reagenzien werden 1:1 (v/v) gemischt. Die Membran wird dann 2 min mit der Substratlösung inkubiert. Anschließend wird die Membran in eine Cassette gelegt. In der Dunkelkammer wird ein Photofilm (CL-XPosure™Film, PIERCE, Illinois, USA) auf die Membran gelegt, welcher die entstehenden Photonen detektiert. Die Belichtungszeit ist je nach Intensität des Signals unterschiedlich. Der Film wird nach der Detektion in die Entwicklungsmaschine Curix 60 (Agfa, Köln, Deutschland) eingelegt. Abschließend wurde der Film mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Der entwickelte Film wurde am Gel Doc 2000 (Bio-Rad, München, Deutschland) digitalisiert.

### **2.2.2.5 CBP-Affinitätschromatographie**

Die nach der Expression pelletierten Bakterien wurden in 40 ml Bindungspuffer resuspendiert und für 3 min mit Ultraschall (60 % Duty cycle, Output control 5) auf Eis aufgeschlossen. Das Lysat wurde anschließend für 30 min bei 25000xg in einer Beckman-Zentrifuge sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Aus dem Proteingemisch wurde dann affinitätschromatographisch über eine Calmodulinsäule das rekombinante Zielprotein gereinigt. Dazu wurde als Säulenmaterial eine Sepharosematrix verwendet, die kovalent mit Calmodulin (CaM) gekoppelt ist (Stratagene, La Jolla, USA). In Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen bindet der N-terminale CBP-Tag des rekombinanten Proteins an CaM und andere Proteine werden durch mehrere Waschschriffe entfernt. Anschließend wird Ca<sup>2+</sup> durch Zugabe von EGTA, einem Chelator, komplexiert, so dass sich die Bindung zwischen CBP und CaM löst und das Fusionsprotein eluiert werden kann.

Vor der eigentlichen Säulenchromatographie wurde das CaM-Säulenmaterial aus dem Lagerpuffer in CaCl<sub>2</sub> Bindungspuffer überführt. Das Gemisch aus Säulenmaterial und Lagerpuffer wurde einige Minuten sedimentiert und der Überstand dann vorsichtig abgegossen. Danach wurde es in Bindungspuffer resuspendiert. Mit dieser Suspension wurde daraufhin eine 15 cm lange Plexiglassäule (Pharmacia) beladen und mit 5 Säulenvolumen Bindungspuffer gewaschen. Als nächstes wurde bei 4 °C über Nacht das Proteinlysate in einem geschlossenen Kreislauf mehrmals über die Säule gepumpt. Am nächsten Tag wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Bindungspuffer gewaschen, um alle nicht gebundenen Proteine zu entfernen. Anschließend wurde das gebundene Protein mit Elutionspuffer von der Säule eluiert, wobei mit einem Fraktionssammler 20 Fraktionen von jeweils 1,5 ml gesammelt wurden. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt und die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt. Danach wurde die Säule nochmals mit 5 Säulenvolumen Elutionspuffer gewaschen und mit jeweils 3 Säulenvolumen Regenerationspuffer 1 bis 3 regeneriert. Nachdem die Säule zuletzt mit 5 Säulenvolumen Bindungspuffer äquilibriert wurde, konnte sie erneut verwendet werden. Für die weitere Verwendung in Assays wurde das rekombinante Protein umgepuffert bzw. dialysiert, da das EGTA des Elutionspuffers Ionenabhängige Reaktionen inhibieren könnte.

CaCl<sub>2</sub>-Bindepuffer

50	mM	Tris-HCl (pH=8,0)
150	mM	β-Mercaptoethanol
1	mM	Magnesiumacetat
1	mM	Imidazol
2	mM	CaCl <sub>2</sub>

Elutionspuffer

50	mM	Tris-HCl (pH=8,0)
10	mM	β-Mercaptoethanol
2	mM	EGTA
150	mM	NaCl

Regenerationspuffer 1 (pH=8,6)

100	mM	NaHCO <sub>3</sub>
2	mM	EGTA
1	M	NaCl
2	mM	CaCl <sub>2</sub>

Regenerationspuffer 2

1	M	NaCl
2	mM	CaCl <sub>2</sub>

Regenerationspuffer 3 (pH=4,4)

100	mM	NaHCO <sub>3</sub>
2	mM	CaCl <sub>2</sub>

**2.2.2.6 Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose**

Um Proteine zu reinigen, welche im Drosophila-Expressions-System hergestellt wurden, kann man die affinitätschromatographische Reinigung über eine Ni-NTA-Matrix durchführen. Das jeweilige rekombinante Protein wurde während der Klonierung mit einem C-terminalen 6xHis-Tag versehen. Dieser ermöglicht über den Imidazolring des Histidins eine Wechselwirkung mit der geladenen Matrix. Vor dem Beladen der Säule mit dem Zellkulturüberstand wurde sie mit 5fachem Säulenvolumen Lysispuffer, welcher 5mM Imidazol enthält äquilibriert. Dann wurde entweder das Zelllysate, welches sich ebenfalls in Lysispuffer befand auf die Säule gegeben, oder bei exportierten Proteinen, der Zellkulturüberstand. Es folgten drei Waschstschritte mit je 5 fachem Säulenvolumen Waschpuffer, welcher 10mM Imidazol enthielt. Dadurch wurden unspezifisch gebundene Proteine bereits von der Matrix gelöst. Eluiert wurde das Protein mit einem Puffer, der 400mM Imidazol enthielt. Das Imidazol konkurriert mit dem Histidin um die Bindungsstelle an der Ni-NTA-Matrix und ist in der Lage das Histidin zu verdrängen. Damit löst sich das rekombinante Protein von der Matrix und eluiert von der Säule. Eluiert wurde mit 10x1ml Elutionspuffer.

Puffer:

	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 8,0)
	300 mM	NaCl
Bindepuffer	+5 mM	Imidazol
Waschpuffer	+10 mM	Imidazol
Elutionspuffer	+400 mM	Imidazol

### 2.2.2.7 Molekulargewichtsausschluss-Zentrifugation

Um eine Trennung der Homopolymere in hochmolekulare und niedermolekulare Polymere zu erreichen, wurde diese durch eine Matrix zentrifugiert. Verwendet wurde das Vivaspin 500 System (VivaScience, Hannover, Deutschland). Die Säulen hatten eine Ausschlussgröße von MWCO 30000 Da. Man erhielt eine Fraktion mit Homopolymeren größer als 30 kDa und eine Fraktion mit homopolymeren kleiner als 30 kDa. Eingesetzt wurden 500µl der auf 1mg/ml eingestellten Homopolymere. Der Zentrifugationsschritt dauerte 30min (5000xg, RT) in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Deutschland). Die Fraktionen wurden einer Proteinbestimmung unterzogen und anschließend im IL-10-ELISA eingesetzt.

### 2.2.3 Immunologische Methoden

#### 2.2.3.1 Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Charakterisierung der induzierten Antikörper wurde der ELISA eingesetzt. Bei diesem Verfahren können durch intermolekulare Wechselwirkungen, zum Beispiel Protein-Protein-Interaktionen, biologische Moleküle qualitativ und quantitativ beschrieben werden. Hier wurden spezifische Antikörper gegen die zur Immunisierung eingesetzten Antigene gesucht.

Als Erstes wurde das Antigen auf ELISA-Platten (Nunc, USA) adsorbiert (=coaten) (Peptide 100 ng/Well / 37°C / über Nacht; Proteine 100 ng/Well / 37°C / 2h). Danach wurden die Platten 3x mit PBS-T (=PBS<sub>ohne</sub> mit 0,05% Tween 20) gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Serum in entsprechender Verdünnung / 37°C / 2h). Wiederum schloss sich ein Waschschriff an (3x mit PBS-T). Der Sekundärantikörper wurde für 2h bei 37°C in entsprechender Verdünnung auf den Platten inkubiert. Es folgte der finale Waschschriff (6x mit PBS-T). Die Entwicklung erfolgte durch Zugabe der Substratlösung für 30 min im Dunkeln. Durch Zugabe von 2,0 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde die Reaktion abgestoppt. Anschließend wurden die Farbreaktion bei 492 nm / 620 nm ELISA-Reader (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen und die Daten mit Microsoft Excel ausgewertet.

#### Substratlösung

OPD-Tablette (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in 30 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst +250µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 2.2.3.2 IL-10-Cytokin-ELISA

Um die IL-10 Expression von humanen PBMCs nach Inkubation mit HIV-ISU-Homopolymer bzw. PERV-p15E zu untersuchen, wurden frische PBMCs gesunder Spender isoliert. Es wurden 100µl Zellen (3x10<sup>6</sup> Zellen/ml) pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Diese wurden für 24h mit HIV-ISU-Homopolymer, HIV-RAN-Homopolymer, PERV-p15E oder Medium inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen

und im IL-10-ELISA (Biosource, Camarillo, USA) eingesetzt. Es wurde nach dem Hersteller Protokoll verfahren.

Der Farbumschlag wurde im Photometer bei 450 nm gemessen und in Bezug zu einer mitgeführten Standardreihe gesetzt.

### **2.2.3.3 Analyse am Durchflusscytometer**

Zur Analyse der Zusammensetzung der Lymphocytenpopulation wurde ein Durchflusscytometer verwendet. Es wurden frische PBMCs gesunder Spender isoliert. Es wurden 100  $\mu$ l Zellen ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml) pro Well in einer 96-Well-Palitte ausgesät. Diese wurden für 24h mit HIV-ISU-Homopolymer, PERV-p15E oder Medium inkubiert. Anschließend wurden sie mit folgenden Antikörpern markiert: anti-CD4-APC, anti-CD25-PE, anti-CD-3-FITC und anti-GITR-FITC. Dafür wurden die entsprechenden Proben aus den Wells in FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und es wurde mit 800  $\mu$ l PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde wiederum der Überstand verworfen und die entsprechenden Antikörper zur Markierung spezieller Lymphocyten in 100  $\mu$ l PBS gegeben. Die Inkubationszeit betrug 10 min. Anschließend wurden die Proben wie zuvor gewaschen und mit 250  $\mu$ l Formaldehyd fixiert. Es folgte die Analyse am FACScalibur (BD-Biosciences, San Jose, USA). Pro Messung wurden die Daten von  $2 \times 10^4$  Zellen registriert.

### **2.2.3.4 Epitop-Kartierung**

Zur Charakterisierung der Bindungsspezifitäten der induzierten Antikörper wurden diese einer Epitopkartierung unterzogen. Das Prinzip basiert auf der Bereitstellung von Peptiden, welche die potentiellen Epitope der induzierten Antikörper beinhalten. Die Peptide wurden auf einer Membran immobilisiert. Aus den Proteinen, die hier in Bezug auf Interaktion mit den induzierten Antikörpern untersucht werden sollten, wurden überlappende Peptidsets aus je 15 Aminosäuren abgeleitet. Die verwendete Membranen von HIV-1 IIIB, KoRV und FeLV-A umfassten jeweils die Aminosäuresequenz der Ectodomäne der TM-Proteine. Die Peptide der HIV-Membran verschoben sich immer um 2 Aminosäuren, die der KoRV-Membran und der FeLV-Membran um 3 Aminosäuren. Die Membranen wurden von der Firma Jerini (Berlin, Deutschland) bezogen.

Um ein Serum zu testen wurde die Membran 2h mit Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde das in Blockierungspuffer verdünnte Serum für 2h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben. Anschließend wurde 3 mal 10 min mit TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Rattenserum getestet und deshalb immer der peroxidasegekoppelter anti-Ratte IgG (1:5000) verwendet. Es folgte wieder eine Waschphase zur Reduktion des Hintergrundes mit TBS-T 3 mal für je 10 min. Die Detektion erfolgte mittels des ECL-Methode (Abschnitt 2.2.2.4).

Die Membranen können mehrmals verwendet werden und mussten vor jeder weiteren Kartierung einer Regeneration unterzogen werden. Die Membran wurde hierzu 2x

10min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde sie 3x 10 min mit Regenerationspuffer IIA, danach 3x 10 min mit Regenerationspuffer IIB inkubiert. Es folgte wieder ein Waschschrift von 10 min mit ddH<sub>2</sub>O. Als letztes wurde die Membran 3x10 mit TBS-T inkubiert. Zum Testen wurde das Kartierungsprotokoll ab der Inkubation mit dem Sekundärantikörper durchlaufen.

#### Blockierungspuffer

PBS  
5% (w/v) Magermilchpulver  
0,05% (v/v) Tween 20

#### TBS-T

TBS pH=8,0  
0,05 % (v/v) Tween 20

#### Regenerationspuffer IIA

8 M Harnstoff  
1 % (w/v) SDS  
0,1% (v/v) β-Mercaptoethanol

#### Regenerationspuffer IIB

50% (v/v) Ethanol  
10% (v/v) Essigsäure

### **2.2.3.5 Western-Blot**

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurde die Western-Blot eingesetzt. Grundlage dieser Methode ist eine Protein-Protein-Interaktion, in der Regel eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Zuvor werden Proteingemische mittels einer SDS-PAGE separiert und auf einer Nitrocellulose- oder PVDF-Membran immobilisiert. Den Vorgang der Immobilisierung nennt man Blot. Die hier verwendete Methode ist der Elektroblot. Die durch die SDS-PAGE negativ geladenden Proteine bewegen sich durch Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung der Anode. Die zur Detektion verwendeten Antikörper sind mit einem Enzym konjugiert, welches durch die Umsetzung eines Substrates ein Signal generiert. Dieses kann ein Farbumschlag oder das Aussenden von Licht sein.

Das Trenngel der Elektrophorese wurde für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Die verwendete PVDF-Membran (Porengröße 0,2 µm, Millepore, Schwalbach, Deutschland) wurde genau auf die Größe des Trenngels zugeschnitten, in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer ebenfalls äquilibriert. Als Schutz des Gels und der Membran wurde jeweils unter der Membran und über dem Gel eine Lage in Transferpuffer äquilibriertes Blotpapier gelegt. Durch Abrollen mit einer Pasteurpipette wurden Luftblasen zwischen Gel und Membran entfernt. Alles wurde in eine Semi-Dry-Blotkammer (TransBlot-Semi-Dry-Transfer Cell, BioRad) gelegt. Der Deckel der Kammer stellt die Kathode dar. Daraus ergibt sich von der Kathode zu Anode folgende Reihenfolge der Lagen in der Blotkammer: oberes Blotpapier, Trenngel, PVDF-Membran, unteres Blotpapier.

Das Blotten erfolgte für 30 Minuten bei 15 V. Danach wurde die Membran für 60 Minuten in Blockierungspuffer geschwenkt, um noch freie Bindungsstellen der Membran mit Protein zu sättigen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde die Membran 3x10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation des in

Blockierungspuffer verdünnten Sekundäntikörpers erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde wieder 3x10 Minuten gewaschen.

Die Entwicklung erfolgte mittels der Zugabe einer Substratlösung. Sie enthielt Diaminobenzidin (DAB) und 250 µl 30% Wasserstoffperoxid (Perhydrol®, Merk, Darmstadt). Bei ausreichender Anfärbung der Banden wurde die Reaktion mit ddH<sub>2</sub>O abgestoppt. Alternativ konnte eine Entwicklung mittels ECL-Reagenz erfolgen. Der Blot wurde eingescannt und anschließend in Folie eingeschweißt.

Zur Kontrolle von Rattenserum auf spezifisch induzierte Antikörper wurde das Western Blot Protokoll abgewandelt. Zwei verschiedene Vorgehensweisen wurden gewählt: Die Erste ist eine Kopplung einer herkömmlichen SDS-PAGE mit einem Elektro-Blot. Die Membran wird nach dem Blockierungsschritt in die einzelnen Spuren geschnitten und diese jeweils mit einem anderen Serum bzw. einer anderen Testflüssigkeit als Primäntikörper inkubiert. Das alternativ verwendete System ist eine Kapillar-Inkubationskammer. Zur Verwendung dieser Kammer wird ein präparatives SDS-Gel beladen und die getrennten Proteine anschließend auf eine Membran geblottet. Diese wird dann in eine Kammer mit einem Kapillarsystem gespannt. Jede Kapillare kann mit einem anderen Primäntikörper beladen werden und somit verschiedene Antikörper auf Bindung gegen das geblottete Antigen geprüft werden.

#### Blockierungspuffer

1 x PBS  
0,05 % (v/v) Tween-20  
5% (w/v) Trockenmilchpulver  
(Sucofin, Zeven, Deutschland)

#### Waschpuffer

1 x PBS  
0,05 % (v/v) Tween-20

#### Färbelösung (50ml)

0,025% Tris/HCl  
25 mg Diaminobenzidin  
250 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## **2.2.4 Virologische Techniken**

### **2.2.4.1 *in vitro* -Neutralisationstest**

Dieser Test wurde angewendet, um die induzierten Antikörper auf ihre Fähigkeit zur Neutralisation von Virusinfektion *in vitro* zu testen. Das Verfahren gliedert sich in zwei Hauptschritte, welche nach virusspezifischen Parametern durchgeführt werden. Der erste Schritt ist eine 72 stündige Inkubation von susceptiblen Zellen mit einem Serum-Virus-Gemisch. Im zweiten Schritt wird mittels *Realtime*-PCR die Provirusintegration des jeweiligen Virus in Relation zu einer Kontrolle (Zellen inkubiert mit Präimmunserum und Virus) bestimmt. In dieser Arbeit wurde der Test für die Viren FeLV-A, KoRV, und HIV-1-IIIB angewendet.

Parameter	FeLV	KoRV	HIV
Zellen	FEA	293	C8166
Zellzahl	$5 \times 10^5$ /ml	$5 \times 10^5$ /ml	$5 \times 10^5$ /ml
Virus	FeLV-A	KoRV	HIV-1 IIIB
Virusstock	TCID <sub>50</sub> $1 \times 10^2$	TCID <sub>50</sub> $1 \times 10^{2,96}$	TCID <sub>50</sub> : $2 \times 10^3$
Serumverdünnung	1:2	1:2	1:2

Am ersten Tag wurden Serum und Virus entsprechend der Testparameter vorverdünnt und je 50 µl/ Well in einer 96-Well-Platte gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 100µl der zu infizierenden Zellen in der entsprechenden Verdünnung ausgesäht. Bei adhärennten Zellen wurde das Virus-Serum-Gemisch auf die Zellen gegeben (FEA-Zellen für FeLV und 293-Zellen für KoRV), bei Suspensionszellen (C8166 für HIV) wurden die Zellen zum Gemisch pipettiert. Nach 72 Stunden Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte wurden die Überstände vorsichtig abgenommen und verworfen, ohne das Zellpellt bzw. den Zellrasen zu zerstören. Es folgte ein dreimaliger Frier-Tau-Zyklus aus 20min -80°C und 20min 56°C zum Aufbrechen der Zellen. Anschließend wurden 100µl/Well eines Proteinasepuffers auf die Zellen gegeben und der Ansatz 3 Stunden bei 56°C inkubiert, um die Histone von der genomischen DNA zu entfernen. Zur Inaktivierung der im Lysispufer enthaltenen Proteinase K wurde für 30 min bei 95 °C inkubiert. Das Zelllysat wurde nun in der *Realtime*-PCR eingesetzt bzw. bei -20°C gelagert.

#### Proteinasepuffer

Proteinase K	200 mg/ml
10x PCR-Puffer	1 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 ml

#### *Realtime*-PCR

Die *Realtime*-PCR ist eine Methode zur gleichzeitigen, spezifischen Amplifikation und Detektion von DNA (Higuchi, et al., 1992). Das hier zur Quantifizierung der Provirusintegration verwendete System basiert auf dem TaqMan-Prinzip. Dabei werden sequenzspezifische Primer und eine Sonde verwendet. Die Sonde ist so angelegt, dass sie am 5'-Ende an ein Fluorochrom konjugiert ist. Am 3'-Ende sitzt ein Quencher, der das Fluoreszieren des Fluorochroms durch die räumliche Nähe unterbindet. Die Sonde bindet auf der Zielsequenz in 5'-Richtung nach dem Vorwärtsprimer. Wird dieser während des Amplifikationsschrittes verlängert, baut die Polymerase durch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Sonde vom 3'-Ende her ab. Dadurch wird als erstes das Nukleotid entfernt, welches an den Quencher gekoppelt ist. Damit sind Fluorochrom und Quencher nicht mehr in räumlicher Nähe, und die Sonde sendet vom 5'-Ende her ein Fluoreszenzsignal aus. Dieses wird vom Cyclyer (MX4000, Stratagene) gemessen. Für jede Polymerisation eines DNA-Stanges wird ein Signal gesendet. Somit ist die Fluoreszenz proportional zur akkumulierten DNA-Menge. Die Auswertung erfolgte

mittels der Software MX4000 (Stratagene) und der Bildung der  $2^{-\Delta Ct}$ -Werte von Immunsereen und den entsprechenden Präimmunsereen.

<b>Virus</b>	<b>Primer</b>	<b>Sonde</b>
FeLV-A	FeLV-RT-for & FeLV-RT-rev	FeLV-U3
KoRV	KoRV-5-for & KoRV-6-rev	KoRV-p15E-Sonde
HIV-1-IIIB	68i + 69i	HIV-pol-sonde

#### PCR-Ansatz pro Reaktion

	<b>FeLV</b>	<b>KoRV</b>	<b>HIV</b>
Template (Zellysat)	2 µl	2 µl	3 µl
Primer (10 pMol)	je 0,5 µl	0,5 µl	1,25 µl
Sonde (10 pMol)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
10x PCR Puffer	2,3 µl	2,3 µl	2,3 µl
dNTPs (10mM)	0,5 µl	0,5 µl	0,625 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3,5 µl	1,75 µl	1,75 µl
Polymerase (Ampli-Taq-Gold)	0,25 µl (=1,25 u)	0,25 µl (=1,25 u)	0,25 µl (=1,25 u)
nukleasefreies Wasser	ad 25µl	ad 25µl	ad 25µl

#### PCR-Setup

FeLV :	95°C/10min – <b>95°C/45s – 59°C/60s – 72°C/30s</b>	Zykluszahl: 45
KoRV :	95°C/10min – <b>95°C/45s – 50°C/60s</b>	Zykluszahl: 45
HIV :	95°C/10min – <b>95°C/45s – 55°C/60s</b>	Zykluszahl: 45

## **2.2.5 Zellkulturtechniken**

### **2.2.5.1 FEA-Zellen**

#### Passagierung

Bei den FEA-Zellen (Feline Embryonale Fibroblasten, M. Reinacher, Giessen, Deutschland und O. Jarrett, Glasgow, UK) handelt es sich um eine aus embryonalen Zellen der Katze generierten stabilen Zelllinie, welche adhären wächst. Die FEA-Zellen wurden in DMEM (10%FKS, 100 ug/ml Penicillin/Streptomycin, 10 mM HEPES, 4mM Glutamin) kultiviert. Bei der Versorgung der Zellen in einem Rhythmus von 4 Tagen wurde zuerst das Medium aspiriert und anschließend mit 10 ml PBS gewaschen. Waren die Zellen konfluent, wurden sie mit einem sterilem Zellschaber von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst und in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Da die Zellen stark aggregieren mussten sie durch mehrmaliges auf und abziehen in der Pipette vereinzelt werden, um bei einer Aufteilung in mehrer Zellkulturflaschen äquivalente

Zellzahlen zu erhalten. Konfluente T75-Zellkulturflaschen wurden im Verhältnis 1:3 gesplittet. Kultiviert werden diese Zellen bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>.

#### Kryokonservierung

Zuerst wurde das Einfriermedium hergestellt welches hier hitzeinaktiviertes FKS mit 10% DMSO ist. Nach dem Mischen wurde es zum Vorkühlen auf Eis gestellt. DMSO wird in der Zellkultur zum Einfrieren von Zellen anstelle von Glycerol verwendet. DMSO soll die Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses verhindern, da dadurch die Zellen zerstört werden. Üblicherweise wird DMSO in der Konzentration von 10 % verwendet. DMSO ist stark giftig! Es sollte deshalb mit vorgekühltem 'Einfriermedium' gearbeitet werden. Die einzufrierenden FEA-Zellen wurden gewaschen mit PBS und in 5 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt, auf 10<sup>7</sup>/ml eingestellt und 1ml Aliquots sofort bei -80°C eingefrohren.

#### Auftauen von kryokonservierten Zellen

Hierbei wurde mit allen Zellen gleich verfahren. In einem 50 ml Falcon-Röhrchen wurden ca. 50 ml auf Raumtemperatur gebrachtes PBS vorgelegt. Die Kryoröhrchen tauten bei 37°C im Wasserbad auf und wurden sofort in 50ml PBS dekantiert oder pipettiert um das DMSO zu verdünnen. Anschließend wurden die Zellen bei max 1000xg pelletiert. Jetzt erfolgte eine Resuspendierung im entsprechenden Medium und die Überführung in eine der Zellzahl entsprechenden Zellkulturflasche mit Medium. Nach 24 Stunden wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und erhielten frisches Medium. Ab jetzt konnten sie standartmäßig passagiert werden.

#### **2.2.5.2 C8166-Zellen**

C8166 (ATCC, USA, ECACC Nummer: 88051601) ist eine humane T-Zelllinie, die durch ein defektes HTLV-Genom immortalisiert wurde. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in RPMI-Medium 1640 supplementiert mit. Die Zellen sind nicht adhärent und somit verlief die Passagierung nach folgendem Schema: Alle 3-4 Tage wurde das Medium mit den Zellen in ein 15 ml oder 50 ml Falcon-Tube überführt und bei 1000xg für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand, also das alte Medium, wurde mit der Pipette abgesaugt und die Zellen zum waschen in 10 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde unter den gleichen Bedingungen wie zuvor pelletiert. Danach erfolge ein Resuspendieren in frischem RPMI Medium und das Aussähen der Zellen in der gewünschten Zellzahl. Die Kultivierung erfolgt auch hier bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.2.5.3 293-Zellen**

293 Zellen (ATCC, USA, ECACC Nummer: 85100602) stellen eine humane Nierenzelllinie dar. Sie wurde durch das humane Adenovirus 5 (HAdV 5) transformiert. Die Kultivierung erfolgte analog zu der C8166-Zelllinie. Das verwendete Medium ist DMEM (10%FKS, 100ug/ml Penicillin/Streptomycin, 10 mM HEPES, 4mM Glutamin).

### 2.2.5.4 Drosophila Schneider 2 (S2) Zellen

#### Passagierung

Diese Zelllinie entstand aus einer Primärkultur von *Drosophila Melanogaster* Embryonen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Sie kann bei Raumtemperatur und ohne Zusatz von CO<sub>2</sub> kultiviert werden. Das Temperaturoptimum für ihre maximale Teilungsrate liegt bei 28°C. Die Zellen wachsen semi-adhären in speziellem Schneider 2 Medium mit 10% FKS und 100µg/ml Penicillin/Streptomycin. Das Medium stabiler transgenerierter Zelllinien enthielt zusätzlich 25 µg/ml Blastocidin. Bei einer Zelldichte von ca. 10<sup>7</sup> Zellen/ml wurden sie komplett im alten Medium resuspendiert, in ein entsprechendes Falcon-Röhrchen überführt und pelletiert. Alle Zentrifugationen wurden bei Raumtemperatur, 700xg für 5min durchgeführt. Das Pellet wurde in 10 ml PBS zum Waschen resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und wie gewünscht in eine neue Flasche ausgesät, wobei die Zellzahl nie unter 5x10<sup>5</sup> Zellen/ml liegen durfte, da die Zellen sich dann nicht mehr teilen würden. Die Versorgung erfolgte alle 3-4 Tage.

#### Transfektion

Die Methode der Wahl zur Transfektion von S2-Zellen ist eine modifizierte Calciumphosphat-Methode nach dem Protokoll von Invitrogen. Hierbei bildet sich ein Calciumphosphat-DNA-Präzipitat welches von der Zelle endocytiert werden kann. Dazu wurden einen Tag vor der eigentlichen Transfektion die Zellen gewaschen und in 3 ml frischem, komplettem S2-Medium 3x10<sup>6</sup> Zellen pro Well in eine 6 Well-Platte ausgesät.

Am nächsten Tag wurden zwei Lösungen angesetzt. Lösung A bestand aus 36µl 2M CaCl<sub>2</sub>, der entsprechenden Menge DNA-Lösung der beiden Vektoren (rekombinanter Expressionsvektor pM/Bip/V5-HisC, Selektionsvektor pCoBlast) und wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 300µl Gesamtvolumen pro Ansatz gebracht. Transfiziert wurden, sofern nicht anders vermerkt, 20µg des rekombinanten Expressionsplasmids und 1µg Selektionsplasmid, hier pCoBlast. Lösung B waren 300µl 2x HEPES pro Ansatz. Tropfenweise gab man Lösung A in Lösung B, wobei der Ansatz dabei ständig gemischt wurde. Es schloss sich eine Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur an. Während dieser Zeit bildete sich ein feines Präzipitat, welches essentiell für das Gelingen der Transfektion ist. Die fertige Transfektionslösung wurde nun tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese dabei vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden abweichend vom Protokoll nur 8 h mit den Transfektionsagenzien inkubiert, da eine längere Inkubation die Zellen tötete bzw. dann die Sterberate der Zellen die der Transfektionseffizienz überschritt. Nach dem Entfernen des Transfektionsagens, wurden die Zellen zweimal mit komplettem Medium gewaschen und anschließend für 48 h ohne Selektionsantibiotikum inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und alle 3-4 Tage das Medium gewechselt, welches jetzt 25µg/ml des Selektionsantibiotikums Blastocidin enthielt. Dieser Vorgang wiederholte sich solange, bis resistente Kolonien auftraten, welche dann zur Zelllinie heranwuchsen. Das dauerte für jede Transfektion ca. 14 Tage.

## Expression

Das zu dieser Zelllinie gelieferte Expressionssystem beinhaltet einen Metallothionin-Promotor, dessen Aktivierung über die Zugabe von 500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  erfolgte. Die Zellen wurden vor der Induktion gewaschen und in neues Medium überführt. Die Expression dauerte 48 h bei 28°C. Dann wurden der Zellkulturüberstand abgenommen und bei 1000xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde für weitere Analysen aufbewahrt oder verworfen und der Überstand, in dem sich das rekombinante Protein befand, wurde durch ein Konzentrationsröhrchen (Vivaspin, 30 min / 4000\*g/4°C) auf 10 ml eingengt. Anschließend erfolgte eine Analyse mittels Western-Blot oder die Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Säule.

## Kryokonservieren

Um Sicherheitseinfrierungen herzustellen wurden die entsprechenden Zellen ab einer Dichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml geerntet und gewaschen, wobei das alte Medium nicht verworfen wurde. Es wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf eine Zellzahl von  $1,1 \times 10^7$  Zellen/ml mit Einfriermedium eingestellt. Das Einfriermedium setzte sich aus je 45% altem und neuem komplettem S2-Medium zusammen, sowie 10% DMSO. Es wurden Aliquots von je 1ml hergestellt und bei -80°C für 24h eingefroren. Dann wurden die Stocks zu Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

### **2.2.5.5 Isolation humaner PBMCs**

Zur Isolation der humanen PBMCs wurde folgendermaßen vorgegangen. Das frische Blut des bzw. der Spender wurde mit Lymphocytenseparationsmedium (LSM, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) zentrifugiert. Hierbei gibt es zwei Möglichkeiten der Handhabung. Zum einen kann man 15ml LSM in ein 50 ml Filterscheiben-Falcon-Tube geben und dann 15s (800xg, RT) zentrifugieren, dann befindet sich das LSM unter der Filterscheibe und das Blut kann einfach auf die Scheibe dekantiert werden. Benutzt man normale 50 ml Falcon-Tubes, so werden 15 ml LSM vorgelegt und diese vorsichtig mit dem Blut überschichtet. Befinden sich Blut und LSM im Tube wird bei Raumtemperatur mit 800 x g für 15 min ohne bremsen zentrifugiert. Es entsteht ein Dichtegradient im Röhrchen (Leucosep, Greiner Bio-One GmbH, Deutschland ). Das klare Serum befindet sich auf der Flüssigkeitssäule und direkt darunter ist ein grauer bzw. weißer Schleier zu sehen, in welchem sich die Lymphocyten befinden. Der Schleier wird vorsichtig abgesaugt und in ein neues Falcon pipettiert und auf 40 ml mit PBS aufgefüllt. Anschließend wird drei Mal mit PBS gewaschen, d.h. es wurde 10 min zentrifugiert (250xg, RT), dann wurde der Überstand verworfen und die Zellen wieder in PBS resuspendiert. Nach den Waschschrinen wurden die Zellen gezählt und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

## **2.2.6 Immunisierungen**

### **2.2.6.1 Versuchstiere**

Es wurden zehn Wochen alte, weibliche Wistar Ratten (BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung, Tierversuchsanstalt, Berlin-Marienfelde, Deutschland) zur Immunisierung verwendet. Die Ratten wurden in Gruppe von vier Tieren gehalten.

### **2.2.6.2 Immunisierung**

In jedem Tierversuch wurde nach dem gleichen Immunisierungsschema verfahren. Am Tag 21 nach der initialen Immunisierung erfolgte eine Boost-Immunisierung der Ratten. Das jeweilige rekombinante Protein wurde mit Adjuvant (rekombinante FeLV-p15E Proteine: Montanid = 3:7 (Abschnitt 3.13); rekombinante KoRV-p15E Proteine: Freund'schem inkomplettem Adjuvant: 1:1 (Abschnitt 3.3.2.2) gemischt und die Suspension auf ein Volumen von 1ml mit PBS gebracht. Die Applikation erfolgte an drei Orten. Je 25% des Volumens wurden intramuskulär in den rechten bzw. linken Hinterlauf und 50% subkutan in den Nacken gespritzt. Jeweils vor einer Immunisierung wurde Blut für Testzwecke entnommen.

### **2.2.6.2 Gewinnung von Seren aus Rattenblut**

Die Blutungen erfolgten durch retrobulbäre Punktion. Zurvor wurden die Tiere mit einem Inhalationsnarkotikum (Halothan oder Isofluran (Curamed, Karlsruhe, Deutschland)) betäubt. Unter Narkose wurde eine Na-Heparin-beschichtete Glaskapillare am Augapfel vorbeigeführt. Durch leichte Drehbewegung der Kapillare wurden Blutgefäße hinter dem Auge verletzt, so dass Blut durch die Kapillare abfließen konnte. Das Blut wurde bei 4°C über Nacht gelagert. Das entstandene Koagulat wurde am nächsten Tag bei 16000xg und 4°C 45min pelletiert. Der Serumüberstand wurde abgenommen und das Koagulat verworfen. Um die Seren zu dekomplementieren, d.h. die Bestandteile des Komplementsystems im Serum zu deaktivieren, wurden sie für 45min bei 56°C inkubiert. Die Lagerung der Seren erfolgte bei -20°C.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Modulation der Immunantwort durch Peptidhomopolymere und rekombinante transmembrane Hüllproteine von Retroviren *in vitro* und *in vivo*

Retroviren sind durch ihre transmembranen Hüllproteine in der Lage, in die Immunantwort des Wirtes einzugreifen. Speziell einer Aminosäuresequenz der transmembranen Hüllproteine konnte man die Hemmung der Lymphocytenproliferation nachweisen. Die Charakterisierung der immunsuppressiven Wirkung wurde in dieser Arbeit durchgeführt. Hierzu wurden zwei Herangehensweisen gewählt. Zum einen wurde die als immunsuppressiv wirkend beschriebene Aminosäuresequenz des immunsuppressiven, (ISU)-Peptids als Homopolymer hergestellt und dessen Wirkung auf die IL-10 Expression humaner Lymphocyten untersucht. Die zweite Möglichkeit war der Einsatz von rekombinanten Proteinen. Beim Einsatz rekombinanter Proteine für die Untersuchungen der Immunsuppression ist darauf zu achten, dass die Präparationen kein Endotoxin enthalten. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass das Vorhandensein der bakteriellen Endotoxine aus den Expressionssystemen ebenfalls IL-10 induziert. In dieser Arbeit wurde die Herstellung rekombinanter transmembraner Hüllproteine auf das Drosophila-Expressionssystem umgestellt. Um die Spezifität der Wirkung der immunsuppressiven Domäne näher zu charakterisieren, wurden verschiedene rekombinante Proteine hergestellt, die entweder die immunsuppressive Domäne enthalten oder nicht. Die Wirkung der rekombinanten Proteine auf die Cytokinexpression *in vitro* und auf die Ausprägung der humoralen Immunantwort *in vivo* wurde untersucht. Aufgrund der Konserviertheit des Aufbaus der retroviralen transmembranen Hüllproteine lässt sich mit den gewonnenen Daten ein Rückschluss auf die immunsuppressive Wirkung des HIV-1 gp41 ziehen. Sie könnten somit zum allgemeinen Verständnis der Immunpathogenese bei AIDS beitragen.

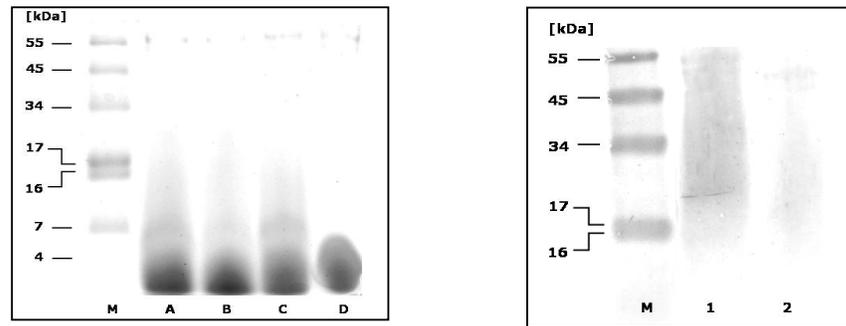
##### 3.1.1 Einfluss von Peptid-Homopolymeren und rekombinanten transmembranen Hüllproteinen auf die IL-10-Produktion humaner PBMCs *in vitro*

###### 3.1.1.1 Herstellung der HIV-ISU- und HIV-RAN-Homopolymere

Die beiden beschriebenen Herangehensweisen zu Untersuchung der Wirkung der ISU-Domäne haben jeweils Vor- und Nachteile. Um diese deutlich herauszustellen ist ein direkter Vergleich der Ansätze notwendig. Der Einsatz von Peptiden zum Auslösen oder Blocken biologischer Reaktionen ist weit verbreitet. Es konnte mehrmals gezeigt werden, dass die ISU-Peptide nur wirksam sind, wenn sie an größere Trägermoleküle gekoppelt werden [Denner et al., 1994]. Durch das Trägermolekül werden allerdings wieder fremde Parameter in das Experiment eingebracht. Um unspezifischen Effekten vorzubeugen, wurden die eingesetzten Peptide zu Homopolymeren gekoppelt. Das

verwendete Verfahren ist die Kopplung mit 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC).

Die durchschnittliche Kopplungsausbeute lag bei 20% und wurde mittels der Pierce-Methode bestimmt. Die Darstellung der Kopplungen erfolgte im SDS-Polyacrylamidgel, welches mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbt wurde. Außerdem wurden die Kopplungen durch Western Blots charakterisiert.



**Abbildung 3.1: 10%-SDS-PAGE (A) und Western Blot (B) von Peptid-Homopolymeren**

Die Kopplungen werden mit „K“ und einer laufenden Nummern bezeichnet.

A) Coomassie-Brilliant Blue gefärbtes PAA-Gel: M – SeeBlue® Plus2 Protein Marker; A – HIV-ISU-K84; B – HIV-ISU-K90; C – HIV-RAN-K74; D – HIV-ISU Monomer

B) Western Blot eines HIV-ISU und eines HIV-RAN Kopplungsansatzes Polymers. pAK: Ziege 1 (1:250); sAK: anti-Ziege 1:2000; M – SeeBlue® Plus2 Protein Marker; 1 – HIV-ISU-K84; 2 – HIV-RAN-K74

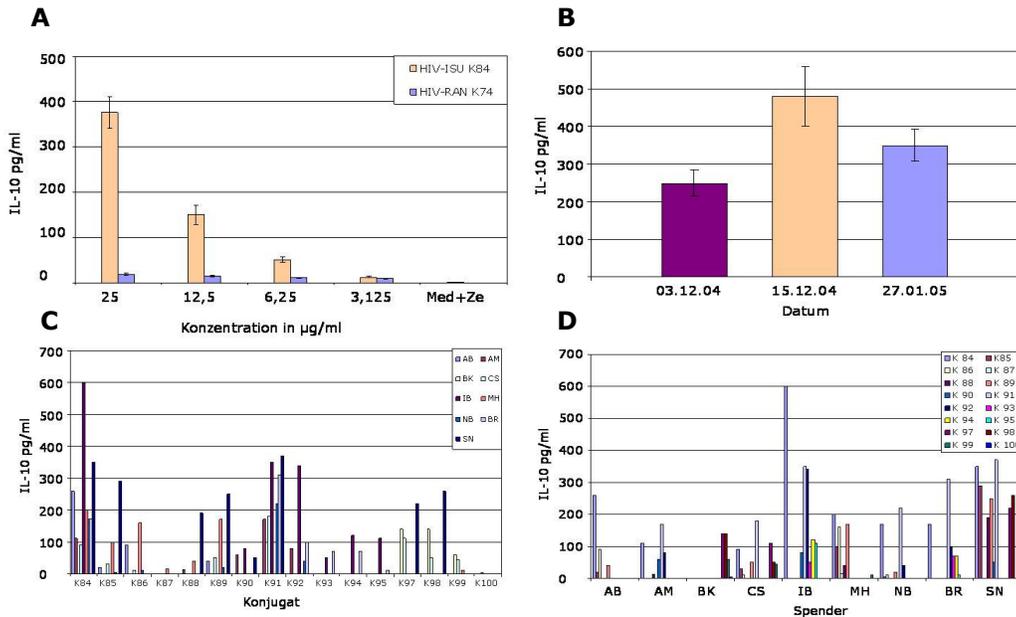
Bei der Analyse der Homopolymere wurden keine definierten Banden detektiert. Sowohl bei Analyse der Kopplung des HIV-ISU-Peptids (Abbildung 3.1-A, Spuren A+B), als auch bei der des Kontrollpeptids HIV-RAN sieht man eine Anfärbung im Coomassie-Gel (Abbildung 3.1-A, Spur C). Der Western Blot hingegen detektiert erwartungsgemäß nur HIV-ISU stark (Abbildung 3.1-B, Spur 1). Eine unspezifische Reaktion zeigt sich auch für die HIV-RAN Kopplung (Abbildung 3.1-B, Spur 2). Die in Abbildung 3.1 gezeigten Beispiele der Kopplungen sind exemplarisch für alle in dieser Arbeit verwendeten Konjugate. Es ist ein Unterschied zwischen Coomassie-Färbung und Western Blot zu erkennen. Im Coomassie-Gel können die Kopplungen nur bis zu einer Größe von 20 kDa dargestellt werden. Der Western Blot detektiert die Kopplungen ab einer Größe von 20 kDa.

Die Zusammensetzung des Kopplungsgemisches aus hoch- und niedermolekularen Strukturen wirft die Frage nach der Abhängigkeit der Funktionalität vom Vernetzungsgrad der Peptide auf. Dieser Frage sollte zusätzlich durch den Einsatz von nach Molekulargröße getrennter Fraktionen im IL-10-Cytokin-ELISA nachgegangen werden.

Mittels der EDC-Kopplung ist es gelungen, die Monomere des HIV-ISU-Peptids und des HIV-RAN-Peptids jeweils zu Homopolymeren zu konjugieren, die durch SDS-PAGE und Western-Blot charakterisiert wurden.

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

Um einen Einfluss der hergestellten Homopolymere auf die IL-10 Produktion zu untersuchen, wurde ein spezifischer IL-10-Cytokin-ELISA verwendet. Die verschiedenen Homopolymere wurden mit PBMCs verschiedener Spender getestet.



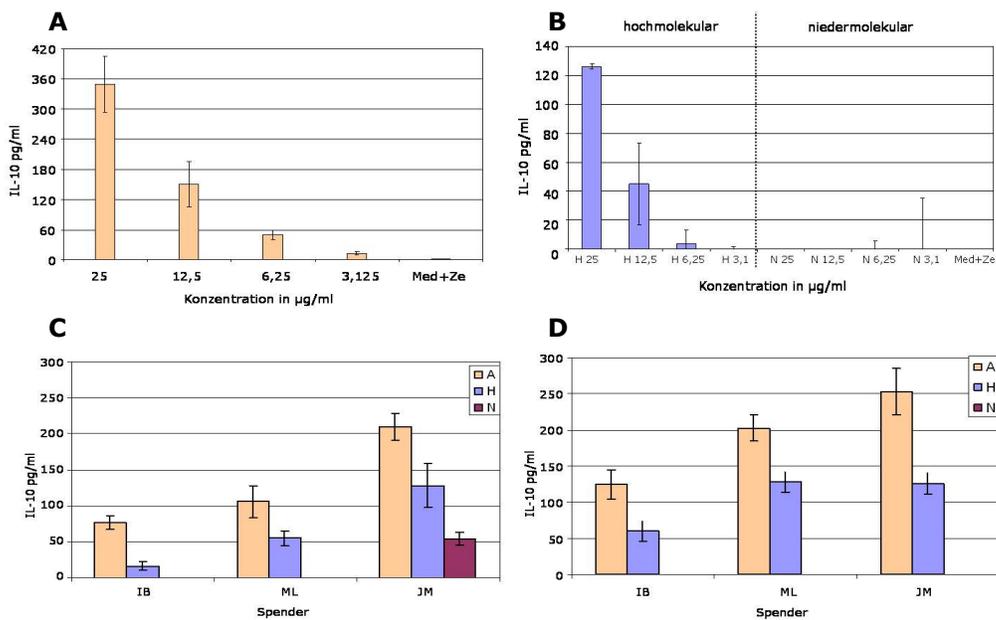
**Abbildung 3.2: Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMC ( $1,5 \times 10^7$ /ml) nach Inkubation mit HIV-ISU- und HIV-RAN-Homopolymeren.**

- A) Induktion der IL-10 Sekretion humaner PBMCs eines Spenders (SN, 05.01.2005) nach 24 Stunden Inkubation mit dem HIV-ISU-Peptid-Homopolymer (K84) bzw. dem HIV-RAN-Peptid-Homopolymer (K74).
- B) Abhängigkeit der IL-10-Induktion vom Tag der Isolation. Ein Konjugat (hier K84, 25µg/ml) wurde mit PBMCs eines Spenders (hier: SN) an verschiedenen Tagen getestet.
- C) Abhängigkeit der IL-10-Induktion von den Konjugaten (jeweils 25 µg/ml). PBMCs eines Spenders wurden mit verschiedenen Konjugaten inkubiert.
- D) Abhängig der IL-10-Induktion von den Spendern. Jedes Konjugat wurde mit PBMCs verschiedener Spender getestet.

Es konnte eine konzentrationsabhängige Induktion der IL-10 Sekretion durch Inkubation der PBMCs mit den verwendeten HIV-ISU-Homopolymeren gezeigt werden. Das verwendete Kontrollpeptid induziert keine verstärkte IL-10-Sekretion. Die induzierten Änderungen variierten stark. Es konnten Ausschüttungen von über 600 pg/ml bis unter 100 pg/ml beobachtet werden. Wurden 3 µg oder weniger der Homopolymere eingesetzt, konnte kein Unterschied in der Wirkung zwischen HIV-ISU und dem Kontrollpeptid HIV-RAN festgestellt werden (Abbildung 3.2-A). Isolierte man PBMCs des gleichen Spenders an verschiedenen Tagen und inkubierte diese mit demselben Konjugat, variierten die Werte um bis zu 100% (Abbildung 3.2-B). Außerdem konnte man eine Abhängigkeit der Induktionsstärke von dem verwendeten Konjugat feststellen. Es gab Konjugate, die immer IL-10 induzierten und einige, die keine Reaktion hervorriefen (Abbildung 3.2-C). Testete man ein Konjugat an verschiedenen Spender gab es ebenfalls Unterschiede in der Reaktivität. Hier gab es

Spender, die immer eine Reaktion zeigen und einige Spender, die gar nicht oder nur schwach auf die verschiedenen Konjugate reagierten (Abbildung 3.2-D).

Um einen möglichen Unterschied der Wirksamkeit zwischen hoch- und niedermolekularen Homopolymeren definieren zu können, wurden die Kopplungsansätze nach der Dialyse einer Fraktionierung unterzogen. Diese erfolgte mittels einer Molekulargewichts-Ausschlussfiltration. Die Trennung erfolgte durch Zentrifugation in Separationsröhrchen. Die Separationsgrenze lag bei 30 kDa. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Beide Fraktionen wurden im IL-10 ELISA eingesetzt.



**Abbildung 3.3: IL-10 ELISA mit dem Überstand humaner PBMCs nach Inkubation mit unfraktionierten und fraktionierten HIV-ISU-Homopolymeren**

- A) HIV-ISU-Homopolymer K91 nicht fraktioniert (Spender IB)  
 B) HIV-ISU-Homopolymer K91 nach Trennung in zwei Fraktionen (Spender IB)  
 C) HIV-ISU-Homopolymer K90 nach Trennung in zwei Fraktionen bei verschiedenen Spendern  
 D) HIV-ISU-Homopolymer K91 nach Trennung in zwei Fraktionen bei verschiedenen Spendern

A – nicht fraktioniertes Ausgangsgemisch; H – MWCO > 30000 Da; N – MWCO < 30000 Da

Für das Konjugat HIV-ISU K91 konnte eine konzentrationsabhängige Induktion der IL-10 Sekretion bei humanen PBMCs nachgewiesen werden. Das Maximum lag bei 350 pg/ml IL-10 bei eingesetzten 25 µg/ml (Abbildung 3.3-A). Nach der Trennung dieses Konjugats in zwei Fraktionen induzierte die Fraktion der HIV-ISU-Homopolymere mit einer Größe über 30000 Da 125 pg/ml IL-10 bei eingesetzten 25 µg/ml. Die Fraktion aus HIV-ISU-Homopolymeren mit einem Molekulargewicht unter 30000 Da induzierte in keiner der eingesetzten Konzentrationen IL-10 Sekretion bei humanen PBMCs. Die induzierten Werte lagen unter denen, die mit dem nicht separierten Konjugat erreicht wurden (Abbildung 3.3-B). Bei der Untersuchung des Konjugates 90 (K90) zeigte sich, dass die Induktion der IL-10-Expression durch den Einsatz der fraktionierten Konjugate bei allen untersuchten Spendern immer geringer ausfiel, als bei der

Inkubation der PBMCs mit dem Ausgangsgemisch. Das gleiche zeigte sich für den Test auf PBMCs der gleichen Spender wie bei dem K90-Ansatz mit fraktioniertem K91. Es waren bis auf eine Ausnahme (K90: Spender JM, Abbildung 3.13-C) immer nur die hochmolekulare Fraktion in der Lage, die Expression von IL-10 bei humanen PBMCs messbar zu induzieren (Abbildung 3.13-C und 3.13-D).

Es konnte gezeigt werden, dass HIV-ISU-Homopolymere konzentrationsabhängig die Sekretion des immunsuppressiven Cytokins IL-10 induzieren, während das Kontrollhomopolymer HIV-RAN keine signifikante Induktion der IL-10-Expression bei humanen PBMCs hervorrief. Die beobachteten Effekte unterliegen spender- und kopplungsspezifischen Schwankungen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Trennung der Homopolymere nach dem Molekulargewicht die Reaktivität der Fraktionen im Vergleich zum Ausgangsmaterial herabsetzt, wobei nur die Fraktion mit einem Molekulargewicht >30000 Da noch eine IL-10 Sekretion bei PBMCs verschiedener Spender auslöste.

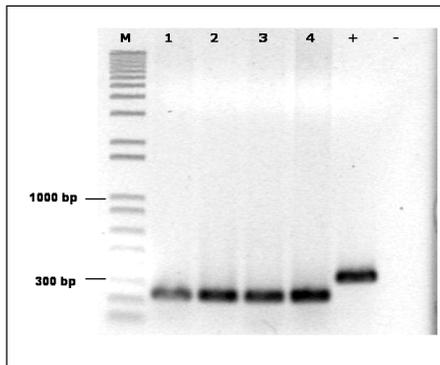
### **3.1.2 Einfluss rekombinanter transmembraner Hüllproteine von PERV und FeLV-A und der immunsuppressiven Domäne auf die IL-10-Produktion humaner PBMCs *in vitro***

Da gezeigt wurde, dass transmembrane Hüllproteine der  $\gamma$ -Retroviren PERV und FeLV-A, aus deren Ectodomäne die Konsensussequenz des immunsuppressiven Peptids CKS-17 abgeleitet wurde, immunmodulatorische Eigenschaften besitzen [Denner, 1998], sollte der Einfluss der transmembranen Hüllproteine auf die IL-10-Expression bei humanen PBMCs untersucht werden.

Bevor die transmembranen Hüllproteine eingesetzt wurden, mussten diese erst rekombinant und endotoxinfrei hergestellt werden. Zur endotoxinfreien Produktion wurde das *Drosophila*-Expressions-System (DES) verwendet. Für die Versuche wurde sowohl ein transmembranes Hüllprotein rekombinant exprimiert, welches die immunsuppressive (ISU)-Domäne enthält, als auch ein Konstrukt, in dem die ISU-Domäne deletiert ist. Da im Rahmen der Impfstoffentwicklung die transmembranen Hüllproteine von PERV und FeLV in der Arbeitsgruppe bereits kloniert wurden, konnten diese als Basis der Klonierung in das DES verwendet werden. Ebenfalls lagen in der Arbeitsgruppe transfizierte *Drosophila* Zellen vor, die das rekombinante PERV-p15E exprimieren sollten. Von dem Protein FeLV-p15E gab es ein Konstrukt, in dem die ISU-Domäne deletiert wurde (FeLV- $\Delta$ isu-15E, Stefan Langhammer, RKI). Dieses Protein sollte als Vergleichsprotein zum PERV-p15E in den Tests eingesetzt werden, um einen Einfluss der ISU-Domäne auf die IL-10-Produktion humaner PBMCs zu untersuchen. Der Vergleich der Wirkung beider Proteine ist möglich, da sie eine hohe Sequenzhomologie aufweisen, und die ISU-Domäne sogar zu 100% identisch ist [Denner, 1998].

### 3.1.2.1 Klonierung von FeLV- $\Delta$ isu-15E in den *Drosophila* Expressionsvektor pMT/Bip/V5-HisC

Der vorhandene Klon pCal-n-FeLV- $\Delta$ isu-p15E diente als Ausgangspunkt der Klonierung von FeLV- $\Delta$ isu-p15E in den *Drosophila* Expressionvektor pMT/Bip/V5-HisC. Da die Leserahmen und Schnittstellen der Vektoren pCal-n und pMT/Bip/V5-HisC nicht kompatibel sind, mussten die Sequenz des rekombinanten Proteins mittels PCR und entsprechenden Primern amplifiziert und mit den passenden Schnittstellen der Restriktionsendonucleasen BglII und XhoI versehen werden (Abbildung 3.4).

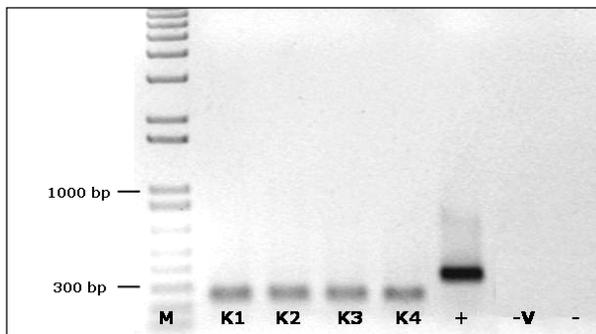


**Abbildung 3.4: Amplifikate von FeLV- $\Delta$ isu-p15E aus pCal-n-FeLV- $\Delta$ isu-p15E**

M 1kb+ DNA-Marker  
 1-4 FeLV- $\Delta$ isu-p15E  
 + PERV-p15E (Positivkontrolle der PCR)  
 - ddH<sub>2</sub>O-Kontrolle

PERV-p15E kann als Positivkontrolle verwendet werden, da die Primer durch die Sequenzhomologie auf beiden Sequenzen binden können.

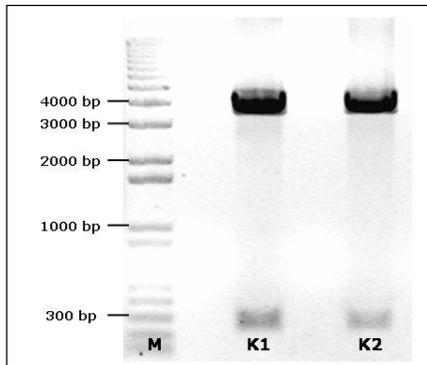
Die berechnete Größe der Fragmente ist 223 bp. Die Bahnen 1 bis 4 zeigten die Banden in dieser Größe. Die Banden wurden aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurden das Fragment und der Expressionsvektor pMT/Bip/V5-HisC mit den Restriktionsenzymen BglII und XhoI verdaut. Die Restriktionskontrolle des Vektors erfolgte durch eine Agarosegelelektrophorese. Die Ligation erfolgte bei 16°C für 12 Stunden. Der Ligationsansatz wurde in kompetente *E.coli* Top10 Zellen transformiert. Der Vektor pMT/Bip/V5-HisC trägt eine Ampicillin-Resistenzcassette, die es den transformierten Zellen ermöglicht auf Nährbodenplatten die Ampicillin enthalten zu wachsen. Die Kolonie-PCR der gepickten Klone zeigte bei allen vier Klonen die Bande bei 223 bp (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5: Amplifikate von FeLV- $\Delta$ isu-p15E nach Kolonie-PCR**

M 1kb+ DNA-Marker  
 K1-K4 Klone 1-4  
 + pMT/Bip/V5/HisC-PERV-p15E  
 -V Leervektorkontrolle  
 - ddH<sub>2</sub>O Kontrolle

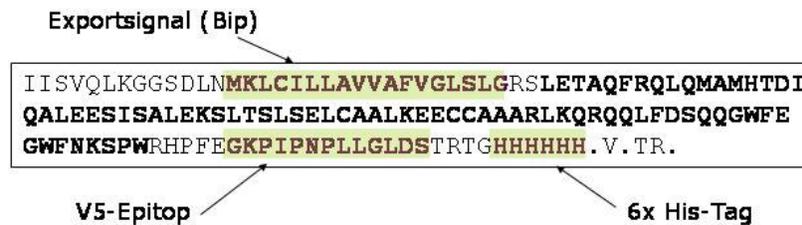
Die Klone 1 und 2 wurden einer Plasmid-Mini-Präparation unterzogen. Ein Restriktionstest der isolierten Plasmid-DNA zeigte auch eine Bande bei 223 bp (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA aus den Klonen 1 und 2**

Enzyme:	BglII & XhoI
Menge:	4 µg je Plasmid
M	1kB+ DNA-Marker
K1	Klon 1
K2	Klon 2

Die positiven Klone wurden sequenziert. Hierfür wurden unüblicherweise die Klonierungsprimer verwendet. Normalerweise werden dafür Primer verwendet, die in den Bereichen der Promotoren bzw. Terminatoren der Systeme binden, um detaillierte Daten über das Einhalten des korrekten Leserahmens zu erhalten. Über eine Verlängerung der Elongationszeit des PCR-Schrittes der Sequenzierung konnte man eine maximale Fragmentgröße von ca. 750 bp erreichen. Das erlaubte ebenfalls weit über die verwendeten Restriktionsschnittstellen hinweg zu sequenzieren und Leserahmen sowie Fusionskonstrukte zu überprüfen.



**Abbildung 3.7: Sequenz des Klons1 (pMT/Bip/V5HisC-FeLV-Δisu-p15E) in den Einbuchstabencode der proteinogenen Aminosäuren übersetzt**

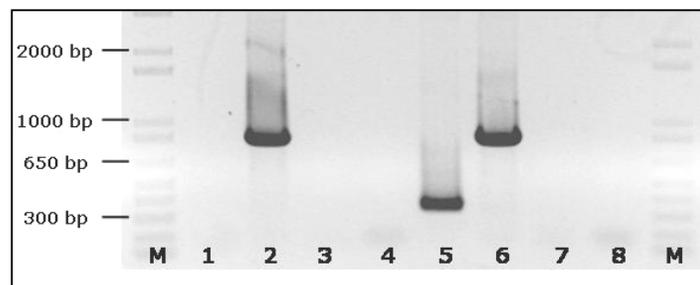
Die Übersetzung erfolgte anhand der Vorwärtssequenz. Die klonierte Sequenz ist fett gedruckt.

Die Sequenzierung des Klons 1 (pMT/Bip/V5HisC-FeLV-Δisu-p15E) zeigt keine Mutationen der Zielsequenz, Stoppcodons oder Leserahmenverschiebung. Es ist zu erkennen, dass sich sowohl das Exportsignal (Bip), das V5-Epitop zur gesonderten Detektion als auch der 6x Histidin-Tag zur affinitätschromatographischen Reinigung des Proteins mit der rekombinanten Sequenz des FeLV-Δisu-p15E im gleichen Leserahmen befinden (Abbildung 3.7). Das Konstrukt wurde nun in *E.coli* Top 10 retransformiert und eine endotoxinfreie Plasmid-Maxi-Präparation des Klons pMT/Bip/V5HisC- FeLV-Δisu-p15E als Vorbereitung der Transfektion von Drosophila Zellen hergestellt.

Die Sequenz des rekombinanten Proteins FeLV-Δisu-p15E konnte aus dem bakteriellen Expressionsvektor pCal-n in den Drosophila Expressionsvektor pMT/Bip/V5/HisC kloniert werden. Das entstandene Plasmid pMT/Bip/V5-Hisc-FeLV-Δisu-p15E wurde amplifiziert und endotoxinfrei isoliert.

### 3.1.2.2 Transfektion, Expression und affinitätschromatographische Reinigung von PERV-p15E und FeLV- $\Delta$ isu-p15E

Die Arbeiten zur Expression des rekombinanten PERV-p15E (rp15E) wurden bereits zuvor in der Arbeitsgruppe durchgeführt. Mit den transfizierten Zellen konnte erfolgreich endotoxinfreies rp15E gewonnen werden. Mehrere Versuche, das Ergebnis zu reproduzieren scheiterten. Das Expressionssystem besteht aus zwei Vektoren. Wenn eine stabil transfizierte Zelllinie generiert werden soll, muss ein Selektionsvektor mit dem Expressionsvektor im Verhältnis >1:20 cotransfiziert werden. Ein Verdacht war, dass die Zellen den Expressionsvektor verloren hatten. Um darüber Aufschluss zu erlangen wurde aus transfizierten Zellen die Gesamt-DNA isoliert und anschließend in einer PCR versucht die transfizierten Gene nachzuweisen.

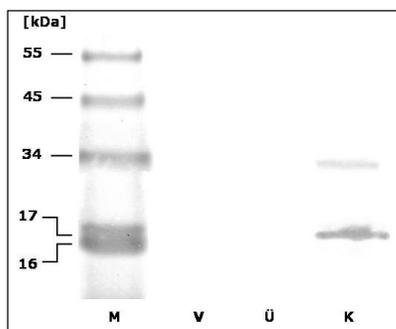


**Abbildung 3.8: Kontroll-PCR der bereits vorhandenen, mit pMT/Bip/V5/HisC-PERV-p15E transfizierten Drosophila Zelllinie**

Die PCR wurde mit sequenzspezifischen Primern für das rekombinante PERV-p15E (340bp; Spur 1,3,5,7) und die Blasticidin-Resistenzcassette (795 bp, Spur 2,4,6,8) durchgeführt.

M=1kb+ DNA-Marker; 1+2=Lysat der transfizierten Zelllinie; 3+4 Lysat der nicht transfizierten Zelllinie; 5=positiv Kontrolle mit Plasmid pMT/BiP/V5/HisC-PERV-p15E; 6= positiv Kontrolle Plasmid pCo-Blast (=Selektionsvektor); 7=ddH<sub>2</sub>O Kontrolle für PERV-p15E Primer; 8= ddH<sub>2</sub>O Kontrolle pCo-Blast Primer

Es fehlte die Bande bei 340 bp für das rekombinante PERV-p15E (Konstrukt: pMT/Bip/V5/HisC-PERV-p15E) bei den transfizierten Zellen (Abbildung 3.8, Spur 1). Das Selektionsplasmid ist eindeutig nachzuweisen mit dem Produkt der Blasticidin-Resistenzcassette (Abbildung 3.8, Spur 2). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Zellen, die nur noch das Resistenzplasmid enthalten, die doppelt transfizierten Zellen aufgrund eines Wachstumsvorteils verdrängt haben. Auch im Western-Blot konnte das PERV-p15E nach Induktion im Zellkulturüberstand nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9: Western Blot des Zellkulturüberstandes der bereits vorhandenen, mit pMT/Bip/V5/HisC-PERV-p15E transfizierten Drosophila Zellen vor und nach Induktion (Klon B2)**

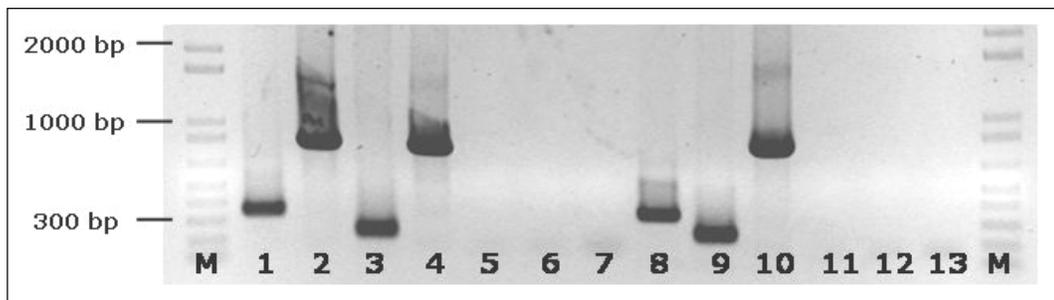
pAK: anti-V5 1:5000; sAK: anti-mouse 1:5000;

M – SeeBlue® Plus2 Protein Marker; V – Zellkulturüberstand vor Induktion; Ü – Zellkulturüberstand nach Induktion; K – Kontrolle: FeLV-A-rp15E

Aufgrund der Ergebnisse wurde die Transfektion des pMT/Bip/V5-HisC-PERV-p15E Konstruktes parallel zu dem Vergleichskonstrukt pMT/Bip/V5-HisC-FeLV- $\Delta$ isu-p15E erneut durchgeführt.

Es erfolgte eine Retransformation in *E.coli* Top-10 und eine endotoxinfreie Plasmid-Maxi-Präparation beider rekombinanter Plasmide. Endotoxin kann die Transfektionseffizienz entscheidend verringern.

Nachdem sich 14 Tage nach der Transfektion resistente Kolonien etabliert hatten, wurde der Nachweis der Plasmide erneut durchgeführt. Es konnte sowohl in den mit pMT/Bip/V5HisC-PERV-p15E, als auch in den mit pMT/Bip/V5HisC-FeLV- $\Delta$ isu-p15E transfizierten Zellen die Gene, die für die der rekombinanten Proteinen und die Blastizidin-Resistenzcassette kodieren nachgewiesen werden (Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10: Kontroll-PCR der neu transfizierten Drosophila Zellen**

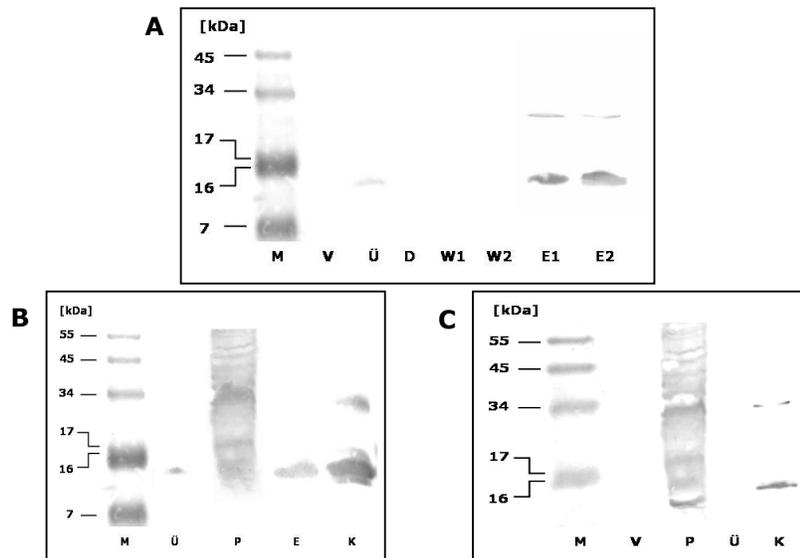
Die PCR wurde mit sequenzspezifischen Primern für das rekombinante PERV-p15E (340bp; Spur 1,5,8,11), das rekombinante FeLV- $\Delta$ isu-p15E (223bp; Spur 3,6,9,12) und die Blastizidin-Resistenzcassette (795 bp, Spur 1,4,7,10,13) durchgeführt.

M=1kB+ DNA-Marker; 1+2=Lysat der mit pMT/Bip/V5HisC-PERV-p15E transfizierten Zellen; 3+4=Lysat der mit pMT/Bip/V5HisC-FeLV- $\Delta$ isu-p15E transfizierten Zellen; 5+6+7=Lysat der nicht transfizierten Zelllinie; 8=positiv Kontrolle mit Plasmid pMT/BiP/V5/HisC-PERV-p15E; 9=positiv Kontrolle mit Plasmid pMT/Bip/V5HisC- FeLV- $\Delta$ isu-p15E; 10=positiv Kontrolle Plasmid pCo-Blast (=Selektionsvektor); 11=ddH<sub>2</sub>O Kontrolle für PERV-p15E Primer; 12 ddH<sub>2</sub>O Kontrolle für FeLV- $\Delta$ isu-p15E Primer, 13=ddH<sub>2</sub>O Kontrolle pCo-Blast Primer

Die Expression der rekombinanten Proteine wurde induziert. Nach 48h wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, dialysiert (Ausschlussgröße = 10000 kDa) und die Proteine wurden affinitätschromatographisch über eine Ni-NTA-Säule gereinigt. Das rekombinante Protein PERV-p15E eluierte immer in den Fraktionen 2-6. Die Fraktionen wurden gepoolt und einer Proteinbestimmung unterzogen. Die erzielten Ausbeuten von PERV-p15E lagen zwischen 1,5  $\mu$ g und 2  $\mu$ g pro 50 ml Kulturüberstand. Die Menge des eluierten rekombinanten Proteins FeLV- $\Delta$ isu-p15E konnte mittels Bradford-Assay nur schlecht nachgewiesen werden.

Der Western Blot mit den affinitätschromatographisch gereinigtem PERV-p15E zeigt nur eine geringe Menge des rekombinanten Proteins im Zellkulturüberstand. Nach der Elution sind Banden bei 15 ka und ca.30 kDa in beiden Elutionspools zu erkennen. Sowohl vor der Induktion, als auch im Durchlauf und den Waschschrinen ist keine spezifische Deketion durch den V5-Antikörper zu sehen (Abbildung 3.11-A). Ein Test des Zellpellets zeigt sowohl bei PERV-p15E, als auch bei FeLV- $\Delta$ isu-p15E eine starke Bande. Während bei PERV-p15E sowohl im induzierten Zellkulturüberstand, als auch

im Elutionspool eine Bande zu erkennen ist (Abbildung 3.11-B), kann man in den vergleichbaren Spuren bei FeLV- $\Delta$ isu-p15E keine Banden erkennen (Abbildung 3.11-C). Das rekombinante Protein FeLV- $\Delta$ isu-p15E war nie im Zellkulturüberstand nachzuweisen. Versuche, dieses Protein mittels 8M Harnstoff zu lösen und dann affinitätschromatographisch zu reinigen, scheiterten. Das gesamte Protein war in vielen Fällen nicht mehr von der Säule zu eluieren. Für den Einsatz im Cytokin-ELISA mussten sich die Proteine in PBS befinden. Es wurde versucht, die Eluate umzupuffern. Während der Dialyse bzw. des Umpufferns fiel das Protein in großen Aggregaten aus. Das verhinderte eine genaue Proteinbestimmung und den Einsatz des FeLV- $\Delta$ isu-p15E für weitere Tests.



**Abbildung 3.11: Western Blots der affinitätschromatographisch gereinigten rekombinanten Proteine PERV-p15E (A+B) und FeLV- $\Delta$ isu-p15E (C) aus Drosophila Schneider 2 Zellen**

- A) Reinigungsprotokoll des rekombinanten PERV-p15E  
 B) PERV-p15E: Pellet der induzierten Drosophila Schneider 2 Zellen mit aufgetragen  
 C) FeLV- $\Delta$ isu-p15E Pellet der induzierten Drosophila Schneider 2 Zellen mit aufgetragen

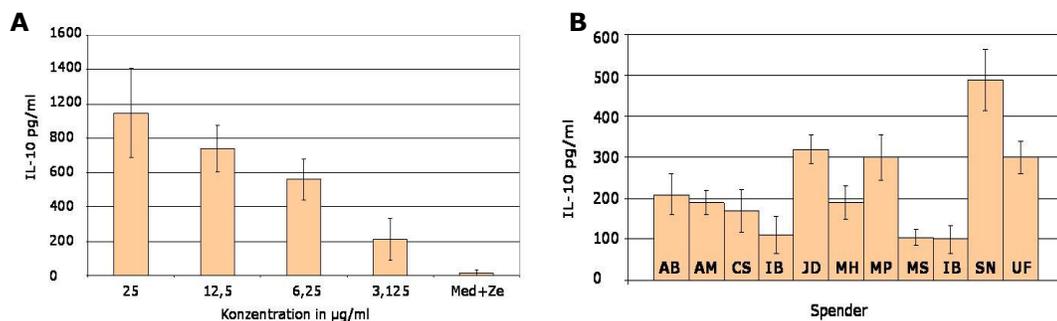
pAK: anti-V5 1:5000; sAK: anti-mouse 1:5000; M – SeeBlue® Plus2 Protein Marker; V – Zellkulturüberstand vor Induktion; Ü – Zellkulturüberstand nach Induktion; P – Zellpellet nach Induktion; D – Durchlauf; W – Waschfraktion 1 bzw. 2; E – Pools der Elutionsfraktionen: 1=Pool aus Fraktion 2+3, 2=Pool aus Fraktion 4+5; K – Kontrolle: FeLV-A-rp15E

Es konnte nachgewiesen werden, dass die bereits früher etablierte, transfizierte Drosophila-Zelllinie das Expressionplasmid pMT/Bip/V5/HisC-PERV-p15E verloren hatte, und die Zellen deshalb kein rekombinantes PERV-p15E exprimierten. Es wurden zwei neue, stabil transfizierte Drosophila-Zelllinien etabliert, von denen eine das rekombinante PERV-p15E und die andere das rekombinante FeLV- $\Delta$ isu-p15E exprimiert. Über Ni-NTA-Affinitätschromatographie konnte nur das rekombinante PERV-p15E gereinigt werden.

### 3.1.2.3 Analyse der Wirkung von endotoxinfrei exprimiertem PERV-p15E auf die IL-10-Expression humaner PBMCs

Das in den Drosophila Zellen exprimierte und danach gereinigte rekombinante PERV-p15E wurde im IL-10 Cytokin ELISA eingesetzt, um die Induktion von IL-10 bei humanen PBMCs zu messen.

Es konnte gezeigt werden, dass die PBMCs eines Spenders in Abhängigkeit von der Konzentration des mit ihnen inkubierten rekombinanten, endotoxinfreien PERV-p15E IL-10 sekretieren. Der Maximalwert hier lag bei ca. 1100 pg/ml (Abbildung 3.12-A). Inkubierte man PBMCs verschiedener Spender mit rekombinantem PERV-p15E, zeigten alle eine Reaktion. Je nach Spender war die Stärke der Induktion unterschiedlich. Die IL-10-Werte schwankten zwischen 100 pg/ml und 490 pg/ml (Abbildung 3.12-B).



**Abbildung 3.12: IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach 24 Stunden Inkubation mit in DES exprimiertem PERV-rp15E**

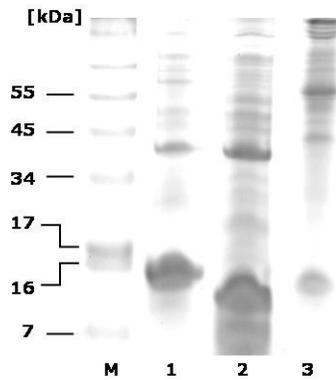
A) IL-10 Sekretion humaner PBMCs eines Spenders (SN am 15.04.2005) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen PERV-rp15E.

B) Maxima der IL-10 Werte verschiedener Spender-PBMCs nach Inkubation mit 25 µg/ml PERV-p15E (Pool 24.11.2004).

### 3.1.3 Einfluss rekombinanter transmembraner Hüllproteine von FeLV-A auf die humorale Immunantwort *in vivo*

Neben den *in vitro* Versuchen sollte der Einfluss der immunsuppressiven Domäne auf die Antikörperinduktion *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden die bereits vorhandenen Konstrukte pCal-n-FeLV-p15E und pCal-n-FeLV-Δisu-p15E in *E.coli* BL21 Zellen transformiert und die Proteine wurden exprimiert. Das rekombinante FeLV-p15E wurde über eine Calmodulinsäule affinitätschromatographisch gereinigt. Das korrespondierende Δisu-Konstrukt war in wässrigen Phasen unlöslich. Hier erfolgten Auswaschungen des Zellpellets durch alternierendes Resuspendieren in 30 ml PBS und anschließendes Pelletieren bei 20000xg für 10 min.

Die Reinheit des FeLV-Δisu-p15E ist geringer als die des gereinigten FeLV-p15. Um eine Aussage über die Effekte treffen zu können, sollten die Versuchstiere mit äquimolaren Mengen immunisiert werden. Hierfür wurde die Menge des Zielproteins in der Proteinpräparation anhand des SDS-Gels abgeschätzt. Es wurde ein Gehalt von 70% an Zielprotein geschätzt (Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13: Darstellung der rekombinanten Proteine FeLV-p15E und FeLV- $\Delta$ isu-p15E**

Das SDS-Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt.

M – SeeBlue® Plus2 Protein; 1 – FeLV-p15E; 2 – FeLV- $\Delta$ isu-p15E ; 3 – PERV-p15E (aus *Drosophila* Zellen)

Um den Einfluss der immunsuppressiven Domäne des FeLV-p15E auf die humorale Immunantwort gegen ein nicht verwandtes Antigen zu untersuchen, sollte zeitgleich mit dem Protein BSA immunisiert werden. Albumine weisen speziesübergreifend konservierte Sequenzbereiche auf. BSA wurde gewählt, da gegen dieses Protein nur eine schwache Immunantwort zu erwarten war und somit auch geringe Unterschiede besser zu detektieren wären. Frühere Versuche zeigten, dass bereits mit 10  $\mu$ g BSA und einem entsprechenden Adjuvant eine humorale Immunantwort gegen BSA zu induzieren war. Als Adjuvant wurde Montanid im Verhältnis 3:7 (v/v; Protein:Adjuvant) verwendet.

Im Folgenden wurden zwei Rattengruppen (aus je 4 Tieren bestehend) mit den entsprechenden Mengen an FeLV-p15 bzw. FeLV- $\Delta$ isu-p15E und BSA immunisiert.

Konstrukt	Gruppe	Gesamt-Protein in $\mu$ g/Tier	Zielprotein in $\mu$ g/Tier	BSA-Menge in $\mu$ g/Tier
FeLV-p15E	81	100	100	10
FeLV- $\Delta$ isu-p15E	82	143	100	10

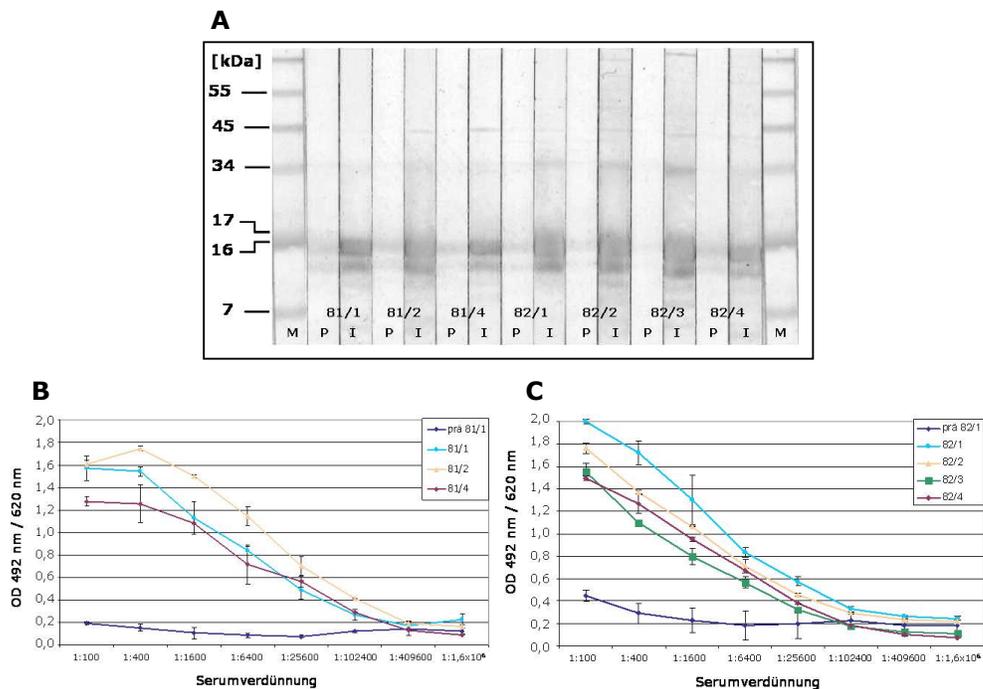
**Tabelle 3.1: Immunsierungsbedingungen für die *in vivo* Experimente zur Immunsuppression**

Für das unlösliche Protein FeLV- $\Delta$ isu-p15E wurde nach Abschätzung des Reinheitsgrades auf der Grundlage eines SDS-Gel ein Anteil von 70% des Zielproteins am Gesamtprotein angenommen.

Das Tier 81/3 verstarb bei der Boostimmunisierung. Am Tag 42 nach der primären Immunisierung wurden die Tiere getötet und das Serum gewonnen. Mittels Western Blot wurden die Seren auf das Vorhandensein der bindenden Antikörper gegen FeLV-p15E geprüft. Im ELISA wurden die Antikörpertiter der einzelnen Tiere im Vergleich zum Präimmunserum ermittelt.

Der Western Blot der Seren gegen FeLV-p15E zeigte keine Bande bei 15 kDa bei den Präimmunseren. Die Immunseren zeigten alle eine spezifische Bande bei 15 kDa. Zusätzlich zeigt sich bei den Seren aller Tiere eine weitere Bande bei ca. 44 kDa und bei den Tieren 82/1, 82/2, und 82/3 eine Bande bei ca. 34 kDa (Abbildung 3.14-A). Die ELISA-Tests der Seren konnten für alle Tiere bindende Antikörper für das FeLV-p15E nachweisen. Da alle Präimmunseren negativ reagierten, wurde im ELISA nur ein Präimmunserum als Negativkontrolle gezeigt. Der Antikörpertiter der Gruppe 81 (FeLV-p15E) lag bei 1:409600 (Abbildung 3.14-C). Die Gruppe 82 (FeLV- $\Delta$ isu-p15E) erreichte einen Antikörpertiter von 1:102400 (Abbildung 3.14-C). Die Rattengruppe, die mit dem vollständigen FeLV-p15E immunisiert wurde entwickelte eine vierfach

höheren Titer an bindenden Antikörpern gegen das FeLV-p15E, als die Tiere, die das Konstrukt ohne ISU-Domäne appliziert bekamen.



**Abbildung 3.14: Western Blot Analyse (A) und ELISA Analyse (B+C) der gegen FeLV-p15E gerichteten Rattenserum der Gruppen 81 und 82**

A: P – Präimmunsrum (=Negativkontrolle), I – Immunsrum, M – See Blue+ Marker; pAK: Serum 1:100; sAK: anti-Ratte 1:5000)

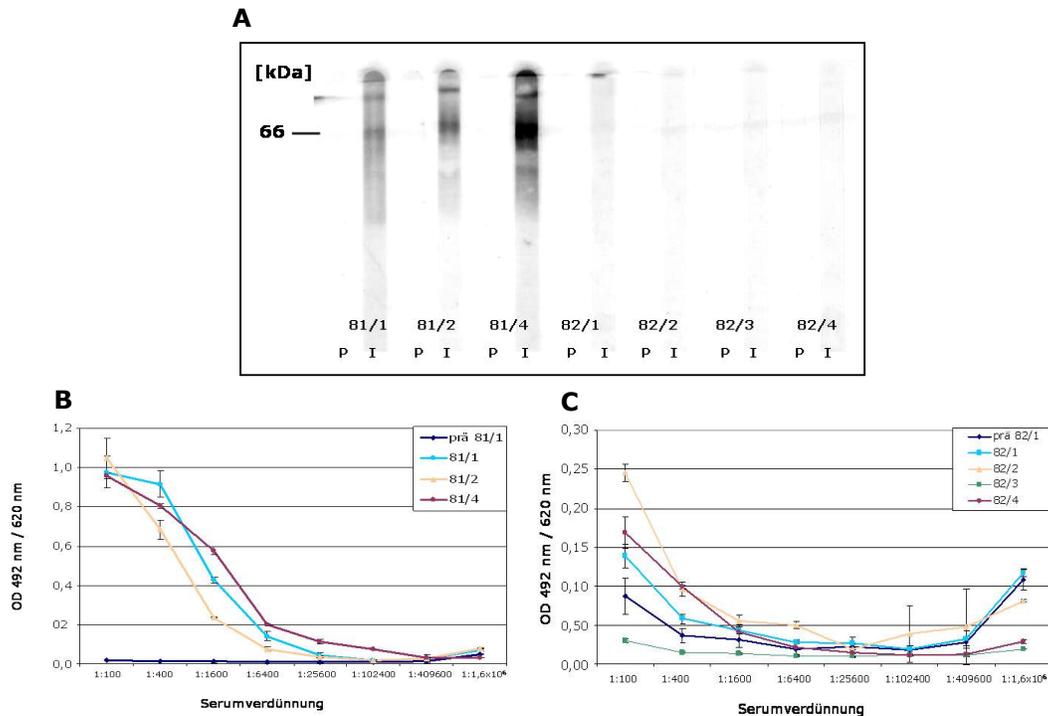
B: ELISA mit den Rattenserum der Gruppe 81 (FeLV-p15E); pAK: Serumverdünnungen; sAK: anti-Ratte 1:5000

C: ELISA mit den Rattenserum der Gruppe 82 (FeLV- $\Delta$ isu-p15E); pAK: Serumverdünnungen; sAK: anti-Ratte 1:5000

### 3.1.4 Einfluss rekombinanter transmembraner Hüllproteine von FeLV-A auf die humorale Immunantwort gegen ein nicht verwandtes Antigen *in vivo*

Die Antikörperantwort gegen das zusätzlich applizierte BSA wurde parallel zu den oben beschriebenen Analysen untersucht (Abschnitt 3.1.3).

Im Western Blot waren alle Präimmunsrum negativ. Die Tiere der Gruppe 81 (FeLV-p15E) zeigten eine Immunantwort gegen BSA, während bei den Tieren der Gruppe 82 (FeLV- $\Delta$ isu-p15E) keine spezifische Immunantwort gegen BSA zu detektieren war (Abbildung 3.15-A). Der ELISA für BSA ermittelte bei den Ratten der Gruppe 81 einen Antikörpertiter von 1:102400 bzw. 1:409600 (Tier: 81/4). Für die Tiere der Gruppe 82 konnte kein Titer bestimmt werden und es zeigte sich nur eine sehr schwache Bindung an BSA (Abbildung 3.15-B+C). Damit wurden die Ergebnisse des Western Blots bestätigt.



**Abbildung 3.15: Western Blot Analyse (A) und ELISA Analyse (B+C) der gegen BSA gerichteten Rattenserum der Gruppen 81 und 82**

A: P – Präimmunsersum (=Negativkontrolle), I – Immunsersum, M – See Blue+ Marker; pAK: Serum 1:100; sAK: anti-Ratte 1:5000)

B: ELISA mit den Rattenserum der Gruppe 81 (FeLV-p15E); pAK: Serumverdünnungen; sAK: anti-Ratte 1:5000

C: ELISA mit den Rattenserum der Gruppe 82 (FeLV- $\Delta$ isu-p15E); pAK: Serumverdünnungen; sAK: anti-Ratte 1:5000

Es wurde gezeigt, dass die humorale Immunantwort gegen das applizierte Antigen stärker ausfiel, wenn die ISU-Domäne noch im Protein enthalten war. Gegen das FeLV- $\Delta$ isu-p15E wurde nur ein geringerer Antikörpertiter entwickelt. Gegen das nicht verwandte Antigen BSA wurde in den mit FeLV- $\Delta$ isu-p15E immunisierten Tieren keine messbare humorale Immunantwort induziert, im Gegensatz zu den mit FeLV-p15E immunisierten Ratten. Die immunsuppressive Wirkung der ISU-Domäne konnte mit diesem Ansatz nicht untersucht werden, da der Gehalt an spezifischen Antigenen in den einzelnen Präparationen unterschiedlich war.

### 3.2 Induktion regulatorischer T-Zellen durch ISU-Peptide von HIV-1 und rekombinantes PERV-p15E *in vitro*

Ziel dieser Arbeit war es, Untersuchungen zur Zusammensetzung der Population humaner PBMCs nach Exposition mit Homopolymeren des immunsuppressiven Peptids von HIV-1 bzw. des transmembranen Hüllproteins von PERV zu bestimmen. Die untersuchten Oberflächenmoleküle CD25 und GITR (glucocorticoid induced tumornecrosis factor receptor) wurden als Marker verwendet, um zu zeigen, ob die Anzahl der positiven Zellen nach Exposition erhöht ist..

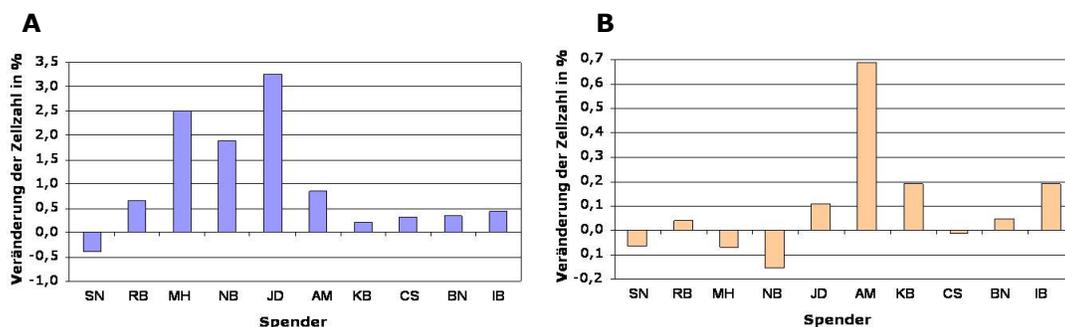
In dieser Arbeit sollten erste Daten zur Transkriptionsfrequenz von FoxP3 in einer Population humaner PBMCs erhoben werden, die mit dem HIV-ISU-Homopolymer bzw. dem rekombinanten PERV-p15E inkubiert wurden. Hierzu wurde ein SYBR-Green-*Realtime*-PCR-System etabliert. Es wurde eine relative Quantifizierung des FoxP3 mRNA-Levelns vorgenommen.

Beide Ansätze untersuchten, ob retrovirale transmembrane Hüllproteine oder das ISU-Peptid von HIV-1 in der Lage sind, regulatorische T-Zellen *in vitro* zu induzieren.

### 3.2.1 Induktion von regulatorischen T-Zellen durch HIV-ISU-Peptid-Homopolymere *in vitro*

Um die Mechanismen der immunsuppressiven Wirkung von transmembranen Hüllproteinen auf die Zusammensetzung der Lymphocytenpopulation zu untersuchen, wurden die Zellpopulationen anhand spezifischer Oberflächenmarker quantifiziert. Markiert wurden pro Spender  $3 \times 10^5$  Zellen. Die Daten einer Messung wurden aus  $2 \times 10^4$  Zellen pro Spender erhoben.

Hierbei wurde die Verteilung von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> doppelpositiven T-Zellen in einem unbehandelten und in einem mit HIV-ISU-Homopolymer inkubierten Ansatz miteinander verglichen. Zusätzlich wurde ebenfalls die Expression des auf regulatorischen T-Zellen vorhandenen GITR gemessen. Die PBMCs wurden nach 24 Stunden Inkubation unter den Bedingungen einer Dreifachfärbung der anschließenden Analyse im Durchflusscytometer unterzogen. Die Gates wurden folgendermaßen gesetzt: Im ersten Schritt wurden alle T-Lymphocyten gated, dann innerhalb dieses Gates alle CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> doppelpositiven Zellen und innerhalb dieses Gates die Anzahl an GITR-positiven T-Zellen gemessen.



**Abbildung 3.16: Veränderung der Zellzahlen an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> doppelpositiven (A) und GITR<sup>+</sup> T-Zellen nach 24 Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer (K84)**

Die Werte ergeben sich aus den Differenzen der Zellen im jeweiligen Gate der behandelten Probe (=mit HIV-ISU K84 inkubierten) und der unbehandelten Probe.

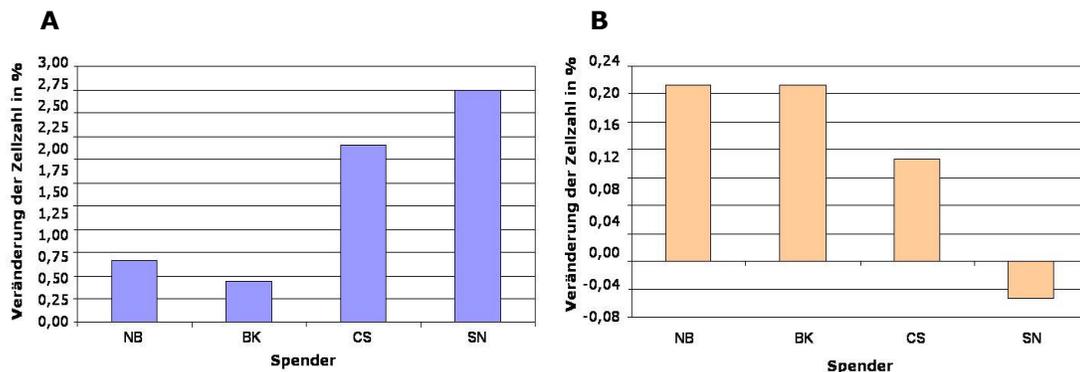
Durch die Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer veränderte sich die Zusammensetzung der Subpopulationen der humanen PBMCs. Die Anzahl an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> doppelpositiven Zellen steigt bei 9 von 10 untersuchten Spendern an (Abbildung 3.16-A). Für die Veränderung der GITR-Werte lässt sich kein eindeutiger Trend erkennen. 40% der Spender reagieren mit einer Verringerung der Zahl der

GITR-positiven Zellen Gegensatz zu 60%, bei denen die GITR<sup>+</sup> Zellzahl zunimmt (Abbildung 3.16-B).

Durch die Inkubation humaner PBMCs mit dem HIV-ISU-Homopolymer stieg der Anteil an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> doppelpositiven T-Zellen der untersuchten Population an. Die Veränderungen auf den Anteil an GITR<sup>+</sup> Zellen waren nicht einheitlich.

### 3.2.2 Induktion von regulatorischen T-Zellen durch rekombinantes PERV-p15E

Auch das rekombinante, im DES hergestellte PERV-p15E (Abschnitt 3.1.1) wurde auf die Wirkung auf PBMCs von 4 Spendern in gleicher Weise wie für die HIV-ISU-Homopolymere beschrieben getestet. Hier wurden ebenfalls Veränderungen der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> und GITR<sup>+</sup>-Zellzahlen beobachtet. Die Schwankungen liegen in der gleichen Größenordnung wie die beobachteten Veränderungen nach Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer, zwischen 0,75% und 2,75%.



**Abbildung 3.17: Relative Veränderung der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellzahl (A) und der GITR<sup>+</sup>-T-Zellen nach 24h Inkubation mit PERV-p15E (B)**

Die Werte ergeben sich aus den Differenzen der Zellen im jeweiligen Gate der behandelten Probe (=mit PERV-15E inkubierten) und der unbehandelten Probe.

Die Messwerte für die der GITR<sup>+</sup> T-Zellen zeigen nach Inkubation mit dem PERV-p15E bis auf einen Spender ebenfalls eine geringe Zunahme der Zellzahl. Die Zunahme der Zellzahl liegt zwischen 0,13 und 0,2 Prozent. Ein Spender zeigt eine Verringerung der GITR<sup>+</sup>-Zellzahlen um 0,05% (Abbildung 3.17).

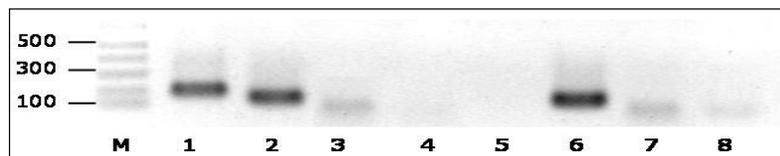
Nach der Inkubation humaner PBMCs mit PERV-p15E war eine Zunahme der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen und GITR<sup>+</sup> T-Zellen zu erkennen, wobei die Zahl der untersuchten Spender zu berücksichtigen ist.

### 3.2.3 Veränderung des Expressionsmusters von FoxP3 durch ISU-Peptid-Homopolymere und rekombinantes, endotoxinfreies PERV-p15E

Da ein Effekt des transmembranen Hüllproteins von PERV und des HIV-1-ISU-Peptides auf die Zusammensetzung der Lymphocytenpopulation zu beobachten war, sollte ein spezifischer Marker der regulatorischen T-Zellen untersucht werden. Nicht alle doppelpositiven T-Zellen prägen den regulatorischen Phänotyp aus. Es wurden

ebenfalls durch Transkriptionsanalysen des Regulators FoxP3 erste Hinweise erarbeitet, die zeigen, dass sich mit dem Anstieg an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen auch die Anzahl an regulatorischen T-Zellen erhöht.

Um zu entsprechenden Daten zu gelangen, wurden frische humane PBMCs gesunder Spender isoliert und diese für 24 Stunden nur mit Medium, mit dem HIV-ISU-Peptid Homopolymer (25 µg/ml) oder dem im Drosophila-Expressions-System hergestellten rekombinanten PERV-rp15E (25 µg/ml) inkubiert. Die verwendeten Homopolymere bzw. Proteine waren zuvor im IL-10-Cytokin-ELISA auf Aktivität getestet worden. Nach 24 Stunden wurde aus den Zellen die Gesamt-RNA isoliert. Es folgte eine cDNA Synthese wobei stets für jede Probe die gleiche Menge an RNA umgeschrieben wurde. Als negative Kontrolle wurde RNA aus der humanen T-Zelllinie C8166 isoliert. Diese Zelllinie exprimiert kein FoxP3. Um eine Positivkontrolle für die cDNA Synthese und die jeweilige PCR-Reaktion zu haben, wurde parallel in jedem Ansatz die mRNA von GAPDH gemessen. Zur Überprüfung der entsprechenden Primer und auf das Vorhandensein der Marker wurde vor dem Beginn der *Realtime*-PCR-Analyse eine Standard-PCR mit den entsprechenden Proben und Primern durchgeführt.

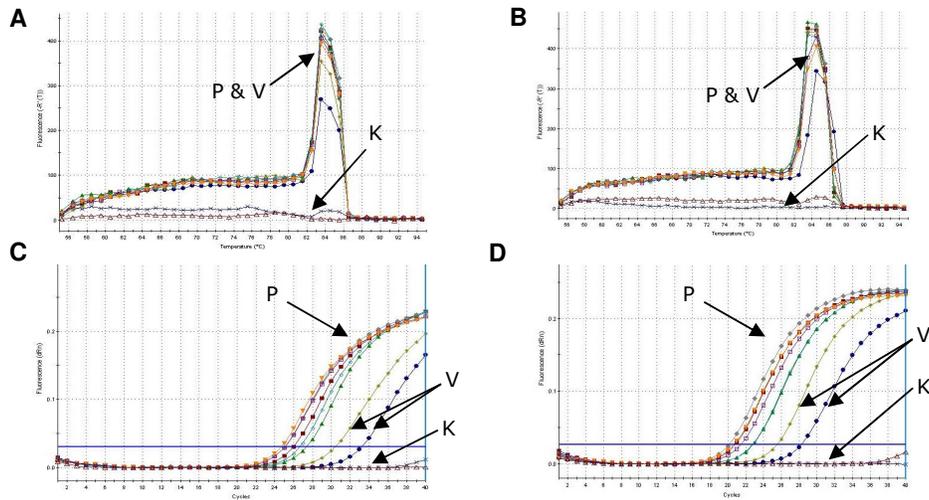


**Abbildung 3.18: Amplifikation von FoxP3 cDNA nach Isolation der Gesamt-RNA humaner PBMCs und der Zelllinie C8166 und anschließender reverser Transkription**

M – 1kB+ DNA Marker; 1 – FoxP3 in PBMC; 2 – GAPDH in PBMC; 3 – -RT Kontrolle FoxP3; 4 – -RT Kontrolle GAPDH; 5 – FoxP3 in C8166; 6 – GAPDH in C8166; 7 – H<sub>2</sub>O Kontrolle FoxP3; 8 – H<sub>2</sub>O Kontrolle GAPDH;

Die PCR zeigte, dass die FoxP3- und GAPDH-Primer jeweils ein spezifisches Amplifikat bei 197 bp bzw. 149 bp generieren. FoxP3 mRNA konnte in der PBMC-Probe, GAPDH in beiden Proben nachgewiesen werden. Aus der Gesamt-RNA der C8166-Zellen konnte kein spezifisches Amplifikat für FoxP3 generiert werden. Die GAPDH-Bande bestätigt dass in diesem Ansatz cDNA enthalten war. Die negativen Kontrollen, ohne Zugabe der reversen Transkriptase (-RT), schließen zelluläre DNA als Kontamination aus (Abbildung 3.18).

Es folgte die Quantifizierung der mRNA Level mittels SYBR-Green-*Realtime*-PCR unter den verschiedenen Bedingungen. Die eingesetzte RNA-Menge pro Einzelreaktion lag bei 60 ng. Da die Spezifität der Reaktion zuvor überprüft und gezeigt wurde, dass für jedes Primerpaar nur ein Produkt entsteht, reichte das Aufnehmen einer Schmelzkurve am Ende eines jeden Laufes zur Überprüfung der entstandenen Produkte.

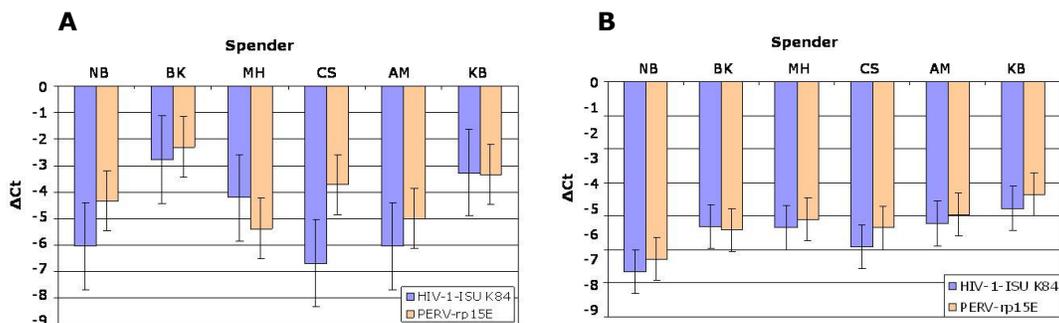


**Abbildung 3.19: Schmelzkurven für FoxP3 (A) und GAPDH (B), sowie die dazugehörigen Amplifikationskurven von FoxP3 (C) und GAPDH (D) der Ansätze vom 10.03.2005**

P - Proben (=mit ISU-Peptid-Homopolymer oder PERV inkubiert);  
 V - Vergleichsansatz (= Medium+Zellen);  
 K - -RT-Kontrollen und ddH<sub>2</sub>O-Kontrollen

Die Schmelzkurvenanalyse zeigte sowohl für das verwendete FoxP3-Primerpaar, als auch für die GAPDH-Primer einen spezifischen Produktpeak (Abbildung 3.19-A+B). Die gemessene Fluoreszenz ist spezifisch für die untersuchten Transkripte. Die Amplifikationskurven zeigen eine Veränderung der Transkriptionsaktivität beider Gene nach Inkubation mit den HIV-ISU-Homopolymeren und dem PERV-p15E im Vergleich zu den Kontrollproben (Abbildung 3.19-C+D).

Um eine Aussage über die Veränderung der mRNA-Level zu bekommen, wurden die gemessenen Daten der Ansätze, die mit dem HIV-ISU-Homopolymer bzw. dem PERV-rp15E gewonnen wurden, auf die unbehandelte Probe bezogen.



**Abbildung 3.20:  $\Delta$ Ct-Werte der SYBR-GREEN-Realtime-PCR für FoxP3 (A) und GAPDH (B) nach 24h Inkubation mit HIV-ISU-Homopolymer (K84) und PERV-p15E**

Die Werte wurden auf unbehandelte Proben abgeglichen. Als signifikant wird eine Abweichung von 1 Ct gewertet, was einer Veränderung der RNA-Ausgangskonzentration von 50% entspricht.

Die Daten zeigen bei allen Spendern eine signifikante Veränderung der FoxP3-Expression, d.h. der Ct-Wert verringert sich durch Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer um 75% bis 99% (2 - 6,5 Ct). Durch das Inkubieren der humanen

PBMCs mit PERV-rp15E verringert sich der Ct in einem Bereich zwischen 80% bis 98% (2,3 -5,3 Ct) (Abbildung 3.20-A). Eine Verringerung des Ct ist gleichzusetzen mit einem erhöhtem Level an spezifischer mRNA im Probenmaterial, was wiederum Ausdruck einer erhöhten Expression des untersuchten Markers ist. Zu beobachten war auch, wie bereits zuvor erwähnt (Abbildung 3.19-D), dass sich die Expression von GAPDH ebenfalls veränderte. Auch hier konnte eine Induktion des Enzyms gemessen werden. Die  $\Delta$ Ct-Werte veränderten sich in einem Bereich zwischen 96% und 99% (Verringerung: 4,5 - 7,5 Ct) (Abbildung 3.20-B).

Es wurde ein SYBR-Green-*Realtime*-Assay etabliert, mit dem die Expression von FoxP3 quantifiziert wurde. Durch Inkubation mit HIV-ISU-Homopolymeren und rekombinantem, endotoxinfreiem PERV-p15E erhöhte sich die Expression von FoxP3. Auch die Expressionslevel von GAPDH stiegen durch die Inkubation mit HIV-ISU und PERV-p15E an. Alle Spender reagierten ähnlich.

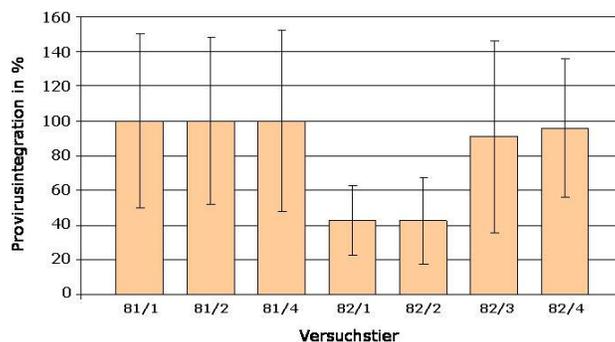
### 3.3 Induktion neutralisierender Antikörper gegen retrovirale transmembrane Hüllproteine

Die durch Retroviren induzierte Immunsuppression kann nur effizient verhindert werden, wenn das Virus am Eintritt in die Wirtszelle gehindert wird. Dafür ist die Ausprägung einer protektiven humoralen Immunantwort unerlässlich.

Die in der Arbeitsgruppe durch die Ansätze mit PERV und KoRV gewonnenen Daten sollten zu einer Strategie führen, neutralisierenden Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1 zu induzieren. Zusätzlich sollten die mit dem Versuch aus Abschnitt 3.1.2 induzierten Antikörper auf Neutralisation getestet und deren Epitope kartiert werden. Ziel dieser Versuche war es, eine mögliche Strategie zur Entwicklung einer Vakzine zu testen.

#### 3.3.1 Induktion neutralisierender Antikörper gegen das FeLV-p15E

Die im vorherigen Abschnitt induzierten Antikörper wurden auf Neutralisation des Virus FeLV-A getestet. Hierfür wurde der auf einer *Realtime*-PCR basierende Neutralisationsassay durchgeführt.

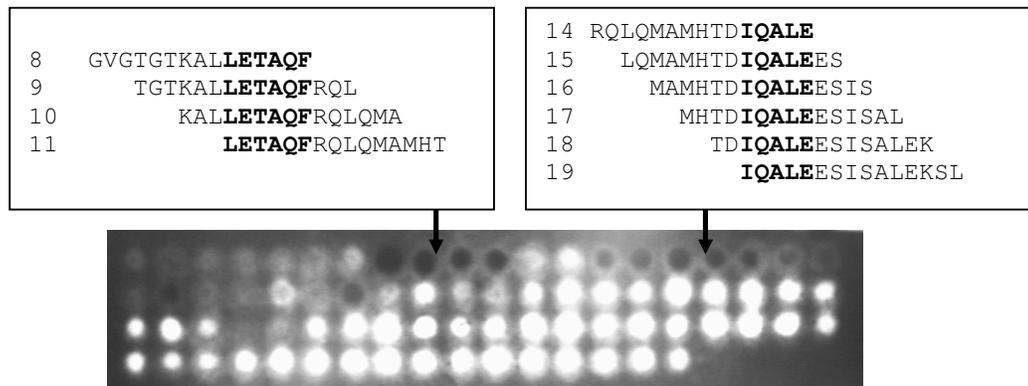


**Abbildung 3.21: Neutralisationstest der Rattenserien 81 und 82**

Bezeichnung: 81/1 = Gruppe/Tier

Nur zwei Tiere aus Gruppe 82, immunisiert mit dem Konstrukt FeLV- $\Delta$ isu-p15E, zeigten eine schwache Neutralisation an der Signifikanzgrenze von 50%, das entspricht einem  $\Delta$ Ct=1. Die Tiere der Gruppe 81, die mit FeLV-p15E immunisiert wurden, entwickelten keine neutralisierenden Antikörper (Abbildung 3.21).

Die Epitopkartierung zeigte die Bereiche, an denen die Antikörper auf dem FeLV-p15E binden.



**Abbildung 3.22: Epitopkartierung des Rattenserums 82/2 auf der Membran FeLV-p15E.**

Die erkannten Epitope sind fett gedruckt.

pAK: Rattenserum 82/2 1:500; sAK: anti-Ratte 1:5000

Die Epitopkartierung des Serums der Ratte 82/2 zeigte, dass zwei Epitope im N-terminalen Bereich des FeLV-p15E erkannt werden. Die detektierten Epitope sind LETAQF und IQALEE. Beide liegen im E1-Bereich. Im E2-Bereich werden keine Epitope erkannt (Abbildung 3.22).

Die mit rekombinatem FeLV-p15E induzierten Antikörper zeigten nur eine schwache Neutralisation von FeLV-A. Die getesteten Seren erkannten nur Epitope im N-terminalen Bereich, dem E1-Bereich, des FeLV-p15E.

### 3.3.2 Induktion neutralisierender Antikörper gegen HIV-1 gp41

Aufgrund der postulierten Mechanismen der neutralisierenden Antikörper, die gegen das HIV-1 gp41 gerichtet sind (Abschnitt 1.3.2) und den hier gewonnenen Daten wurde eine neue Strategie zur Induktion neutralisierender Antikörper entwickelt. Grundlage der Experimente sollte ein rekombinantes, verändertes transmembranes Hüllprotein des Koala-Retrovirus (KoRV) sein.

#### 3.3.2.1 Generierung rekombinanter KoRV-p15E-Proteine

Sequenzvergleiche zwischen den transmembranen Hüllproteinen der Retroviren HIV-1, PERV und KoRV zeigten auf den ersten Blick kaum Homologien. Die zentrale

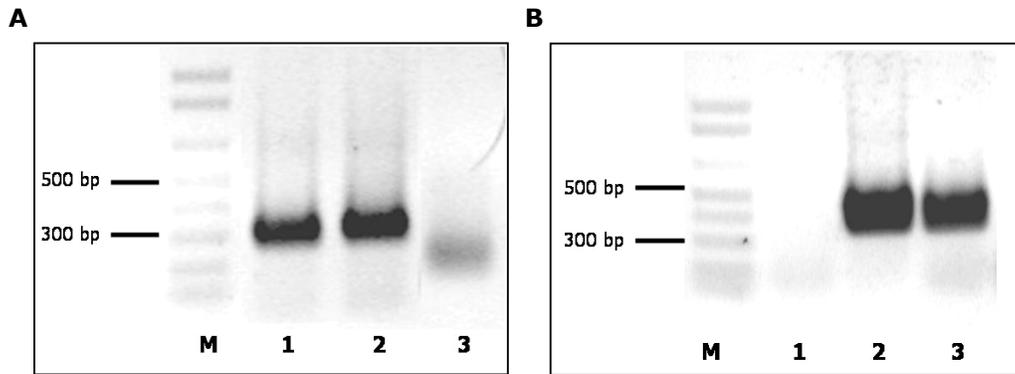
Konsensussequenz des Epitops des monoklonalen Antikörpers 4E10, WFN, stimmt jedoch in allen Viren überein (Abbildung 3.23-A).

A	PERV	LRERLE <u>RRRRERE</u> ADQGWFEG <u>WFNR</u> SPWM
	KoRV	LKERLDKRQLE <u>HQKNLS</u> WYEG <u>WFNR</u> SPWL
	HIV-1	NQQEKNEQELLE <u>LDK</u> WASLWN <u>WFN</u> ITNWL
B	KoRV	LKERLDKRQLE <u>HQKNLS</u> WYEG <u>WFNR</u> SPWL
	HIV-1	QQEKNEQELLE <u>LDK</u> WASL-WN <u>WFN</u> ITNWL
	KoRV	<u>LKERLDKRQLE</u> HQKNLSWYEG <u>WFNR</u> SPWL
	HIV-1	<u>LLE-LDK</u> WA----- <u>SL</u> -WN <u>WFN</u> ITNWL
C	KoRV	LKERLDKRQLE <u>HQKNLS</u> WYEG <u>WFNR</u> SPWL
	Ko-p15E2-AB	LKE <u>ELDK</u> WASE <u>LDK</u> WAS.
	Ko-p15E2-ABC	LKE <u>ELDK</u> WASE <u>LDK</u> WAS <u>WYEG</u> WFNIT.

**Abbildung 3.23: Sequenzvergleich des in der C-terminalen Region der Ectodomäne gelegenen E2-Epitopbereiches der transmembranen Hüllproteine der Retroviren PERV, KoRV und HIV-1**

fett gedruckt: Sequenzhomologien zu HIV-1 (Abbildung A+B) und KoRV-p15E (Abbildung C)  
 unterstrichen: Aminosäuren der Epitope der monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10

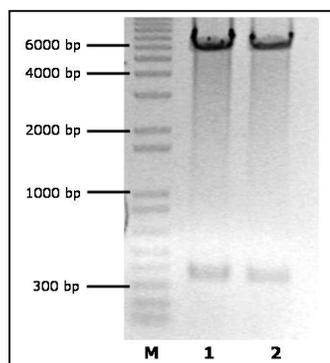
Konservierte Aminosäuren des rudimentär im KoRV-p15E enthaltenen 2F5-Epitops werden sichtbar, wenn man die Aminosäuresequenz des HIV-1 um eine Aminosäure N-terminal gegen das KoRV-p15E verschiebt. Noch weiter N-terminal gelegen finden sich die zentralen Aminosäuren LDK des 2F5-Epitops (Abbildung 3.23-B). Diese Daten sprechen dafür, das KoRV-p15E dem PERV-p15E für die Induktion 2F5-ähnlicher Antikörper vorzuziehen. Es ergeben sich mehrere Möglichkeiten, die Epitope des monoklonalen Antikörpers 2F5 in das KoRV-p15E zu klonieren. Ein Konstrukt, KoRV-p15E2-AB, sollte in doppelter Abfolge die Aminosäuresequenz ELDKWA enthalten. Ein weiteres rekombinantes Protein, KoRV-p15E2-ABC, sollte zusätzlich C-terminal das 4E10-Epitop enthalten, da auch hier die Abstände der bereits im KoRV-p15E enthaltenen Aminosäuren mit den in HIV-1 gp41 übereinstimmen (Abbildung 3.23-C). Durch zwei sequentielle PCRs sollte erst das Epitop des monoklonalen Antikörpers 2F5 (ELDKWAS) doppelt in das KoRV-p15E eingebracht werden. Die darauffolgende PCR nutzt das bereits mutierte KoRV-p15E als *Template* und bringt durch eine weitere Mutagenese das Epitop des monoklonalen Antikörpers 4E10 (WNWFNIT) in das schon veränderte KoRV-p15E ein.



**Abbildung 3.24: Amplifikate nach der Mutagenese-PCR zur Generierung der Fragmente KoRV-p15E2-AB (A) (Größe 313 bp) und der Folgemutation zum Fragment KoRV-p15E2-ABC (B) (Größe 341 bp)**

A) M – 1 kB+ DNA-Marker, 1+2 – KoRV-p15E2-AB; 3 – ddH<sub>2</sub>O Kontrolle  
 B) M – 1 kB+ DNA-Marker, 1 – ddH<sub>2</sub>O Kontrolle; 2+3 – KoRV-p15E2-ABC

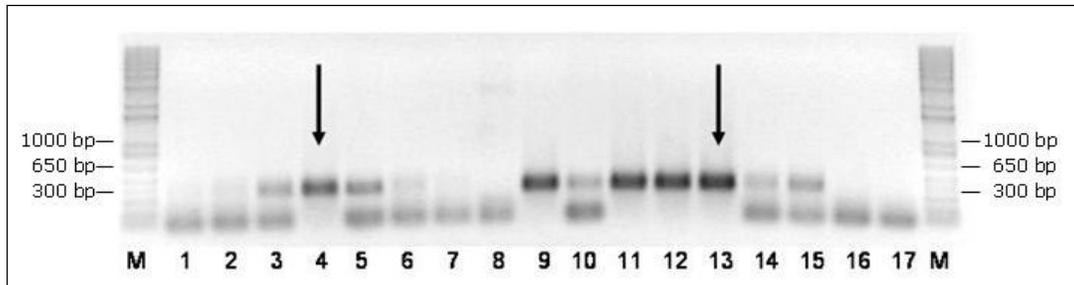
Als *Template* der Mutationen diente das bereits im Vektor pCal-n vorliegende KoRV-p15E. Die Analyse der PCR zur Generierung von KoRV-p15E2-AB im Agarose Gel zeigte eine Bande in der Höhe über 300 bp (Abbildung 3.24-A). Die Bande wurde aus dem Gel extrahiert. Um das Konstrukt KoRV-p15E2-ABC herzustellen wurde die zweite PCR auf dem *Template* KoRV-p15E2-AB durchgeführt. Auch hier zeigte sich im Agarosegel eine Bande in der berechneten Größe von ca. 340 bp (Abbildung 3.24-B). Zur Klonierung in den bakteriellen Expressionvektor pCal-n wurden die Fragmente und der Vektor mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI verdaut. Im Vektor befand sich zuvor das KoRV-p15E. Durch die Restriktion wurde es aus dem Vektor entfernt und man sah die Bande bei 350 bp im Agarosegel (Abbildung 3.25).



**Abbildung 3.25: Restriktion von pCal-n-PERV-p15E mit BamHI und EcoRI als Vorbereitung zur Klonierung der Fragmente KoRV-p15E2-AB und KoRV-p15E2-ABC.**

M – 1 kB+ DNA Marker  
 1+2 – Restriktion des Konstruktes pCal-n-PERV-p15E

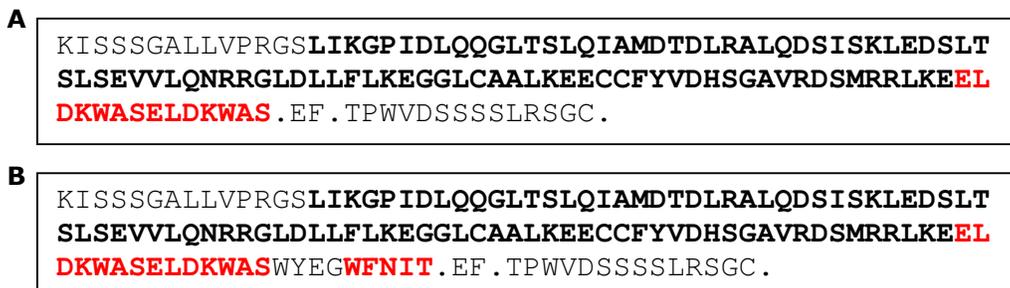
Die Bande bei 5,8 kb, die dem Leervektor entspricht, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA wurde aus der Agarosematrix extrahiert. Die Fragmente wurden nach der Restriktion einer Phenol-Chloroform-Extraktion und einer anschließenden Ethanol-fällung unterzogen, um die Restriktionsenzyme und Puffer zu entfernen. Die Ligation der Fragmente in den Vektor erfolgte über Nacht bei 16°C. Der Ligationsansatz wurde am folgenden Tag in *E.coli* Top10 Zellen transformiert. Ein Teil der gewachsenen Klone wurde mittels einer Plasmid-Mini-Präparation überprüft.



**Abbildung 3.26: PCR der Plasmid-Minipräparation der potentiellen Klone KoRV-p15E2-AB und KoRV-p15E2-ABC**

M: 1kb+ DNA-Marker; 1-8: Mini-Prep der potentiellen Klone KoRV-p15E2-AB; 9-17: Mini-Prep der potentiellen Klone KoRV-p15E2-ABC

Es konnte ein positiver Klon für das Konstrukt KoRV-p15E2-AB und vier positive Klone für das Konstrukt KoRV-p15E2-ABC identifiziert werden. Mit den Klonen 4 (KoRV-p15E2-AB) und 13 (KoRV-p15E2-ABC) wurde weitergearbeitet (Abbildung 3.26). Beide Konstrukte wurden sequenziert, da man die Fragmente mit einer PCR nicht unterscheiden konnte.



**Abbildung 3.27: Sequenzierungen der Klone 4 (KoRV-p15E2-AB) und 13 (KoRV-p15E2-ABC) in den Einbuchstabencode der proteinogenen Aminosäuren übersetzt**

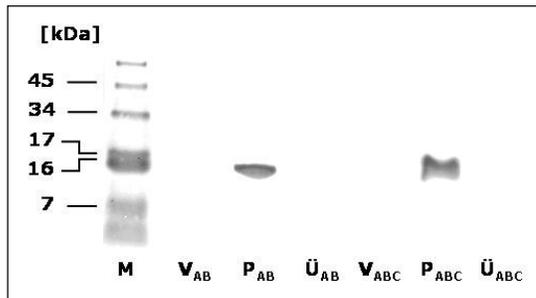
A) Vorwärtssequenz des Klons KoRV-p15E2-AB (=Klon4);  
 B) Vorwärtssequenz des Klons KoRV-p15E2-ABC (=Klon13);

normal gedruckt: Vektorsequenz; fett gedruckt: Sequenz des Inserts; rot: mutierte Sequenzen;

Die Sequenzierung zeigt, dass in Klon 4 (KoRV-p15E2-AB) zweimal das Epitop ELDKWAS und in Klon13 (KoRV-p15E2-ABC) zusätzlich das 4E10 Epitop WFNIT eingebracht wurde. Es sind keine Stoppcodons oder unerwünschte Aminosäureaustausche während der Mutation eingebracht wurden. Man kann auch sehen, dass die rekombinante Sequenz im gleichen Leserahmen wie das für die Affinitätschromatographie wichtige CBP kloniert wurde (Abbildung 3.27).

Die beiden Klone wurden in den bakteriellen Expressionsstamm *E.coli* BL21 retransformiert. Die rekombinanten Proteine wurden in 200ml LB-Amp submers-Kulturen exprimiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch eine Zugabe von 100mM IPTG bei  $OD_{600}=0,5$  und dauerte 3 Stunden. Danach wurden die Bakterien pelletiert und in  $CaCl_2$ -Puffer aufgenommen. Nach der Ultraschallbehandlung wurden erneut die Zelltrümmer durch Zentrifugation pelletiert. Sowohl das Pellet, als auch der

Überstand wurden in Western Blot Analysen eingesetzt, um zu überprüfen, ob die rekombinanten Proteine exprimiert wurden und ob sie löslich sind oder nicht.



**Abbildung 3.28: Western Blot Analyse der Expressionen von KoRV-p15E2-AB und KoRV-p15E2-ABC**

pAK: 2F5 1:30000; sAK: anti-human 1:5000

M – SeeBlue® Plus 2 Protein Marker; V – Pellet vor Induktion; P – Pellet nach Induktion; Ü – Überstand nach Aufschluss der Zellen

Im Western Blot wurde eine Bande bei ca. 16 kDa bei den Zellpellets nach Induktion detektiert. Weder vor, noch nach der Induktion lassen sich Banden in den Überständen detektieren. Das war als Hinweis zu sehen, dass die rekombinanten Proteine in wässrigen Phasen nicht löslich sind. Beide Konstrukte wurden stark durch den humanen monoklonalen Antikörper 2F5 erkannt, der nur das Epitop ELDKWAS bindet (Abbildung 3.28).

Es wurde zwei rekombinante KoRV-p15E-Proteine generiert. Das Konstrukt KoRV-p15E2-AB enthält im membranproximalen Bereich zweimal das Epitop ELDKWAS des monoklonalen, neutralisierenden Antikörpers 2F5. Das Konstrukt KoRV-p15E2-ABC trägt C-terminal zusätzlich das Epitop des monoklonalen neutralisierenden Antikörpers 4E10. Beide rekombinanten Proteine konnten bakteriell exprimiert werden. Sie sind unlöslich in wässriger Phase und konnte deshalb nicht über eine Calmodulin-Affinitätschromatographie gereinigt werden.

### 3.3.2.2 Induktion neutralisierender Antikörper gegen HIV-1 gp41 durch rekombinante KoRV-p15E-Proteine

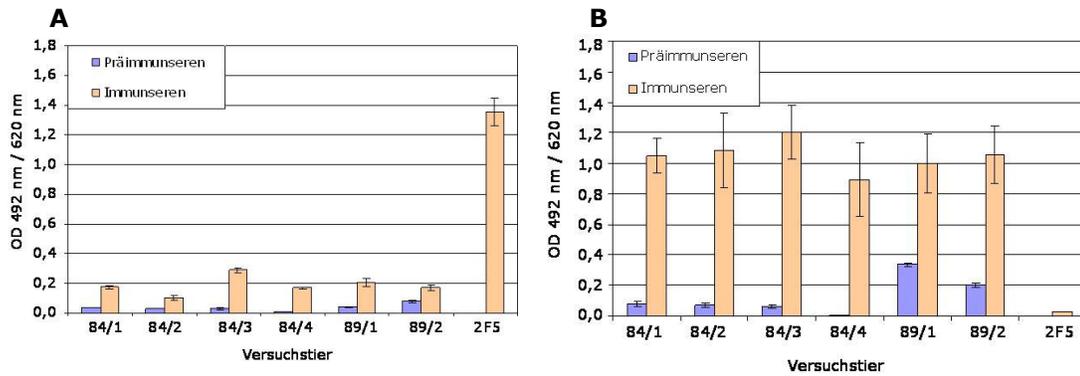
Trotz der Unlöslichkeit wurden diese Proteine zur Immunisierung von Ratten verwendet. Um die Reinheit zu erhöhen, wurden die Pellets 3 mal in 40 ml PBS resuspendiert, 3x20s ultraschallbehandelt und anschließend für 10 Minuten bei 20000xg und 4°C zentrifugiert.

Vor der Immunisierung wurde das Pellet in 10 ml PBS gelöst. Davon wurden pro Tier 1ml zur Immunisierung eingesetzt. Das rekombinante Protein wurde 1:1 mit inkompletten Freund'schem Adjuvant (IFA) gemischt. Die Immunisierungsstrategie beinhaltet einen Boost nach drei Wochen nach gleichen Bedingungen (Tabelle 3.2).

Konstrukt	Gruppe	Volumen Proteingemisch in µl/Tier	Boost
KoRV-p15E2-AB	84	1000	Tag 21
KoRV-p15E2-ABC	89	1000	Tag 21

**Tabelle 3.2: Immunisierungsbedingungen für die Ansätze der Konstrukte KoRV-p15E2-AB und KoRV-p15E2-ABC**

Am Tag 42 nach der Immunisierung wurde den Ratten Blut entnommen. Aus dem Vollblut wurde Serum gewonnen. Die Seren wurden im Peptid-ELISA auf bindende Antikörper überprüft.



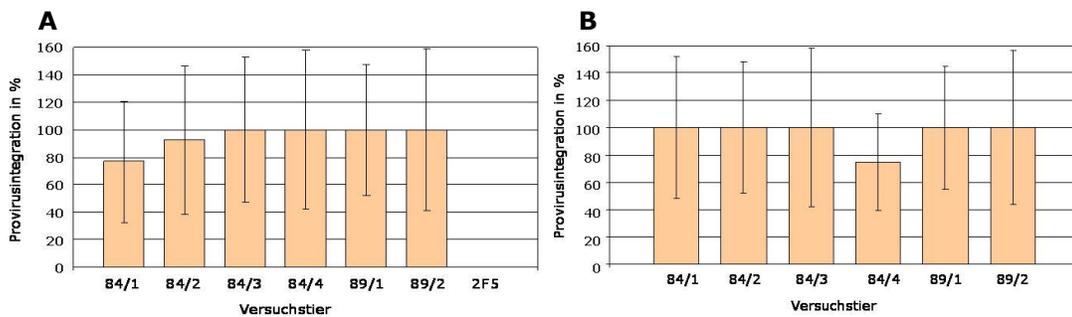
**Abbildung 3.29: ELISA zum Nachweis bindender Antikörper in den Seren der immunisierten Ratten**

A) Peptid-ELISA gegen das Peptid 373 (Peptidset, NIH, USA)  
B) Protein-ELISA gegen Koala-p15E.

pAK: Rattenserum 1:100 bzw. 2F5 0,2 µg/ml  
sAK: anti-Ratte 1:5000 bzw. anti-human 1:5000

In beiden Versuchen zeigten die Präimmunsereen eine deutlich schwächere Bindung als die entsprechenden Immunsereen. Die Bindung der Seren an ein Peptid (E2-Long), das die Sequenz ELDKWA enthält, ist um den Faktor 7 schwächer, als die Bindung des monoklonalen Antikörpers 2F5 (Abbildung 3.29-A). An das Koala p15E konnte eine stärkere Bindung detektiert werden. 2F5 bindet hier nicht signifikant (Abbildung 3.29-B).

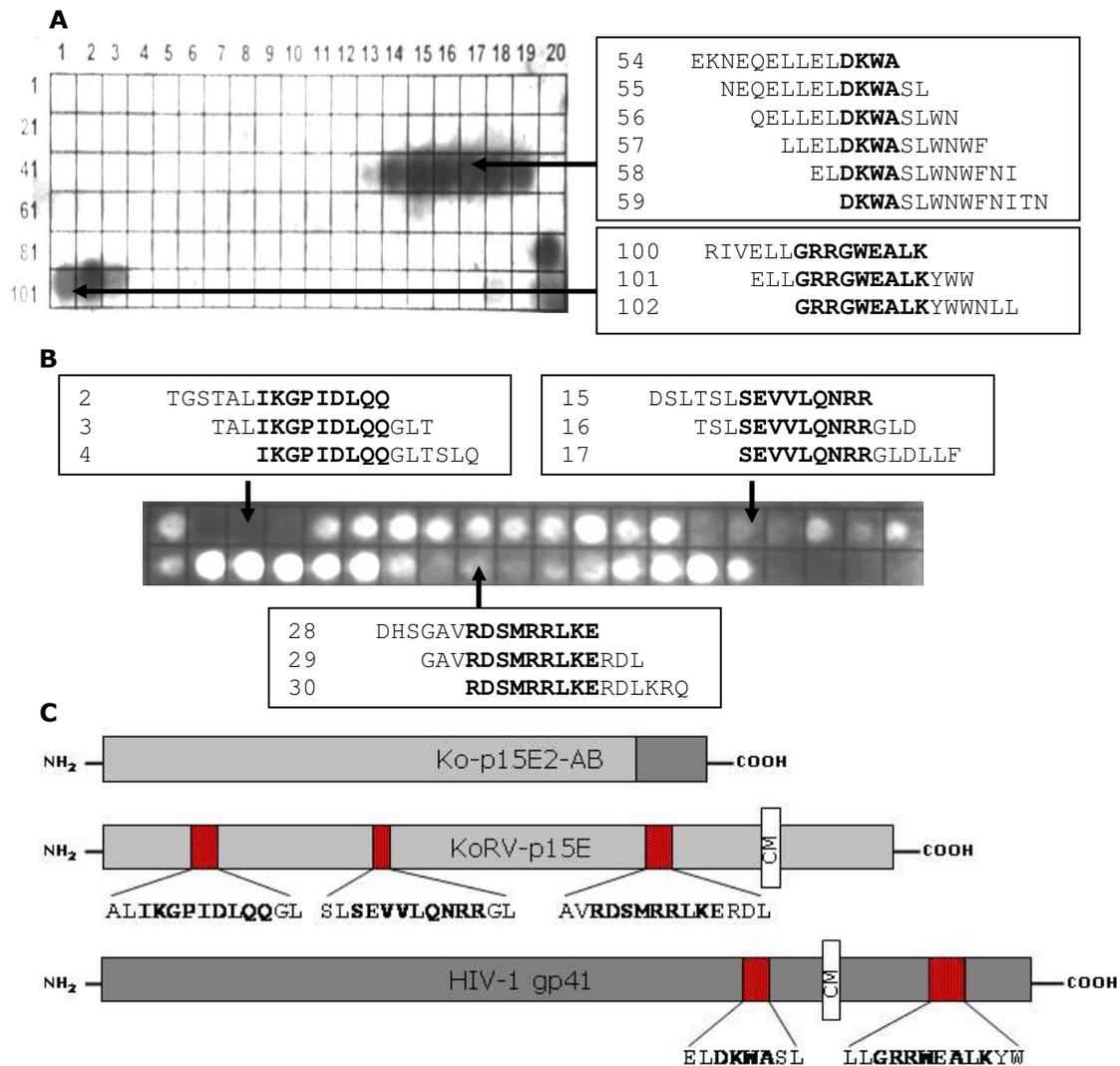
Um zu einer Aussage hinsichtlich des möglichen Einsatzes der Konstrukte im Rahmen der Entwicklung einer HIV-Vakzine zu gelangen, sollte das Neutralisationspotential der induzierten Antikörper überprüft werden. Hierzu wurde sowohl die Neutralisation des HIV-1 IIIB als auch des KoRV überprüft. Im Neutralisationstest konnte weder eine signifikante Neutralisation des HIV-1 IIIB noch des KoRV gemessen werden (Abbildung 3.30).



**Abbildung 3.30: Ergebnisse der HIV- (A) und KoRV-Neutralisationstests (B) bei denen die Rattenserum der Gruppen 84 und 89 eingesetzt wurden.**

Die Provirusintegration ergibt sich aus der Berechnung der  $2^{-\Delta Ct}$ -Werte der Präimmunsereen zu den Immunsereen.

Um weitere Erkenntnisse über die induzierten Antikörper zu bekommen und eine mögliche Erklärung der Ergebnisse zu erlangen, wurde eine Epitopkartierung durchgeführt. Hierfür wurde das Serum ausgewählt, welches im Peptid-ELISA die stärkste Bindung aufwies. Es wurden das Rattenserum 84/3, generiert durch Immunisierung mit KoRV-p15E-AB, auf der Membran des HIV-1 gp41, sowie auf der Membran des KoRV-p15E epitopkartiert.



**Abbildung 3.31: Epitopkartierungen des Rattenserums 84/3 auf HIV-1 Membran (A) und auf der KoRV-Membran (B), sowie die Lage der Epitope auf den nativen Proteinen (C)**

Die durch die induzierten Antikörper erkannten Epitope sind fett gedruckt. Die roten Balken in Abbildung C stellen die Lage der erkannten Epitope auf den Ausgangsproteinen dar.

pAK: Rattenserum 84/2 1:500; sAK: anti-Ratte 1:5000; Abbildung 3.31-C: CM = virale Hüllmembran

Die Epitopkartierung des Rattenserums 84/3 zeigt, dass ein Subepitop, DKWA, im membranproximalen Epitop des monoklonalen Antikörpers 2F5 erkannt wird. Weiterhin wird ein C-terminales Epitop im intraviralen Bereich des HIV-1 IIIB gp41, nahe der Transmembrandomäne des gp41 erkannt. Die Sequenz des Epitops ist GRRGWEALK. Im E1 Bereich erkennt das Serum kein Epitop (Abbildung 3.31-A). Die

Epitopkartierung auf der KoRV-p15E Membran zeigt, dass drei Bereiche erkannt werden. Stark detektiert wird die Sequenz IKGPIDLQQ im N-terminalen Bereich und SEVVLQNRR in der NHR-Region des KoRV-p15E. Eine schwache Bindung an die im C-terminalen Bereich liegende Sequenz RDMRRLKE war ebenfalls zu erkennen (Abbildung 3.31-B).

Es wurden Antikörper induziert, die das Epitop DKWA im membranproximalen Bereich des HIV-gp41 erkennen. Sie waren nicht in der Lage, den Laborstamm HIV-1 IIIB zu neutralisieren. Außerdem wurden Antikörper gegen das Ausgangsprotein KoRV-p15E induziert, die stark im N-terminalen Teil und schwächer im C-terminalen Teil des KoRV p15E binden. Auch diese waren nicht in der Lage, das Koala-Retrovirus zu neutralisieren.

## 4. Diskussion

### 4.1 Cytokinmodulation durch transmembrane Hüllproteine und ISU-Peptide

#### 4.1.1 Reproduzierbarkeit von Kopplungen mit der EDC-Methode

Um zu untersuchen, ob das HIV-ISU-Peptid einen Einfluss auf die IL-10-Expression humaner PBMCs hat, wurden die Monomere zu Peptidhomopolymeren gekoppelt. Durch die homogene Kopplung konnte der Einfluss fremder Parameter, wie zum Beispiel Trägermoleküle, in dem Testsystem reduziert werden. Die Vernetzung erfolgte durch die chemische Kopplung unter der Verwendung von EDC. Es entstehen bei dem verwendeten Verfahren keine bestimmten Vernetzungsgrade, also keine definierten Banden. Alle Tests wurden deshalb mit einem Gemisch aus Homopolymeren durchgeführt. Allein die Färbung im Coomassie-Gel ließ einen Schluss auf die erfolgreiche Polymerisierung zu. Unberücksichtigt bleiben dabei mögliche Unterschiede der gebildeten Konformationen. Einen Hinweis auf die Verteilung der unterschiedlichen Vernetzungsgrade liefert der Vergleich von Western-Blot und Coomassie-Gel. Durch die Coomassie-Blau-Färbung waren nur Strukturen bis zu einer Größe von ca. 20 kDa darstellbar. Die darüberliegenden Strukturen lagen unter der Nachweisgrenze von Coomassie-Blau und konnten nur mittels spezifischer Detektion im Western-Blot nachgewiesen werden. Das zeigt, dass weniger vernetzte Strukturen entstehen als unvernetzte Strukturen. Man verhindert zwar mit der Kopplung zu Homopolymeren durch EDC das Einbringen fremder Testparameter durch Trägermoleküle, hat aber nur eine geringe Qualitätskontrolle des Prozesses und keine garantierte Funktionalität. Die Kopplungen ab der laufenden Nummer 95 zeigten fast immer keine biologische Wirksamkeit. Der Zusatz von Sulfo-NHS zur Stabilisierung der Intermediate konnte die Ausbeuten zwar bei 20% stabilisieren, brachte aber keine Erhöhung der biologischen Aktivität (Tabelle 1 Anhang).

Die ISU- und RAN-Monomere besitzen jeweils sechs freie Amino- und drei freie Carboxylgruppen, die an der Polymerisierung beteiligt sein könnten. Mit zunehmenden Vernetzungsgrad der Peptide vergrößert sich auch die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Loop-Strukturen. Das könnte eine mögliche Erklärung der Wirksamkeit hochmolekularer Strukturen bzw. der hochmolekularen Fraktionen sein. Die Verteilung der möglichen Konformationen kann, wenn überhaupt nur statistisch abgeschätzt werden, wie folgendes Beispiel zeigen soll: Es gibt  $6 \times 3 = 18$  (freie Aminogruppen  $\times$  freie Carboxylgruppen) mögliche intramolekulare Crosslinks pro Monomer. Geht man davon aus, dass mindestens eine reaktive Gruppe zur intermolekularen Kopplung frei bleiben muss, reduzieren sich die intramolekularen Kopplungsmöglichkeiten auf 15 bei einer blockierten Aminogruppe, oder auf 12 bei einer blockierten Carboxylgruppe. Alle weiteren Berechnungen gehen von 12 verschiedenen intramolekularen Konformationen aus. Wenn man wie in Abschnitt 3.1.1 von einer hochmolekularen Fraktion mit  $MWCO > 30000$  Da ausgeht, müssen mindestens Homo-14mere ( $n=14$ ,  $MW=2,3$  kDa pro Monomer) entstehen, um nicht während der Separation aus dem Kopplungsgemisch zu entfallen. Es ergeben sich im kleinstmöglichen Fall schon  $1 \times 10^{12}$  Kombinationsmöglichkeiten ( $k$ ) pro 14mer. Diese erhöhen sich mit Zunahme des Vernetzungsgrades  $+1$  auf  $k=(12 \cdot n!) \cdot (n+1)$ . Das Molekulargewicht eines HIV-ISU-Monomers beträgt 2,3kDa ( $=2,3$  g/mol), was einer

Teilchenzahl von ca.  $1,4 \times 10^{24}$  Teilchen (hier die Monomere) entspricht. Davon werden im Kopplungsansatz nur 8 mg ( $= 8 \times 10^{-3}$ g) eingesetzt, was die eingesetzte Zahl an Monomeren pro Ansatz auf ca.  $1,4 \times 10^{21}$  begrenzt. Damit ergeben sich allein für den einfachsten angenommenen Fall der 14mere in einem Kopplungsansatz ca.  $1,4 \times 10^{33}$  Konformationsmöglichkeiten.

Da man aber davon ausgehen kann, dass es aufgrund von sterischen und energetischen Gründen bevorzugte sowie unmögliche Konformationsmöglichkeiten gibt, wird sich die Anzahl an wirklich entstandenen Strukturen reduzieren. Zu berücksichtigen wäre dabei eine Mindestanzahl an exponierten Strukturen pro Molekül, um eine Wirksamkeit zu erreichen. Obwohl die Wahrscheinlichkeit, zwei molekular identische Kopplungen zu erzeugen, verschwindend klein ist, zeigen immerhin mehr als 50% der Konjugate eine Aktivität.

Ein weiterer Nachteil kann die ungerichtete Vernetzung der Monomere miteinander sein. Wie zuvor dargestellt sind alle funktionellen Amino- und Carboxylgruppen in die Polymerisation mit einbezogen. Damit ist es fraglich, ob die im Homopolymer eingenommene Konformation der nativen Konformation nahe kommt. Um alle Möglichkeiten der Wirkung, also hydrophobe Interaktionen und Ladungseffekte der Seitenketten, zu berücksichtigen, sollte eine Kopplungsmethode gewählt werden, bei der nur die primären Amino- und Carboxylgruppen die Polymerisation bewirken. Bei der weiteren Verwendung der EDC-Methode wäre zumindest eine Blockierung der sekundären, tertiären usw. funktionellen Gruppen zu empfehlen. Der Vorteil, den die Kopplung der HIV-ISU-Peptide bietet, ist, dass alle beobachteten Effekte für die verwendete Aminosäuresequenz, also für die ISU-Domäne von HIV-1, spezifisch sind.

#### **4.1.2 Monomere vs. Homopolymere: Ist eine Kopplung zu Peptid-Homopolymeren notwendig?**

Hintergrund der Vorgehensweise, Peptide zu Homopolymeren zu koppeln, waren Erkenntnisse, dass der Einsatz der HIV-ISU Monomere keinen biologischen Effekte zeigte [Denner et al., 1994]. Für das HIV-ISU-Monomer konnte gezeigt werden, dass dieses erst eine immunsuppressive Wirkung, gemessen als Hemmung der T-Zell-Proliferation, besitzt, wenn es an größere Trägermoleküle wie BSA gekoppelt wurde [Denner et al., 1994]. Dukers et al. konnten aber auch mit sehr kurzen Peptiden, die weder als homologe noch als heterologe Konjugate eingesetzt wurden, eine PHA-stimulierte Teilung von T-Zellen unterdrücken. Die in ihrer Studie eingesetzten Peptide leiteten sich von Latency-Membran-Protein (LMP) des Epstein-Barr-Virus ab und wiesen Sequenzhomologie zur CKS 17 auf. Sie zeigten sogar, dass kurze Peptide eine stärkere Inhibition der Proliferation hervorriefen als die längeren Peptide. Eine Acetylierung des N-terminus steigerte die immunsuppressive Wirkung der Monomere [Dukers et al., 2000]. Vermutlich ist das auf die sich aus der Ladungsblockierung ergebenden Verstärkung der Hydrophobizität der Peptide zurückzuführen. Die gesteigerte Hydrophobizität könnte in den Experimenten der Dukers Gruppe zur intermolekularen Wechselwirkung der Peptide geführt haben. Diese bilden dann größere Aggregate und die Ergebnisse könnten so von hochmolekularen Strukturen hervorgerufen worden sein. Sie können dann noch besser miteinander interagieren reagieren und sich zu größeren Molekülen zusammen lagern. Diese wären in der Lage,

mehre Rezeptoren gleichzeitig zu binden, wie es auch für Cytokine postuliert wird. Dadurch könnten sie einen Effekt auf die intrazelluläre Signaltransduktion haben. Durch die erhöhte Hydrophobizität wäre auch eine Interaktion mit der Zellmembran begünstigt, welche wiederum einen Einfluss auf die Zelle haben könnte. In unserer Arbeitsgruppe wurden nicht blockierte Peptide verwendet, eine hydrophobe Interaktion der Peptide miteinander wäre somit energetisch ungünstiger. Erst durch eine chemische Kopplung konnten im Ansatz unserer Arbeitsgruppe hochmolekulare Strukturen entstehen. Hochmolekulare Strukturen würden mehr Bindungsstellen für potentielle Rezeptoren aufweisen und könnten sie so miteinander vernetzen. Ein sich aus der Rezeptorbindung ergebender Effekt auf die Signaltransduktion wäre dadurch amplifiziert. Das kann ein Grund dafür sein, warum wir weder eine Hemmung der Proliferation von T-Zellen noch eine Induktion von IL-10 bei humanen PBMCs durch das ungekoppelte HIV-ISU-Peptid beobachten konnten, während die HIV-ISU-Homopolymere eine Induktion der IL-10-Produktion hervorriefen.

#### **4.1.3 Funktionalität der Peptid-Homopolymere**

Die Homopolymere wurden im IL-10-Cytokin-ELISA eingesetzt und es konnte gezeigt werden, dass die IL-10-Expression humaner PBMCs beeinflusst wird, wenn sie mit dem HIV-ISU-Peptid-Homopolymer inkubiert wurden. Es zeigte sich, dass nicht alle synthetisierten Homopolymere biologisch aktiv (Abbildung 3.2-C) waren. Zeigten sie eine Reaktion, war diese konzentrationsabhängig (Abbildung 3.2-A). Zu den nicht konstanten Ergebnissen der Vernetzungsreaktion kamen unterschiedlich stark reaktive Spender. Es ergaben sich mit ein und dem selben Konjugat unterschiedlich hohe Induktionsraten von IL-10. Außerdem zeigte sich, dass die Reaktivität eines Spenders ebenfalls vom Zeitpunkt der Blutentnahme abhing. Entnahm man einem Spender an drei verschiedenen Tagen Blut, reagierte er mit dem selben Konjugat unterschiedlich stark. Die Werte schwankten bis zu 100% (Abbildung 3.2-B). Das lässt den Schluss zu, dass der jeweilige Immunstatus des Spenders berücksichtigt werden muss. Hierbei können eigene Erkrankungen des Spenders oder der Kontakt des Spenders mit erkrankten Personen zu einer Aktivierung des Immunsystems führen und somit diese unterschiedlich starken Reaktivitäten verursachen. Um eine notwendige Standardisierung der Spendersituation zu erreichen, müsste die Zusammensetzung der isolierten PBMCs mittels Durchflusszytometrie überprüft werden. Die Aufnahme einer kurzen, freiwilligen abgegebenen Anamnese des Spenders, sowie ein Blutsenkungstest kann einen Aufschluss über den Gesundheitszustand und damit der Verwendbarkeit des Spenders geben. Alternativ könnte der Einfluss der HIV-ISU-Homopolymere auf die IL-10-Expression humaner PBMCs mit einer monocytären Zelllinie untersucht werden. Durch den Einsatz einer immer standardmäßig behandelten Zelllinie wären spenderspezifische Schwankungen auszuschließen.

Der beobachtete Effekt der erhöhten IL-10-Expression nach Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer liefert eine Erklärung der Ergebnisse von Takeshita et al. und Barcova et al. Das HIV-ISU Peptid leitet sich aus der Ectodomäne des HIV-1 gp41 ab, für das eine IL-10 Induktion bei PBMCs bereits nachgewiesen wurde [Takeshita et al., 1995, Barcova et al., 1998; Denner et al., unveröffentlicht]. Die Induktion von IL-10 nach Exposition von PBMCs wurde dabei sowohl durch RT-PCR als auch im Western-

Blot nachgewiesen [Koutsonikolis et al., 1997]. Unsere Daten sind ein Hinweis darauf, dass die durch gp41 vermittelte IL-10 Induktion bei humanen PBMCs durch die ISU-Domäne ausgelöst werden könnte.

Die Separation der Konjugate in eine hoch- und eine niedermolekulare Fraktion zeigte, dass bis auf eine Ausnahme nur die hochmolekulare Fraktion in der Lage war, IL-10 zu induzieren. Die Reaktionen fielen insgesamt aber immer schwächer aus, als die Werte des gleichen Spenders, die am gleichen Tag mit dem nicht fraktionierten Konjugat erreicht wurden (Abbildung 3.3). Eine Ursache für die geringere Reaktivität könnte die gebildete Konformation der Homopolymere sein. Hierbei wurden bisher spezifische, exponierte Raum- und Loopstrukturen als Ursache für immunsuppressive Wirkungen diskutiert. Monell et al. [1994] verglichen Defensine, das sind positiv geladene, antimikrobielle Oligopeptide aus Neutrophilen Granulocyten, mit den HIV-ISU-Peptiden. Die Wirksamkeit der Defensine begründet sich ihrer Meinung nach in den gefalteten Loopstrukturen, die durch amphiphatische Domänen direkt mit der Proteinkinase C (PKC) in Zellmembranen interagieren können. Als Folge dieser Interaktion werden Signaltransduktionswege aktiviert. Durch intramolekulare Kopplungen zwischen freien Amino- und Carboxylgruppen könnten sich auch bei den ISU-Peptiden defensinähnliche Foldstrukturen ausbilden. Die Tatsache, dass ein Gemisch aus hoch- und niedermolekularen Strukturen nicht aktiv ist, und eine Trennung in zwei Fraktionen eine Aktivität hervorruft, kann mit der Blockierung der aktiven Loops durch Mono-, Di- oder Trimere erklärt werden. Durch die Zentrifugation könnten diese von den hochmolekularen Homopolymeren abgelöst werden. Die hochmolekularen Homopolymere werden durch die Zentrifugalkraft auf die Separationsmembran gepresst. Durch das Auftreten von Scherkräften könnte die niedermolekularen Strukturen, z.B. Mono-, Di- oder Trimere, von dem großen Aggregat abgetrennt werden. Die würden die Membran aufgrund der geringen Größe passieren können. Dadurch könnten diese Moleküle von den blockierten Strukturen getrennt werden. Die freigelegten Loops oder Strukturen könnten entweder auf dem Defensin-ähnlichen Weg [Monell et al., 1994] oder über die Interaktion mit den potentiellen Rezeptoren erfolgen [Denner, 1998]. Die deutlich geringere Aktivität der niedermolekularen Struktur auf die IL-10-Expression humaner PBMCs deutet auf die rezeptorvermittelte Induktion der IL-10-Expression hin. Es kann argumentiert werden, dass der amplifizierende Effekt der Stimulation mehrerer homologer Rezeptoren gleichzeitig notwendig ist, um eine deutlich messbare Veränderung der IL-10-Expression hervorzurufen. Die starke Anfärbung der Coomassie-Gele bis nur ca. 7 kDa kann eine Hinweis darauf sein, dass hier hauptsächlich Di- und Trimere entstanden sind, welche die keine Multiplizität des rezeptorvermittelten Effektes auslösen können. Der Einfluss des Spenders auf die Stärke der induzierenden Wirkung der Homopolymere kann durch die Auswertung der Tests mit den fraktionierten Homopolymeren K90 und K91 dargestellt werden. Es ließ sich eine klare Reihenfolge in der Suszeptibilität der PBMCs für die Induktion der IL-10-Expression durch das ISU-Homopolymer reproduzieren. Am stärksten reagierte JM, gefolgt von ML und IB. Berücksichtigt man die Standardabweichung, kann man diese Reihenfolge auch auf die Induktionsstärke der hochmolekularen Fraktion übertragen (Abbildung 3.3-C+D). Zukünftige Versuche könnten alternativ, wie in Abschnitt 4.1.3 vorgeschlagen, mit einer monocytären Zelllinie durchgeführt werden.

#### 4.1.4 Proteinexpression im Drosophila-Expressions-System als kostengünstige Alternative zum Einsatz von Peptiden

Der Einsatz von rekombinanten Proteinen aus endotoxinfreien Expressionssystemen zur Untersuchung des Einflusses rekombinanter transmembraner Hüllproteine auf die IL-10-Expression humaner PBMCs *in vitro*, sollte konstantere experimentelle Bedingungen schaffen, als es mit den Peptid-Homopolymere der Fall war. Dabei wurde ein Vergleich des Effektes eines endotoxinfrei exprimierten rekombinanten transmembranen Hüllproteins mit und ohne ISU-Domäne vorgenommen. Die ISU-Domänen der Vergleichskonstrukte PERV-p15E und FeLV- $\Delta$ isu-p15E sind zu 100% identisch. Dadurch wäre die Beobachtung eines möglichen Unterschiedes im Effekt auf die IL-10-Expression humaner PBMCs allein auf die ISU-Domäne zurückzuführen. Die Expression von FeLV- $\Delta$ isu-p15E wird in Abschnitt 4.1.5 diskutiert.

Das bereits in dem Drosophila Expressionvektor vorhandene PERV-p15E musste erneut in Drosophila Zellen transfiziert werden. Versuche, das rekombinante Protein mit einer bereits vorhandenen Zelllinie zu exprimieren scheiterten. Es war kein Protein mittels Western-Blot im Zellkulturüberstand nachweisbar (Abbildung 3.9). Mit der daraufhin durchgeführten PCR zum Nachweis der transfizierten Plasmide, ließ sich nur das Gen der Blastocidin-Resistenzkassette des Selektionsplasmids pCoBlast amplifizieren. Es konnte keine PERV-p15E spezifische Sequenz des transfizierten Expressionsplasmids pMT/Bip/V5-HisC-PERV-p15E amplifiziert werden (Abbildung 3.8). Das war ein Hinweis darauf, dass die vorhandenen Klone im Zuge der Passagierung das Expressionsplasmid verloren hatten. Das Selektionsplasmid blieb aufgrund der Präsenz des Selektionsantibiotikums erhalten. Durch einen möglichen Wachstumsvorteil etablierten sich mit der Zeit einfach transformierte Zellen.

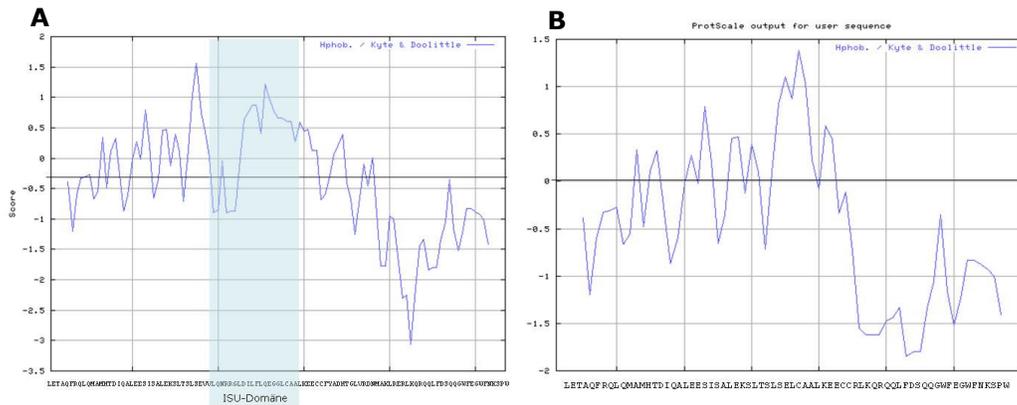
Nach erneuter Transfektion der S2-Zellen mit pMT/Bip/V5-HisC-PERV-p15E konnten nur Ausbeuten erzielt werden, die mit 0,5  $\mu$ g/ml deutlich unter den erwarteten 1  $\mu$ g/ml liegen. Variationen der Induktionsdauer und Induktionsstärke brachten keine Verbesserung der Ausbeute. Im nicht konzentrierten Überstand waren die Konstrukte selbst im Western-Blot oft nicht nachweisbar. Erst nach affinitätschromatographischer Reinigung und damit einer Konzentrierung der rekombinanten Proteine konnte man sie im Blot nachweisen. Ein Grund für die geringe Produktivität könnte wiederum eine entstandene Mischkultur sein. Ein Teil der Zellen könnte, wie bereits einmal nachgewiesen (Abbildung 3.8), das Expressionsplasmid wieder verloren haben. Selbst wenn nur 50% der Zellen noch beide Plasmide tragen würden, könnte man mit der verwendeten PCR das entsprechende Produkt nachweisen, und den Unterschied nicht detektieren. Die Produktivität der Zellkultur wäre dadurch aber schon drastisch gesenkt. Die Ausverdünnung bis auf eine Zelle, um eine Kolonie aus einem einzigen Klon, der beide Plasmide trägt, zu generieren, ist mit der Drosophila Zelllinie nicht möglich. Die Zellen stellen ihre Teilung unter eine Zelldichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml ein [*Manual Drosophila Schneider 2 Cells*, Version F, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland]. Ein Nachteil des Expressionssystems scheint also das getrennte System aus Expressions- und Selektionsplasmid zu sein. Eine möglicher Ausweg wäre das Klonieren der Blastocidin-Resistenzkassette inklusive der Promotorregion in das Expressionsplasmid. Die Arbeiten hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits durchgeführt. Da das hybride Plasmid muß noch getestet werden.

Die Western-Blot Analysen zeigten, dass der Export des rekombinanten Proteins nicht zu 100% funktioniert. Beim Testen der Zellpellets nach Induktion zeigte sich immer ein starkes Signal (Abbildung 3.11). Da auch p15E trotz des Fehlens der Membrandomäne noch hydrophobe Bereiche aufweist, sind Interaktionen mit intrazellulären Membran und der Zellmembran nicht auszuschließen, was den effizienten Export wiederum erschwert. Um die Ausbeute zu erhöhen, könnte ein Aufarbeitungsschritt des Zellpellets in das Reinigungsprotokoll der Ni-NTA-Affinitätschromatographie eingefügt werden. Ein Ausweg wäre der Einsatz eines Expressionssystems, in dem das Protein nicht exportiert wird. Alternativ könnte durch eine Mutation im Exportsignal des *Drosophila* Expressionvektors die Translokation des rekombinanten Proteins unterbunden werden. Beide Möglichkeiten würden es erlauben, das rekombinante Protein nach der Expression genau zu lokalisieren. Durch die Optimierung der affinitätschromatographischen Reinigung und weiterer stetiger Kontrollen der transfizierten Zelllinie, sollte es durch den Einsatz entsprechender Volumina in Zukunft möglich sein, genug endotoxinfreies, rekombinantes PERV-p15E herzustellen, um es in weiteren *in vitro* Studien einzusetzen.

#### 4.1.5 Hydrophobe Proteine und biologische Testsysteme

Um einen spezifischen Effekt der ISU-Domäne auf die IL-10-Expression humaner PBMCs *in vitro* zu untersuchen, wurde neben dem rekombinanten PERV-p15E auch das rekombinante FeLV- $\Delta$ isu-p15E endotoxinfrei im *Drosophila*-Expressionssystem hergestellt. Im FeLV- $\Delta$ isu-p15E ist die ISU-Domäne deletiert. Die Nukleotidsequenz des rekombinanten Proteins wurde aus dem bakteriellen Expressionvektor pCal-n in das Expressionsplasmid des *Drosophila* Systems kloniert. Es wurden *Drosophila* Zellen transfiziert. In ihnen konnte nach Etablierung blasticidinresistenter Klone das Selektionsplasmid und das Expressionplasmid durch eine PCR nachgewiesen werden (Abbildung 3.10). Die Expression von FeLV- $\Delta$ isu-p15E konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 3.11). Es war mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie nicht aus dem Überstand der Zellkultur zu isolieren. Im Western-Blot zeigte das lysierte Zellpellet eine starke Reaktion gegen den V5-Tag des rekombinanten Proteins (Abbildung 3.11). Eine Bestimmung des Hydropathieindex dieses Proteins zeigte, dass es zu großen Teilen hydrophobe Domänen bildet (Abbildung 4.1). In wässrigen Phasen können deshalb die Proteine zu Komplexen aggregieren und werden unlöslich. Hydrophobe Proteine kann man unter denaturierenden Bedingungen über die Ni-NTA-Matrix reinigen. Mit 8M Harnstoff konnte das Protein zwar auf die Matrix geladen, aber nicht mehr eluiert werden. Geringe Mengen konnten durch die pH-abhängige Elution wieder gewonnen werden. Um es in den biologischen Test einzusetzen, musste das Protein in PBS umgepuffert werden. Alternativ wurde versucht den Harnstoff auszuverdünnen. Anschließend sollte eine Konzentration des Proteins folgen, da die Tests in kleinen Volumina (96-Well-Maßstab) durchgeführt werden mussten. Dabei traten zwei Probleme auf. Die geringen Proteinmengen gingen entweder während der Dialyse verloren, oder es fiel direkt mit schwindender Harnstoffkonzentration wieder aus. Damit war eine Proteinbestimmung und ein genau dosierter Einsatz in biologischen Testsystemen nicht möglich. Aufgrund dieser Probleme und der

Unlöslichkeit des Proteins in wässrigen Phasen, war ein weiterer Einsatz dieses Konstruktes für die Tests nicht möglich. Die Notwendigkeit, das Protein in nicht toxischen, wässrigen Lösungsmitteln zur Verfügung zu haben, schließt ebenfalls eine Reinigung über Reversed-Phase-Chromatographie aus. Das dadurch wahrscheinlich zu reinigende Protein, würde sich dann aber in einem organischen Lösungsmittel befinden, welches die Assays stören, oder biologische Aktivität verhindern würden.



**Abbildung 4.1: Hydrophobizitätsanalyse der rekombinanten Proteine FeLV-p15E (A) und FeLV-Δisu-p15E (B)**

Die Graphen basieren auf einer Berechnung nach dem Kyte&Doolittle- Algorithmus.  
<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>

Um das Protein FeLV-Δisu-p15E in Lösung zu bekommen, könnte es an größere Trägermoleküle fusioniert werden. Hierbei wären zwei wesentlich Nachteile zu beachten: Das Trägermolekül kann selbst wieder biologisch reaktiv sein, und die Testergebnisse beeinflussen. Es ist denkbar, dass es entweder ein falsch positives Ergebnis liefert, oder den Effekt des eigentlichen Testproteins kompensiert. Das kann durch einen eigenen antagonistischen Effekt ausgelöst sein, oder einfach durch strukturelle Verhältnisse. Bei großen Trägerproteinen liegen die unlöslichen Proteine mit ihren hydrophoben Domänen oft aus energetischen Gründen in einer hydrophoben Tasche des Trägerproteines. Die hydrophoben Bereiche sind nicht exponiert, da der Komplex sonst wieder instabil werden würde. Damit wäre die native Konformation des FeLV-Δisu-p15E vorhanden, könnte aber nicht biologisch wirksam sein, da große Teile des rekombinanten Proteins nicht zugänglich wären. Auch Klonierungsstrategien mit einer Spaltsequenz, z.B. Faktor X oder Thrombin, würden nicht funktionieren, da nach dem Spalten vom Trägerprotein die Struktur des FeLV-Δisu-p15E wieder kollabieren würde.

Um den Einfluss der ISU-Domäne auf die Cytokinproduktion humaner PBMCs *in vitro* zu untersuchen, könnte die immunsuppressive Sequenz in ein großes, lösliches, nicht immunogenes Protein kloniert werden. Die Struktur dieses Protein sollte bekannt sein um eine exponierte Domäne durch die ISU-Sequenz zu ersetzen. Sollte das verwendete Protein die Möglichkeit bieten, mehrere exponierte Domänen zu substituieren, könnte der Effekt der Multiplizität der Rezeptorvernetzung zusätzlich ausgenutzt werden.

#### 4.1.6 Cytokinmodulation durch rekombinantes PERV-p15E

Das im *Drosophila* Expressionssystem exprimierte PERV-p15E wurde im *in vitro* Test eingesetzt, um zu untersuchen, ob es einen Einfluss auf die IL-10-Expression humaner PBMCs ausübt. Bei den PBMCs von allen untersuchten Spendern wurde konzentrationsabhängig die Sekretion von IL-10 induziert (Abbildung 3.12). Eine Hemmung der Lymphocytenproliferation durch Peptide, abgeleitet von retroviralem p15E konnte schon durch Cianciolo [1985] nachgewiesen werden. In ähnlichen, nicht cytotoxischen Konzentrationen wie in dieser Arbeit konnte durch FeLV-p15E, das die ISU Domäne enthält, ebenfalls die mitogen stimulierte Proliferation von Lymphocyten und deren Antigenantwort unterdrückt werden [Lynn et al., 1979]. Mit FeLV und MuLV infizierte Tiere entwickeln eine Immunsuppression [Denner, 1987]. Für die transmembranen Hüllproteine der Retroviren konnte die Hemmung der Lymphocytenproliferation nachgewiesen werden [Denner et al., 1986; Ruegg et al., 1989], was in Anbetracht der Sequenzhomologie zwischen PERV-p15E, FeLV-p15E und MuLV-p15E [Denner, 1998] ein Hinweis auf eine durch PERV-p15E ausgelöste Immunsuppression sein könnte. Da auch in HIV-1 gp41 eine immunsuppressive Domäne charakterisiert wurde [Ruegg et al., 1989; Denner et al., 1994], für die ebenfalls eine Hemmung der Lymphocytenproliferation nachgewiesen werden konnte [Denner et al., 1994], könnte das ein Hinweis auf ähnliche Mechanismen der durch das transmembrane Hüllprotein von HIV vermittelten Immunsuppression sein. Mehrfach wurden unabhängig voneinander in HIV-Infizierten eine erhöhte IL-10-Expression beobachtet [Emilie et al., 1992; Graziosi et al., 1996; Stylianou et al., 1999; Poli, 1999]. Durch Expression des transmembranen Hüllproteins eines humanen endogenen Retrovirus auf der Oberfläche von Tumorzellen, konnte dessen Abstoßung unterdrückt und Wachstum gefördert werden. Verhindert man die Expression durch RNA-Interferenz, wurde der Tumor abgestoßen [Mangeney et al., 2005]. Diese Experimente lassen auf ähnliche Mechanismen der Immunsuppression vieler Retroviren schließen.

Die beobachtete Induktion des proliferationshemmenden Cytokins IL-10 durch das rekombinante PERV-p15E sind ein weiterer Beweis dafür, dass transmembrane Hüllproteine von Retroviren, und die in ihnen konservierte ISU-Domäne, immunsuppressive Eigenschaften besitzen. Dieser Mechanismus wurde auch schon für das HIV-1 gp41 während einer HIV-Infektion diskutiert [Denner, 2000]. Weitere Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass sich durch die Inkubation von PBMCs mit Retroviren die Expressionsmuster verschiedener Cytokine verändern. Die Analyse der Zellkulturüberstände im Cytokinarray zeigt grundsätzlich ein verschobenes Verhältnis von  $T_H1$ -Cytokinen und  $T_H2$ -Cytokinen zu Gunsten der Typ2-Cytokinen [Denner et al., unveröffentlicht] Diese Veränderungen wurden auch in HIV-Infizierten beobachtet [Clerici et al., 1993]. Die gesammelten Daten der immunsuppressiven Wirkung der transmembranen Hüllproteine könnten somit als Grundlage zur Entwicklung eines Modells der gp41 vermittelten Immunpathogenese einer HIV-Infektion dienen.

#### **4.1.7 *in vivo* Versuche mit den bakteriell exprimierten Proteinen FeLV-p15E und FeLV- $\Delta$ isu-p15E**

Der Ansatz sollte einen möglichen Einfluss der ISU-Domäne auf die Ausprägung der humoralen Immunantwort charakterisieren. Aufgrund der folgenden Probleme, muss die Aussagekraft dieses Versuchs in Frage gestellt werden: Die verwendeten Antigene unterschieden sich stark in der Reinheit. Da das FeLV- $\Delta$ isu-p15E nicht löslich war, und somit eine Reinigung über Calmodulin-Affinitätschromatographie auszuschließen war, wurden die applizierten Mengen über die anteilig in der Proteinlösung enthaltenen Mengen an Zielprotein abgeschätzt. Die Titer der induzierten p15E-spezifischen Antikörper lagen in etwa in der gleichen Größenordnung. Der immunsuppressive Effekt der ISU-Domäne konnte nicht nachvollzogen werden, da die Tiere, die das vollständige p15E appliziert bekamen, einen vierfach höheren Titer entwickelten (Abbildung 3.14). Als Grund hierfür ist der zuvor beschriebene unterschiedliche Reinheitsgrad der applizierten Antigene zu nennen. Im viel stärker verunreinigten FeLV- $\Delta$ isu-p15E trat vermutlich eine Antigenkompetition des Hauptantigens mit den Kontaminationen auf. Als Folge davon konnte sich keine Antigen Dominanz des FeLV- $\Delta$ isu-p15E herausbilden und die spezifische Immunantwort gegen FeLV-p15E wurde gehemmt. Der vermutete negative Einfluss der ISU-Domäne auf die humorale Immunantwort gegen das nicht verwandte Antigen BSA war aus diesen Gründen nicht darzustellen.

Die mit diesem Versuch erlangten Ergebnisse können nicht mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen verglichen werden. Sie berichteten immunsuppressive Eigenschaften der transmembranen Hüllproteine [Ruegg et al., 1989; Oostendorp et al., 1992; Denner, 1998]. Für die *in vivo* Charakterisierung der ISU-vermittelten Immunsuppression wäre es unbedingt erforderlich gleiche Mengen an Protein zu applizieren, da eine Quantifizierung der humoralen Immunantwort nur dann sinnvoll ist. Ein möglicher Ausweg, die Unzulänglichkeiten der Proteinreinigung zu umgehen wäre eine DNA-Immunsierung der Versuchstiere mittels *Gene-Gun*. Das hierbei keine so hohen Antikörpertiter wie mit einer Proteinimmunisierung erreicht werden, könnte sogar ein Vorteil beim Detektieren von schwachen immunsuppressiven Effekten sein.

#### **4.2 Induktion CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen durch HIV-ISU-Homopolymere und PERV-p15E**

##### **4.2.1 Veränderungen der Zusammensetzung der Lymphocytenpopulation**

Neben den Untersuchungen zum Einfluss der HIV-ISU-Homopolymere und des rekombinanten PERV-p15E auf die Expression von IL-10 humaner PBMCS, sollte auch untersucht werden, ob die Inkubation mit den HIV-ISU-Homopolymeren oder dem rekombinanten transmembranen Hüllprotein CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (T-reg) induziert. Die Vergleiche der Zusammensetzung der Lymphocytenpopulationen am Durchflusscytometer nach Inkubation mit HIV-ISU-Homopolymeren mit der nur mit Medium inkubierten Zellen zeigten, dass sich die Anzahl an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> doppelpositiven Zellen erhöhte. Der Anteil an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> doppelpositiven T-Zellen

lag mit 2%-5% der gesamten PBMCs in der zuvor erwarteten Größenordnung [Jonuleit et al., 2001]. Das HIV-ISU-Peptid-Homopolymer stellt den Teil des HIV-1 gp41 dar, für den gezeigt werden konnte, dass er *in vitro* die Lymphocytenproliferation hemmen kann [Ruegg et al., 1989; Denner et al., 1994]. Eine Hemmung der Lymphocytenproliferation resultiert, wenn es sich nicht um autoreaktive B-Zellen handelt, in einer Immunsuppression. Regulatorische T-Zellen sind im Thymus aktiv, um die Proliferation autoreaktiver Lymphocyten zu unterdrücken und so Autoimmunerkrankungen vorzubeugen [Shevach, 2000; Kriegel et al., 2004; Ehrenstein et al., 2004] und eine Selbst-Toleranz zu sichern [Sakaguchi et al., 1995; Taylor et al., 2001]. Für CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen aus FIV infizierten Katzen wurde gezeigt, dass sie in der Lage sind, im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen aus uninfizierten Katzen signifikant die Proliferation von Lymphocyten und die ConA stimulierte IL-2 Produktion bei autologen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen zu unterdrücken [Vahlenkamp et al., 2004]. In Lymphknoten und anderen Orten mit hoher HIV-Replikationsrate bei HIV-Infizierten ist die Konzentration an aktiven T-reg viel höher als zeitgleich in peripheren Bereichen. Die lokale T-reg-Zellzahl korreliert sogar mit der Viruslast [Andersson et al., 2005]. Andererseits wurde gezeigt, dass CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-reg-Zellen CCR5 exprimieren und hoch susceptibel für eine HIV-Infektion sind. Daraus folgend wurde eine *in vivo* Depletion der T-reg durch die HIV-Infektion dieser Zellen diskutiert [Oswald-Richter et al., 2004]. Die in dieser Arbeit gefundene Zunahme an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen korreliert mit den Ergebnissen von Vahlenkamp et al. [2005] und Andersson et al. [2004]. Außerdem kann durch den Einsatz der Homopolymere in diesem Versuch die Induktion der T-reg auf das ISU-Peptid zurückgeführt werden.

Auch die Inkubation mit PERV-p15E führte in etwa in gleichem Maße zu einem Anstieg an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 3.17) wie die Inkubation mit HIV-ISU-Homopolymer (Abbildung 3.16). Die ISU-Domäne im PERV-p15E ist komplett identisch zu der des transmembranen Hüllproteins von FeLV-A und MuLV [Denner, 1998]. Für FeLV und MuLV konnte in infizierten Tieren eine Immunsuppression beobachtet werden [Denner, 1987]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane PBMCs nach Inkubation mit endotoxinfreiem PERV-p15E mehr proliferationshemmendes IL-10 sekretieren als unbehandelte PBMCs (Abbildung 3.12). Sowohl für p15E von  $\gamma$ -Retroviren [Ruegg et al., 1989] als auch für die HIV-ISU-Domäne [Denner et al., 1994] konnte *in vitro* eine Proliferationshemmung von Lymphocyten nachgewiesen werden, was ein Hinweis auf gleiche zugrunde liegende immunsuppressive Mechanismen von p15E und gp41, bzw. deren ISU-Domänen sein könnte. Die zuvor diskutierte Wirkung der HIV-ISU-Domäne auf die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> zu CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen könnte deshalb eine Erklärung für den gefundenen Anstieg durch Inkubation mit PERV-p15E sein.

#### **4.2.2. GITR als Marker für die Aktivierung CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen in der Durchflusszytometrie**

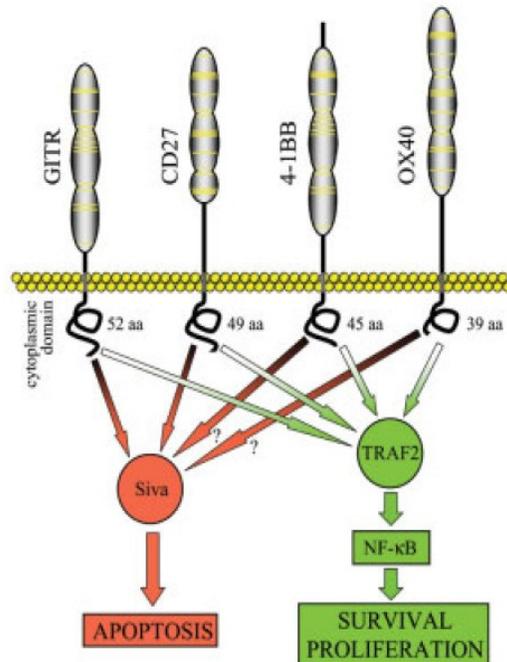
Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zu Veränderung der GITR<sup>+</sup>-Zellzahl durch die Inkubation humaner PBMCs mit HIV-ISU-Homopolymer bzw. dem rekombinanten PERV-p15E lieferten kein homogenes Bild wie etwa die Daten der Oberflächenmarker

CD4 und CD25. Es war weder ein genereller Trend nach Inkubation der PBMCs mit dem HIV-ISU-Homopolymer (Abbildung 3.16), noch mit dem PERV-p15E (Abbildung 3.17) zu erkennen.

Für GITR wurde gezeigt, dass es in hohem Maße auf T-reg exprimiert wird, und infolge einer Aktivierung der Zellen es zu einer stärkeren Induktion der Expression kommt [McHugh et al., 2002, Shimizu et al., 2002]. Ein Grund hierfür kann die durch GITR vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und damit eine erhöhte Proliferation sein (Abbildung 4.3). Eine anderer Signaltransduktionsweg über Siva könnte zur erhöhten Apoptose von GITR<sup>+</sup>-T-Zellen führen, wie es durch Cotransfektion von Siva und GITR in eine murine Zelllinie beobachtet wurde [Spinicelli et al., 2002]. GITR gehört zur Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie, die mehr als 20 Typ1 Transmembranproteine mit ähnlichem Aufbau und verschiedenen Funktionen bei der Zelldifferenzierung umfasst [MacEwan, 2002; Younes et al., 2003; Wajant et al., 2003]. Für einige Proteine dieser Superfamilie, z.B. CD27, wurde eine proapoptotische Interaktion mit Siva nachgewiesen [Prasad et.al, 1997]. Daraufhin wurde spekuliert, dass die Stärke der Aktivierung von GITR bestimmt, ob ein proliferativer oder ein apoptotischer Signalweg aktiviert wird [Tone et al., 2003]. Eine Bestätigung dieser Theorie könnte der Befund sein, dass die durch anti-CD3-induzierte apoptotische Wirkung durch GITR-Überexpression in einer murinen hybridoma Zelllinie unterdrückt werden konnte [Nocentini et al., 1997].

Diese hier dargestellten Eigenschaften von GITR könnten die variierenden Ergebnisse der Durchflusscytometrie erklären. Gerade bei den Homopolymeren wurde zuvor schon über die Reproduzierbarkeit aktiver Konjugate diskutiert (Abschnitt 4.1.1). Es wäre bei der Inkubation mit Homopolymer kein einheitlicher Stimulus, der auf die PBMCs wirken würde. Man könnte nicht sagen, ob die Aktivierung einen apoptotischen Effekt oder einen proliferativen Effekt hat. Die Ergebnisse der Immunfärbung wären in jedem Fall trotz Aktivierung der T-reg gegensätzlich. Für die Inkubation mit p15E kann man sagen, dass ein Trend zur Aktivierung zu erkennen ist. Das kann in der Konstanz der eingesetzten Menge und in der vergleichbaren Aktivität des rekombinanten Proteins auch bei verschiedenen Spendern begründet sein (Abbildung 3.12). Um aber gesicherte Aussagen zu treffen, müssten noch mehr Spender untersucht werden, da sich in der Gruppe der vier Untersuchten ein gegensätzliches Ergebnis zeigte (Abbildung 3.17).

Zum Nachweis einer Aktivierung der suppressiven Eigenschaften von T-reg sollte die Immunmarkierung von GITR nicht herangezogen werden. Die Überprüfung des



**Abbildung 4.2: Signaltransduktion der TNFR-Superfamilie als Model für GITR [Nocentini & Riccardi, 2005]**

Transkriptionslevels von GITR und anderen Aktivitätsmarkern wie CTLA-4 oder FoxP3 [Baecher-Allen et al., 2004; Fontenot et al., 2003] z.B. durch *Realtime*-PCR oder Northern-Blots würde eindeutigere Daten liefern.

#### 4.2.3 FoxP3 und alternative Marker

Ein exakteres Abbild des Aktivierungszustandes von Zellen als die Immunmarkierung liefert der Stoffwechsel. Physiologische Signale haben immer einen Einfluss auf die Transkriptionsmuster einer Zelle. Ein spezifischer intrazellulärer Marker für aktive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (T-reg) ist die Aktivität des Transkriptionsfaktors FoxP3. Für FoxP3 wurde nachgewiesen, dass er für die Ausprägung eines aktiven regulatorischen, also suppressiven Phänotyps der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich ist [Fontenot et al., 2003]. Durch die erstmalige Etablierung eines SYBR-GREEN-*Realtime*-Assays zur Quantifizierung von FoxP3 mRNA, konnten Daten zum Transkriptionsverhalten von FoxP3 einer Population humaner PBMCs nach Inkubation mit dem HIV-ISU-Homopolymer bzw. dem PERV-p15E gesammelt werden. Alle untersuchten Spender zeigten nach Inkubation mit HIV-ISU-Homopolymer oder rekombinantem PERV-p15E einen signifikanten Anstieg der FoxP3-Expression (Abbildung 3.20). Für suppressiv aktive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-reg-Zellen konnte schon früher eine starke Expression von FoxP3 nachgewiesen werden [de Kleer et al., 2004]. Andere Daten weisen darauf hin, dass humanes FoxP3 anders als das der Maus nicht nur in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-reg exprimiert wird, und eine Induktion eher Ausdruck eines Aktivierungszustandes ist [Morgan et al., 2005]. Diese Ergebnisse wurden durch den Einsatz monoklonaler anti-FoxP3 Antikörper bestätigt [Roncador et al., 2005]. Der Anstieg an FoxP3 wurde in dieser Arbeit in einer gemischten Population aus PBMCs untersucht. Da auch eine Aktivierung des housekeeping Gens GAPDH beobachtet wurde (Abbildung 3.20), muss auch hier von einer generellen Aktivierung des Zellstoffwechsels ausgegangen werden. Damit konnte man hier nicht unterscheiden, ob der Anstieg der FoxP3-Expression Ausdruck einer erhöhten Differenzierungsrate von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> zu CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-reg oder einer Aktivierung bereits vorhandener CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-reg ist. Weiterführende Experimente sollten mit einer homogenen Population an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt werden. Eine Anreicherung spezifisch markierter Zellen ist z.B. über *magnetic-assisted cell sorting* (MACS) zu erreichen. Die Reinheit könnte anschließend mittels Durchflusszytometrie kontrolliert werden. Durch das Heranziehen weiterer Marker dieser Subpopulation, wie CTLA-4 [Jonuleit et al., 2001] oder Neuroligin1 [Bruder et al., 2004], würde ein detaillierteres Bild des Einflusses von HIV-ISU-Homopolymeren und rekombinanten transmembranen Hüllproteinen auf die Induktion CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-reg liefern.

Durch die Etablierung der FoxP3-spezifischen SYBR-Green-*Realtime*-PCR konnte eine Induktion der FoxP3-Expression durch die Kultivierung humaner PBMCs mit HIV-ISU-Homopolymer bzw. PERV-p15E beobachtet werden. Die Daten liefern einen Hinweis darauf, dass die durch die immunsuppressive Domäne des HIV-1 gp41 ausgelöste Immunsuppression partiell durch die Induktion CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-reg vermittelt wird. Die Charakterisierung der suppressiven Fähigkeit der induzierten T-reg könnte durch die Kokultivierung einer zuvor mit HIV-ISU-Homopolymer oder PERV-p15E inkubierten

homogenen Population mit stimulierten Lymphocyten in einem Proliferationstest erfolgen.

### **4.3 Induktion neutralisierender Antikörper gegen transmembrane Hüllproteine von Retroviren**

#### **4.3.1 Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von FeLV-A**

Die Immunisierung mit den rekombinanten Proteinen FeLV-p15E und FeLV- $\Delta$ isu-p15E wurde ursprünglich durchgeführt, um den Einfluss der ISU-Domäne auf die humorale Immunantwort *in vivo* zu untersuchen. Da festgestellt werden konnte, dass im Rahmen dieses Versuches Antikörper gegen das FeLV-p15E induziert wurden (Abbildung 3.15) und ein weiteres Arbeitsgebiet der Abteilung die Impfstoffentwicklung gegen Retroviren ist, sollte die Fähigkeit der induzierten Antikörper zur Neutralisation von FeLV getestet werden. Der Neutralisationstest zeigt nur bei in 2 von 7 Tieren eine schwache Neutralisation. Da die Auswertung ergab, dass die Neutralisation an der Signifikanzgrenze von 50% liegt, ist nicht davon auszugehen, dass es eine reale Neutralisation ist (Abbildung 3.21).

Die Epitopkartierung zeigte, dass zwei N-terminal gelegene Epitope auf dem FeLV-p15E durch die induzierten Antikörper erkannt werden (Abbildung 3.22). Beide Aminosäuresequenzen, LETAQF und IQALE, liegen in Bereichen, für die gezeigt worden war, dass dort bindende Antikörper in der Lage sind FeLV-A zu neutralisieren [Langhammer et al., 2005]. Der Unterschied zu den in dieser Arbeit induzierten Antikörpern zeigt sich beim Vergleich der Epitopkartierungen. Die durch Langhammer et al. induzierten Antikörper binden zusätzlich ein Epitop im C-terminalen Bereich der Ectodomäne (WFEGWFN), das die in diesem Versuch induzierten Antikörper nicht erkennen. Gegen das analoge p15E von PERV konnten ebenfalls neutralisierende Antikörper induziert werden, deren Epitope, GPQQLEK und FEGWFN, auch im membranproximalen Bereich des p15E lokalisiert sind [Fiebig et al. 2003]. Diese Epitopbereiche wurden als E1 (N-terminal) und E2 (C-terminal) definiert. Es konnte in Bindungsstudien ebenfalls gezeigt werden, dass die neutralisierende Wirkung der induzierten Antikörper durch die gleichzeitige Zugabe von E1- und E2-Peptiden stärker inhibiert wird, als durch die Zugabe der einzelnen Peptide [Fiebig et al., 2003]. Der durch Eckert und Kim [2001] vorgeschlagene Klappmechanismus des HIV-gp41 könnte auch auf das fusionsvermittelnde p15E der  $\gamma$ -Retroviren übertragen werden und eine Erklärung der Daten von Fiebig et al. [2003] liefern. In der sich aus dem Zusammenklappen ergebenden Präfusionskonformation des transmembranen Hüllproteins (Abbildung 1.6) liegen der N-terminale E1-Bereich und der C-terminale E2-Bereich in räumlicher Nähe. Da in diesem Stadium das transmembrane Hüllprotein nicht durch das externe Glycoprotein verdeckt ist, müssten sich neutralisierende Antikörper gegen diese nur für wenige Minuten zugängliche Struktur richten [Raviv et al. 2002]. Die Daten von Fiebig et al. [2003], Langhammer et al. [2005] sowie Eckert und Kim [2003] sprechen dafür, dass eine hochaffine Bindung an diesen Bereich, und damit eine Störung des Fusionsprozesses, nur erfolgen kann, wenn Antikörper Epitope im C- und N-Terminus der Ectodomäne erkennen, die in der Präfusionsphase ein Konformationsepitop bilden [Fiebig et al., 2003]. Da die in dieser Arbeit gegen das

FeLV-p15E induzierten Antikörper nur in dem zu E1 korrespondierenden Bereich Epitope erkennen, konnte ein weiterer Hinweis für die Theorie eines Einflusses der Konformation auf die Neutralisationsfähigkeit gewonnen werden. Warum die hier induzierten Antikörper nur den E1 Bereich erkennen, obwohl die gleichen Antigene verwendet wurden wie bei Langhammer et al. [2005], deren induzierte Antikörper immer E1 und E2 erkennen, könnte mit der zusätzlichen Applikation von BSA erklärt werden. BSA könnte einen Einfluss auf die Konformation der Antigene genommen haben und somit das Induzieren entsprechender Paratope auf den Antikörpern verhindert haben. Diese Annahme ist rein spekulativ, da die Versuche, wie eingangs erwähnt, nicht zur Induktion neutralisierender Antikörper durchgeführt wurden, sondern zur Charakterisierung der Wirkung der ISU-Domäne, wurde diesem Phänomen vorerst nicht weiter nachgegangen.

#### **4.3.2 Rekombinante p15E/gp41 Konstrukte**

Durch die im Rahmen dieser Arbeit generierten rekombinanten Proteinen auf Basis der KoRV-Ectodomäne, konnten Antikörper induziert werden, die das Epitop des HIV-1 breit neutralisierenden monoklonalen Antikörpers 2F5 binden. Die Bindungsstelle auf dem KoRV-p15E2-AB wurde durch eine Epitopkartierung auf die Aminosäuren DKWA eingegrenzt (Abbildung 3.31). Die Aminosäurefolge DKW wurde als essentielle Kernsequenz für die Bindung und Neutralisation durch 2F5 beschrieben [Binley et al., 2004]. Die hier induzierten Antikörper waren nicht in der Lage HIV-1 IIIB zu neutralisieren (Abbildung 3.30). Andererseits konnten die sie auch nicht KoRV neutralisieren. Ein Hinweis zur Erklärung der Befunde liefert die Epitopkartierung des Serums auf einer HIV-gp41- und einer KoRV-p15E-Pepspot Membran. Auf der HIV-Membran wird nur die Sequenz DKWA im E2-Bereich erkannt. Im potentiellen E1-Bereich binden keine Antikörper. Folgt man der postulierten Theorie des Konformationsepitops für die Notwendigkeit einer ausreichend starken Bindung zur Neutralisation [Fiebig et al., 2003], bestätigt die Epitopkartierung die Ergebnisse des Neutralisationstests.

Auf der KoRV-Membran binden Antikörper stark im E1-Bereich (IKGPIDLQQ). Eine schwache Bindung ist auch für den E2-Bereich (RDSMRRLKE) zu erkennen. Potentiell wären alle wichtigen Parameter zur Neutralisation erfüllt. Trotzdem neutralisierten die Seren KoRV nicht. Eine mögliche Erklärung wäre die nur schwache Bindung im E2-Bereich. Da dieser Epitopbereich im KoRV-p15E2-AB mutiert ist, können die Antikörper nur an die zwischen KoRV-p15E2-AB und KoRV-p15E übereinstimmenden Aminosäuren binden. Das sich aus der partiellen Interaktion nur eine schwach averse Bindung ergeben kann, reicht diese nicht aus, um das Ausbilden der Fusionspore kurz vor der Penetration zu verhindern.

Kombiniert man die Erkenntnisse der Kartierungen, zeigt sich ein mögliches Potential dieser Konstrukte für weitere Studien. Das Konstrukt Ko-p15E2-AB induziert Antikörper, die im gp41 nur E2 erkennen. Im KoRV-p15E wird nur E1 stark erkannt. Das könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass für die Induktion neutralisierender Antikörper vom 2F5-Typ das Vorhandensein des Epitops E1 eine wichtige Rolle spielt. In Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass durch die gleichzeitige Zugabe von Peptiden abgeleitet aus der E1 und E2-Region die Neutralisationsfähigkeit von 2F5

stärker inhibiert wird, als bei der Zugabe von E2-Peptiden allein [Fiebig et al., in Vorbereitung]. Da aber alle Epitopkartierungen eindeutig ELDKWA als alleiniges 2F5-Epitop definierten [Binley et al., 2004], kann der E1-Bereich nur dazu beitragen, die Avidität der Bindung auf ein für die Neutralisation notwendiges Maß zu erhöhen. Zukünftige Konstrukte sollten nach dieser Theorie sowohl den potentiellen E1-, als auch den E2 Bereich von HIV-1 gp41 enthalten, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, Antikörper vom 2F5-Typ induzieren zu können. Für weitere Studien müssten also weitere Aminosäuresubstitutionen im N-terminalen Bereich des Ko-p15E2-AB vorgenommen werden. Die induzierten Antikörper sollten dann zumindest die E1- und die E2-Region binden. Die Daten könnten dann weitere Hinweise zur Notwendigkeit der Interaktion des E1-Bereiches mit dem im membranproximalen E2-Bereich bindenden Antikörper liefern, welche in einer Bindung des Antikörpers an den E2-Bereich mit einer für die Neutralisation nötigen Avidität resultiert.

Zusätzlich erkennen die induzierten Antikörper zwei bisher nicht beschriebene Epitope. Auf der HIV-Membran wird die Sequenz GRRGWEALK und auf der KoRV-Membran die Sequenz SEVVLQNRR erkannt. Es konnten in der Arbeitsgruppe bei Epitopkartierungen mit 2F5 auf Membranen der transmembranen Hüllproteine von PERV und MuLV immer wieder Kreuzreaktionen gegen Argininwiederholungen festgestellt werden. 2F5 war nicht in der Lage PERV oder KoRV zu neutralisieren [Fiebig et al., in Vorbereitung]. Die Aminosäure-Sequenz GRRGWEALK der intraviralen Domäne des HIV-gp41 ist nicht im Immunisierungskonstrukt KoRV-p15E2-AB enthalten. Es ist also anzunehmen, dass es sich auch bei der hier beobachteten Bindung um eine Kreuzreaktion der Seren handelt.

#### **4.3.3 Neutralisierende Antikörper gegen HIV-1 gp41**

Warum arbeitet man so intensiv am gp41, wo es doch aufgrund der instabilen Struktur und starken Hydrophobizität biochemisch schwerer zu handhaben ist, als das viel immunogenere gp120 [Chan et al. 1997]? Ein Grund ist die geringere Varianz der Aminosäuresequenz von gp41 zwischen den HIV-1 Subtypen (Abbildung 1.7) [Gaschen et al., 2002]. Außerdem maskieren zahlreiche Glycosilierungen im gp120 potentielle Bindungsstellen für neutralisierende Antikörper und fördern die Selektion stabiler Fluchtmutanten *in vivo* [Langedijk et al., 1995, Goulder et al., 2001]. Die Konserviertheit des gp41 versprach die Induktion subtypenübergreifender Antikörper. Nachdem es gelungen war, aus Patienten den gegen gp41 gerichteten breit neutralisierenden Antikörper 2F5 [Muster et al., 1993] zu isolieren, wurde artifiziell versucht gegen das erkannte Epitop neutralisierende Antikörper zu induzieren. Eckhart et al. [1996] versuchten es mit einem rekombinanten Oberflächenantigen des Hepatitis-B-Virus, das die Sequenz ELDKWA enthielt, in BALB/c-Mäusen. Sie konnten genau wie Joyce et al. [2002] mit einer Peptidimmunisierung mit modifiziertem DP178 in Meerschweinchen nur bindende aber keine neutralisierenden Antikörper induzieren. Durch ein rekombinantes Tetanus-Toxin, an welches die ELDKWA-Sequenz gehängt wurde konnten ebenfalls nur bindende Antikörper im Mausmodell induziert werden [Decroix et al., 2003]. Ein anderer interessanter Ansatz war es, rekombinantes HLA(DR) mit ELDKWA an verschiedenen Positionen zur Immunisierung einzusetzen. Auch hier wurden nur bindende Antikörper induziert, jedoch keine Aussage über deren

Neutralisationsfähigkeit getroffen [Ho et al., 2002]. Eine erste Ausnahme in der Reihe dieser Versuche stellen die Ergebnisse von Marusic et al. [2001] dar. Sie schafften es im Mausmodell mit rekombiantem Hüllprotein des *potato virus x* (PVX) ELDKWA bindende Antikörper zu induzieren. Die Seren der Mäuse waren außerdem in der Lage die Syncytienbildung von C8166-Zellen nach Infektion mit HIV-1 IIIB zu unterdrücken. Der Effekt konnte aber nicht subtypenübergreifend reproduziert werden.

Studien mit 2F5 *in vitro* zeigten, dass es innerhalb von vier Wochen zur Bildung von neutralisationsresistenten Quasispezies kam [Schmolke et al., in Vorbereitung]. Die Neutralisationsresistenz ergab sich aus nur einer Aminosäuresubstitution in der ELDKWA-Sequenz von D zu N. Das mutierte Virus zeigte zwar die gleiche Sensitivität gegenüber einem Fusionshemmer (DP178), 2F5 war aber nicht in der Lage an das Epitop zu binden. Primärisolate mit einer Mutation im zentralen Bereich der ELDKWA-Sequenz lassen sich nicht oder nur durch hohe Konzentrationen von 2F5 hemmen [Purtscher et al., 1996]. Sequenzabweichungen in den terminalen Aminosäuren des 2F5-Epitops sind für die Neutralisation des Isolats durch 2F5 irrelevant [DSouza et al., 1997]. Die erste Induktion von neutralisationsresistenten Fluchmutanten *in vitro* gelang mit dem gp120 bindenden, HIV-neutralisierenden Antikörper IgG1b12 [Mo et al., 1997]. Dieser Befund, unterstreicht, dass ein effektiver Impfstoff ein Spektrum von verschiedenen neutralisierenden Antikörpern, gegen verschiedene Epitope induzieren muss (2F5-resistente Isolate lassen sich durch 4E10 hemmen und 4E10-resistente durch 2F5 [Stiegler et al., 2001]. Die Wahrscheinlichkeit der Bildung von neutralisationsresistenten Fluchmutanten wird durch die Induktion von neutralisierenden Antikörpern, die an mehrere Epitope binden, verringert. Eine Strategie, die bereits in der Kombinationstherapie (HAART) und beim passiven Immuntransfer gegen HIV ausgenutzt wird.

Alle hier zuvor diskutierten Ansätze zur Induktion 2F5-ähnlicher Antikörper sind mit Konstrukten durchgeführt worden, die der nativen Konformation des gp41 nicht nahe kommen. Sie berücksichtigten nicht die eventuelle Notwendigkeit eines weiteren Epitops zum Ausprägen einer hochaviden Bindung der Antikörper an die ELDKWA-Sequenz. Desweiteren wird die Zugänglichkeit der membranproximalen Region des gp41 für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern diskutiert [Trkola et al., 2005] und eine potentielle Gefahr der Autoreaktivität dieser Antikörper gegen Membranlipide gesehen [Haynes et al., 2005]. Eine etwaige Autoreaktivität in gleicher Intensität wie eine Autoimmunreaktion würde die entsprechenden B-Zellen aus dem Immunsystem entfernen. Die Isolation von Antikörpern gegen die membranproximale Region, selbst wenn man sie induzieren könnte, wäre somit um ein vielfaches erschwert [Nabel, 2005].

Trotz der Zweifel über die Möglichkeit zu Induktion 2F5 ähnlicher Antikörper, wird ein HIV-Impfstoff nur erfolgreich eingesetzt werden können, wenn der Replikationszyklus des Virus an mehreren Schritten gestört wird. Die Möglichkeiten der Induktion neutralisierender Antikörper gegen die membranproximale Region des gp41 sind noch nicht ausgeschöpft und könnten einen entscheidenden Beitrag zur Entwicklung einer HIV-Vakzine darstellen.

#### 4.4 Ausblick

Um die Untersuchungen zur Induktion der IL-10-Expression bei humanen PBMCs durch das ISU-Peptid bzw. das rekombiante transmembrane Hüllprotein *in vitro* weiter voran zu treiben, könnte die Etablierung einer monocytären Zelllinie von Vorteil sein. Damit könnten spenderspezifische Schwankungen umgangen werden. Für die Untersuchungen zum Einfluss der ISU-Domäne auf die Ausprägung der humoralen Immunantwort *in vivo* könnte die DNA-Immunisierung einen Ausweg darstellen. Die applizierte Antigenmenge könnte hier besser zwischen den zu vergleichenden Konstrukten abgeglichen werden. Auch Verunreinigungen, die eine Antigenkompetenz auslösen, würden somit umgangen.

Die Untersuchungen zur Induktion regulatorischer T-Zellen durch transmembrane Hüllproteine und ISU-Peptide stehen erst am Anfang. Weitere Experimente sollten mit einer durch MACS angereicherten Population aus CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen durchgeführt werden. Die behandelten Zellen könnten im Vergleich mit unbehandelten Zellen im Proliferations-Hemmtest eingesetzt werden. Die Daten würden in Verbindung mit einer Analyse der FoxP3 Expression die Funktionalität mit dem Aktivierungszustand, der durch transmembrane Hüllproteine von Retroviren hervorgerufen wird, korrelieren.

Um im Rahmen der Impfstoffentwicklung gegen Retroviren die Mechanismen zur Induktion breit HIV-1 neutralisierender Antikörper gegen gp41 weiter aufzuklären, sollten die rekombinanten Proteine KoRV-p15E2-AB und KoRV-p15E2-ABC durch weiterführende Mutationen im N-terminalen Bereich dem gp41 von HIV-1 stärker angepasst werden. Nach der hier vorgeschlagenen Klonierung des potentiellen E1-Bereiches von gp41 sollte in weiteren Immunsierungsstudien die Induktion neutralisierender Antikörper und die Charakterisierung dieser Antikörper erfolgen. Einen Hinweis darauf, ob bei HIV-gp41 zur Neutralisation ein Konformationsepitop notwendig ist, könnte durch die Generierung von monoklonalen Antikörpern geklärt werden.

## 5. Zusammenfassung

Retroviren wie HIV, FeLV, PERV und KoRV induzieren in infizierten Wirten durch noch weitgehend unbekannte Mechanismen eine Immunsuppression. Die Beteiligung von transmembranen Hüllproteinen und der in ihnen konservierten immunsuppressiven (ISU-)Domäne an der Immunpathogenese retroviraler Infektionen wird schon länger diskutiert.

Zur Charakterisierung der Wirkung der immunsuppressiven (ISU-)Domäne wurden Peptide, die der Sequenz der ISU-Domäne entsprechen, zu Homopolymeren gekoppelt und charakterisiert. Im IL-10-Cytokin-ELISA wurde gezeigt, dass die Homopolymere die IL-10-Freisetzung von humanen PBMCs *in vitro* induzieren. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Induktion der IL-10-Expression von der Menge der eingesetzten HIV-ISU-Homopolymere. Weitere Untersuchungen ergaben, dass nach einer Trennung der Kopplungsgemische in eine hoch- und eine niedermolekulare Fraktion die hochmolekularen Strukturen für den IL-10-induzierenden Effekt verantwortlich sind.

Zur Untersuchung der immunsuppressiven Eigenschaften transmembraner Hüllproteine wurde ein auf Drosophila Zellen basierendes endotoxinfreies Expressionssystem etabliert. Die rekombinanten Proteine PERV-p15E und FeLV- $\Delta$ isu-p15E wurden kloniert und in diesem System exprimiert. Für das affinitätschromatographisch gereinigte endotoxinfreie PERV-p15E konnte eine konzentrationsabhängige IL-10-induzierende Wirkung auf humane PBMCs *in vitro* nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich das  $\Delta$ isu-p15E nicht für den Einsatz in biologischen Testsystemen eignet. In einem *in vivo* Ansatz (Immunisierung von Ratten mit diesen Proteinen und einem Markerprotein) wurde gezeigt, dass durch den Einsatz qualitativ unterschiedlicher Antigene die immunsuppressive Wirkung nicht evaluiert werden kann.

Bei HIV-Infizierten war gezeigt worden, dass die Viruslast mit der Menge an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen korreliert. Auch bei mit FIV infizierten Katzen wurde eine Aktivierung regulatorischer T-Zellen beobachtet. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass HIV-ISU-Homopolymere und rekombinantes endotoxinfreies PERV-p15E regulatorische T-Zellen *in vitro*, nach Behandlung humaner PBMCs induzierten. Diese Zellen sind CD4, CD25 und FoxP3 positiv. Die am Durchflusscytometer zu den Oberflächenmarkern CD4 und CD25 erhobenen Daten korrelieren mit denen, die durch Expressionsanalyse von FoxP3 gewonnen wurden. Dazu wurde in dieser Arbeit ein FoxP3-spezifisches SYBR-Green-*Realtime*-PCR etabliert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde im Rahmen der Entwicklung von anti-retroviralen Impfstoffen versucht neutralisierende Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von HIV-1 zu induzieren. Dazu wurden hybride Antigene aus dem p15E von KoRV und dem gp41 von HIV-1 generiert, kloniert und exprimiert. Die Immunisierungen resultierten in der Induktion von Antikörpern, die an das Kernepitop DKWA des breit HIV-1 neutralisierenden Antikörpers 2F5 binden. Sie waren erwartungsgemäß nicht in der Lage, den Laborstamm HIV-1 IIIB zu neutralisieren. Die rekombinanten Konstrukte werden weiter optimiert und dienen somit als Grundlage für weiterführende Strategien zur Induktion 2F5-ähnlicher Antikörper.

## 6. Literaturverzeichnis

### 6.1 Paper

- Alkhatib G, Broder CC, Berger EA., Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages.  
J Virol. 1996 Aug;70(8):5487-94.
- Andersson J, Boasso A, Nilsson J, Zhang R, Shire NJ, Lindback S, Shearer GM, Chougnat CA., The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients.  
J Immunol. 2005 Mar 15;174(6):3143-7.
- Armbruster C, Stiegler GM, Vcelar BA, Jager W, Michael NL, Vetter N, Katinger HW., A phase I trial with two human monoclonal antibodies (hMAb 2F5, 2G12) against HIV-1.  
AIDS. 2002 Jan 25;16(2):227-33.
- Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA., Human CD4+CD25+ regulatory T cells.  
Semin Immunol. 2004 Apr;16(2):89-98. Review.
- Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA., Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function.  
J Immunol. 2002 Dec 1;169(11):6210-7.
- Barcellini, W., et al., TH1 and TH2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients.  
Aids, 1994. 8(6): p. 757-62.
- Barcova M, Kacani L, Speth C, Dierich MP., gp41 envelope protein of human immunodeficiency virus induces interleukin (IL)-10 in monocytes, but not in B, T, or NK cells, leading to reduced IL-2 and interferon-gamma production.  
J Infect Dis. 1998 Apr;177(4):905-13.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).  
Science. 1983 May 20;220(4599):868-71.
- Benit L, Dessen P, Heidmann T., Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes.  
J Virol. 2001 Dec;75(23):11709-19.
- Binley JM, Wrin T, Korber B, Zwick MB, Wang M, Chappey C, Stiegler G, Kunert R, Zolla-Pazner S, Katinger H, Petropoulos CJ, Burton DR., Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies.  
J Virol. 2004 Dec;78(23):13232-52.
- Borghgi, P., et al., Induction of interleukin-10 by human immunodeficiency virus type 1 and its gp120 protein in human monocytes/macrophages.  
J Virol, 1995. 69(2): p.1284-7.
- Bradford MM., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.

- Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, 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 Mar;34(3):623-30. Erratum in: *Eur J Immunol.* 2004 May;34(5):1498.
- Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, Sawyer LS, Hendry RM, Dunlop N, Nara PL, et al., Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science.* 1994 Nov 11;266(5187):1024-7.
- Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, Sawyer LS, Hendry RM, Dunlop N, Nara PL, et al., Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science.* 1994 Nov 11;266(5187):1024-7.
- Caffrey M., Model for the structure of the HIV gp41 ectodomain: insight into the intermolecular interactions of the gp41 loop. *Biochim Biophys Acta.* 2001 May 31;1536(2-3):116-22.
- Canfield PJ, Sabine JM, Love DN. Virus particles associated with leukaemia in a koala. *Aust Vet J.* 1988 Oct;65(10):327-8.
- Chai JG, Xue SA, Coe D, Addey C, Bartok I, Scott D, Simpson E, Stauss HJ, Hori S, Sakaguchi S, Dyson J., Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation.* 2005 May 27;79(10):1310-6.
- Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS., Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* 1997 Apr 18;89(2):263-73.
- Cianciolo GJ, Bogerd HP, Kipnis RJ, Copeland TD, Oroszlan S, Snyderman R., Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to envelope proteins of human and animal retroviruses. *Trans Assoc Am Physicians.* 1985;98:30-41.
- Cianciolo GJ, Copeland TD, Oroszlan S, Snyderman R., Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science.* 1985 Oct 25;230(4724):453-5.
- Clerici M, Fusi ML, Ruzzante S, Piconi S, Biasin M, Arienti D, Trabattoni D, Villa ML., Type 1 and type 2 cytokines in HIV infection -- a possible role in apoptosis and disease progression. *Ann Med.* 1997 Jun;29(3):185-8.
- Clerici M, Shearer GM., A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today.* 1993 Mar;14(3):107-11. Review.
- Clerici M, Shearer GM., Cellular immunity and a type 1 cytokine profile in protection against HIV infection and progression to AIDS. *Res Immunol.* 1994 Oct-Dec;145(8-9):635-41; discussion 641-3. Review.
- Clerici, M. and G.M. Shearer, The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today,* 1994. 15(12): p. 575-81.

- Clerici, M., et al., Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus.  
J Clin Invest, 1994. 93(2): p. 768-75.
- Collette Y, Chang HL, Cerdan C, Chambost H, Algarte M, Mawas C, Imbert J, Burny A, Olive D., Specific Th1 cytokine down-regulation associated with primary clinically derived human immunodeficiency virus type 1 Nef gene-induced expression.  
J Immunol. 1996 Jan 1;156(1):360-70.
- Cotter, S.M., W.D. Hardy, Jr., and M. Essex, Association of feline leukemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat.  
J Am Vet Med Assoc, 1975. 166(5): p.449-54.
- 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+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis.  
J Immunol. 2004 May 15;172(10):6435-43.
- Decroix N, Pamonsinlapatham P, Quan CP, Bouvet JP., Impairment by mucosal adjuvants and cross-reactivity with variant peptides of the mucosal immunity induced by injection of the fusion peptide PADRE-ELDKWA.  
Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Nov;10(6):1103-8.
- Decroix N, Pamonsinlapatham P, Quan CP, Bouvet JP., Impairment by mucosal adjuvants and cross-reactivity with variant peptides of the mucosal immunity induced by injection of the fusion peptide PADRE-ELDKWA.  
Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Nov;10(6):1103-8.
- Denis, M. and E. Ghadirian, Dysregulation of interleukin 8, interleukin 10, and interleukin 12 release by alveolar macrophages from HIV type 1-infected subjects.  
AIDS Res Hum Retroviruses, 1994. 10(12): p. 1619-27.
- Denner J, Norley S, Kurth R., The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients.  
AIDS. 1994 Aug;8(8):1063-72.
- Denner J, Norley S, Kurth R., The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients.  
AIDS. 1994 Aug;8(8):1063-72.
- Denner J, Persin C, Vogel T, Hausteiner D, Norley S, Kurth R., The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation.  
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1996 Aug 15;12(5):442-50.
- Denner J, Wunderlich V, Bierwolf D., Suppression of human lymphocyte mitogen response by proteins of the type-D retrovirus PMFV.  
Int J Cancer. 1986 Feb 15;37(2):311-6.
- Denner J., How does HIV induce AIDS? The virus protein hypothesis.  
J Hum Virol. 2000 Mar-Apr;3(2):81-2.
- Denner J., Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation.  
Ann N Y Acad Sci. 1998 Dec 30;862:75-86. Review.
- Dent, P.B., R.D. Peterson, and R.A. Good, A Defect in Cellular Immunity During the Incubation Period of Passage a Leukemia in C3h Mice.  
Proc Soc Exp Biol Med, 1965.119: p. 869-71.

Dianzani F, Antonelli G, Riva E, Turriziani O, Antonelli L, Tyring S, Carrasco DA, Lee H, Nguyen D, Pan J, Poast J, Cloyd M, Baron S., Is human immunodeficiency virus RNA load composed of neutralized immune complexes?  
J Infect Dis. 2002 Apr 15;185(8):1051-4. Epub 2002 Apr 1.

D'Souza MP, Livnat D, Bradac JA, Bridges SH., Evaluation of monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by neutralization assays: performance criteria for selecting candidate antibodies for clinical trials. AIDS Clinical Trials Group Antibody Selection Working Group.  
J Infect Dis. 1997 May;175(5):1056-62.

Dukers DF, Meij P, Vervoort MB, Vos W, Scheper RJ, Meijer CJ, Bloemena E, Middeldorp JM., Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1.  
J Immunol. 2000 Jul 15;165(2):663-70.

Eckert DM, Kim PS., Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition.  
Annu Rev Biochem. 2001;70:777-810. Review.

Eckhart L, Raffelsberger W, Ferko B, Klima A, Purtscher M, Katinger H, Rucker F., Immunogenic presentation of a conserved gp41 epitope of human immunodeficiency virus type 1 on recombinant surface antigen of hepatitis B virus.  
J Gen Virol. 1996 Sep;77 ( Pt 9):2001-8.

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

Elder JH, McGee JS, Munson M, Houghten RA, Kloetzer W, Bittle JL, Grant CK.;Localization of neutralizing regions of the envelope gene of feline leukemia virus by using anti-synthetic peptide antibodies.  
J Virol. 1987 Jan;61(1):8-15.

Emilie D, Touitou R, Raphael M, Peuchmaur M, Devergne O, Rea D, Coumbraras J, Crevon MC, Edelman L, Joab I, et al., In vivo production of interleukin-10 by malignant cells in AIDS lymphomas.  
Eur J Immunol. 1992 Nov;22(11):2937-42.

Evans DT, Desrosiers RC., Immune evasion strategies of the primate lentiviruses.  
Immunol Rev. 2001 Oct;183:141-58. Review.

Faxvaag A, Espevik T, Dalen A., An immunosuppressive murine leukaemia virus induces a Th1-->Th2 switch and abrogates the IgM antibody response to sheep erythrocytes by suppressing the production of IL-2.  
Clin Exp Immunol. 1995 Dec;102(3):487-95.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA, HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor,  
Science. 1996 May 10;272(5263):872-7.

Fiebig U, Stephan O, Kurth R, Denner J., Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation?  
Virology. 2003 Mar 15;307(2):406-13.

- Finnegan CM, Berg W, Lewis GK, DeVico AL., Antigenic properties of the human immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein during cell-cell fusion. *J Virol.* 2002 Dec;76(23):12123-34.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY., Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330-6. Epub 2003 Mar 3.
- Fouts TR, Binley JM, Trkola A, Robinson JE, Moore JP., Neutralization of the human immunodeficiency virus type 1 primary isolate JR-FL by human monoclonal antibodies correlates with antibody binding to the oligomeric form of the envelope glycoprotein complex. *J Virol.* 1997 Apr;71(4):2779-85.
- Foy K, Juethner SN., Enfuvirtide (T-20): potentials and challenges. *J Assoc Nurses AIDS Care.* 2004 Nov-Dec;15(6):65-71. Review.
- Freed EO, Myers DJ, Risser R., Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jun;87(12):4650-4.
- Furuta RA, Wild CT, Weng Y, Weiss CD., Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat Struct Biol.* 1998 Apr;5(4):276-9. Erratum in: *Nat Struct Biol* 1998 Jul;5(7):612.
- Gallaher WR, Ball JM, Garry RF, Griffin MC, Montelaro RC., A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1989 Aug;5(4):431-40
- Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat SS, Puri A, Durell S, Blumenthal R., The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jul 11;1614(1):36-50. Review.
- Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B., Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science.* 2002 Jun 28;296(5577):2354-60. Review.
- Goulder PJ, Brander C, Tang Y, Tremblay C, Colbert RA, Addo MM, Rosenberg ES, Nguyen T, Allen R, Trocha A, Altfeld M, He S, Bunce M, Funkhouser R, Pelton SI, Burchett SK, McIntosh K, Korber BT, Walker BD., Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature.* 2001 Jul 19;412(6844):334-8.
- Graziosi C, Gantt KR, Vaccarezza M, Demarest JF, Daucher M, Saag MS, Shaw GM, Quinn TC, Cohen OJ, Welbon CC, Pantaleo G, Fauci AS., Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 30;93(9):4386-91.
- Graziosi, C., et al., Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. *Science*, 1994. 265(5169): p. 248-52.
- Graziosi, C., G. Pantaleo, and A.S. Fauci, Comparative analysis of constitutive cytokine expression in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals. *Res Immunol*, 1994. 145(8-9): p. 602-5; discussion 605-7.

- Hanger JJ, Bromham LD, McKee JJ, O'Brien TM, Robinson WF., The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to Gibbon ape leukemia virus. *J Virol.* 2000 May;74(9):4264-72.
- Haraguchi, S., et al., A synthetic peptide homologous to retroviral envelope protein down-regulates TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression. *J Leukoc Biol*, 1992. 52(4): p. 469-72.
- Haraguchi, S., et al., Differential modulation of Th1- and Th2-related cytokine mRNA expression by a synthetic peptide homologous to a conserved domain within retroviral envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(8): p. 3611-5.
- Haraguchi, S., R.A. Good, and N.K. Day, Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns. *Immunol Today*, 1995. 16(12): p. 595-603.
- 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.
- Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP., V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2005 Feb;21(2):171-89. Review.
- Haynes BF, Fleming J, St Clair EW, Katinger H, Stiegler G, Kunert R, Robinson J, Searce RM, Plonk K, Staats HF, Ortel TL, Liao HX, Alam SM., Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science.* 2005 Jun 24;308(5730):1906-8. Epub 2005 Apr 28.
- Hori S, Sakaguchi S., Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2004 Jul;6(8):745-51. Review.
- Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR., Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science.* 1991 Jul 5;253(5015):71-4.
- Ji HB, Liao G, Faubion WA, Abadia-Molina AC, Cozzo C, Laroux FS, Caton A, Terhorst C., Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *J Immunol.* 2004 May 15;172(10):5823-7.
- Jones PL, Korte T, Blumenthal R., Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. *J Biol Chem.* 1998 Jan 2;273(1):404-9.
- Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH., Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.* 2001 Jun 4;193(11):1285-94.

- Joyce JG, Hurni WM, Bogusky MJ, Garsky VM, Liang X, Citron MP, Danzeisen RC, Miller MD, Shiver JW, Keller PM., Enhancement of alpha -helicity in the HIV-1 inhibitory peptide DP178 leads to an increased affinity for human monoclonal antibody 2F5 but does not elicit neutralizing responses in vitro. Implications for vaccine design. *J Biol Chem.* 2002 Nov 29;277(48):45811-20. Epub 2002 Sep 16. Erratum in: *J Biol Chem.* 2003 Feb 14;278(7):5492.
- Kessler JA 2nd, McKenna PM, Emini EA, Chan CP, Patel MD, Gupta SK, Mark GE 3rd, Barbas CF 3rd, Burton DR, Conley AJ., Recombinant human monoclonal antibody IgG1b12 neutralizes diverse human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997 May 1;13(7):575-82.
- Kim JD, Choi BK, Bae JS, Lee UH, Han IS, Lee HW, Youn BS, Vinay DS, Kwon BS., Cloning and characterization of G1TR ligand. *Genes Immun.* 2003 Dec;4(8):564-9.
- 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.
- Kliger Y, Levanon EY., Cloaked similarity between HIV-1 and SARS-CoV suggests an anti-SARS strategy. *BMC Microbiol.* 2003 Sep 21;3(1):20.
- 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.
- Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C, Blank N, Kalden JR, Lorenz HM., Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med.* 2004 May 3;199(9):1285-91. Epub 2004 Apr 26.
- Kwong PD, Wyatt R, Sattentau QJ, Sodroski J, Hendrickson WA., Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol.* 2000 Feb;74(4):1961-72.
- Langedijk JP, Zwart G, Goudsmit J, Melen RH., Fine specificity of antibody recognition may predict amino acid substitution in the third variable region of gp120 during HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1995 Oct;11(10):1153-62.
- Langhammer S, Fiebig U, Kurth R, Denner J., Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukaemia virus (FeLV). *Vaccine.* 2005 May 9;23(25):3341-8.
- Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ., Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1990 Jun 25;265(18):10373-82.
- Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ., Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1990 Jun 25;265(18):10373-82.

- Levy JA, Margaretten W, Nelson J., Detection of HIV in enterochromaffin cells in the rectal mucosa of an AIDS patient.  
*Am J Gastroenterol.* 1989 Jul;84(7):787-9.
- Li Z, Mahesh SP, Kim BJ, Buggage RR, Nussenblatt RB., Expression of glucocorticoid induced TNF receptor family related protein (GITR) on peripheral T cells from normal human donors and patients with non-infectious uveitis.  
*J Autoimmun.* 2003 Aug;21(1):83-92.
- Liao M, Lu Y, Xiao Y, Dierich MP, Chen Y., Induction of high level of specific antibody response to the neutralizing epitope ELDKWA on HIV-1 gp41 by peptide-vaccine.  
*Peptides.* 2000 Apr;21(4):463-8.
- Lu Y, Xiao Y, Ding J, Dierich M, Chen YH., Immunogenicity of neutralizing epitopes on multiple-epitope vaccines against HIV-1.  
*Int Arch Allergy Immunol.* 2000 Jan;121(1):80-4.
- Lu Y, Xiao Y, Ding J, Dierich MP, Chen YH., Multiepitope vaccines intensively increased levels of antibodies recognizing three neutralizing epitopes on human immunodeficiency virus-1 envelope protein.  
*Scand J Immunol.* 2000 May;51(5):497-501.
- MacEwan DJ., TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences.  
*Cell Signal.* 2002 Jun;14(6):477-92. Review.
- Maggi, E., et al., Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells.  
*Science*, 1994. 265(5169): p. 244-8.
- Mangeney M, Pothlichet J, Renard M, Ducos B, Heidmann T., Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo.  
*Cancer Res.* 2005 Apr 1;65(7):2588-91.
- Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, Benvenuto E, Capone I., Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1.  
*J Virol.* 2001 Sep;75(18):8434-9.
- Masood, R., et al., IL-10 inhibits HIV-1 replication and is induced by tat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 202(1): p. 374-83.
- McGaughey GB, Citron M, Danzeisen RC, Freidinger RM, Garsky VM, Hurni WM, Joyce JG, Liang X, Miller M, Shiver J, Bogusky MJ., HIV-1 vaccine development: constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb.  
*Biochemistry.* 2003 Mar 25;42(11):3214-23.
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC., CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor.  
*Immunity.* 2002 Feb;16(2):311-23.
- Mo H, Stamatatos L, Ip JE, Barbas CF, Parren PW, Burton DR, Moore JP, Ho DD., Human immunodeficiency virus type 1 mutants that escape neutralization by human monoclonal antibody IgG1b12. *off.*  
*J Virol.* 1997 Sep;71(9):6869-74.

- Monell CR, Strand M., Structural and functional similarities between synthetic HIV gp41 peptides and defensins.  
*Clin Immunol Immunopathol.* 1994 Jun;71(3):315-24.
- Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, de Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE., Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans.  
*Hum Immunol.* 2005 Jan;66(1):13-20.
- Moulard M, Phogat SK, Shu Y, Labrijn AF, Xiao X, Binley JM, Zhang MY, Sidorov IA, Broder CC, Robinson J, Parren PW, Burton DR, Dimitrov DS., Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 May 14;99(10):6913-8. Epub 2002 May 7.
- 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.
- Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, Rucker F, Katinger H., A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1.  
*J Virol.* 1993 Nov;67(11):6642-7.
- Nabel GJ., Immunology. Close to the edge: neutralizing the HIV-1 envelope.  
*Science.* 2005 Jun 24;308(5730):1878-9.
- Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, Migliorati G, Riccardi C., A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 10;94(12):6216-21.
- 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.
- Oostendorp, R.A., C.J. Meijer, and R.J. Scheper, Immunosuppression by retroviral-envelope-related proteins, and their role in non-retroviral human disease.  
*Crit Rev Oncol Hematol,* 1993. 14(3): p. 189-206.
- Orosz, C.G., et al., Retrovirus-mediated immunosuppression. I. FeLV-UV and specific FeLV proteins alter T lymphocyte behavior by inducing hyporesponsiveness to lymphokines.  
*J Immunol,* 1985. 134(5): p. 3396-403.
- Orosz, C.G., et al., Retrovirus-mediated immunosuppression. II. FeLV-UV alters in vitro murine T lymphocyte behavior by reversibly impairing lymphokine secretion.  
*J Immunol,* 1985. 135(1): p. 583-90.
- Parren PW, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ., The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity.  
*AIDS.* 1999;13 Suppl A:S137-62. Review.

- Parren PW, Wang M, Trkola A, Binley JM, Purtscher M, Katinger H, Moore JP, Burton DR., Antibody neutralization-resistant primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1998 Dec;72(12):10270-4.
- Pereira FB, Goni FM, Nieva JL., Membrane fusion induced by the HIV type 1 fusion peptide: modulation by factors affecting glycoprotein 41 activity and potential anti-HIV compounds. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997 Sep 20;13(14):1203-11.
- Peterson, R.D., R. Hendrickson, and R.A. Good, Reduced Antibody Forming Capacity During the Incubation Period of Passage a Leukemia in C3h Mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1963. 114: p. 517-20.
- Poignard P, Sabbe R, Picchio GR, Wang M, Gulizia RJ, Katinger H, Parren PW, Mosier DE, Burton DR., Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity.* 1999 Apr;10(4):431-8.
- Poli G., Laureate ESCI award for excellence in clinical science 1999. Cytokines and the human immunodeficiency virus: from bench to bedside. European Society for Clinical Investigation. *Eur J Clin Invest.* 1999 Aug;29(8):723-32. Review.
- Prasad KV, Ao Z, Yoon Y, Wu MX, Rizk M, Jacquot S, Schlossman SF., CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 10;94(12):6346-51.
- Purtscher M, Trkola A, Grassauer A, Schulz PM, Klima A, Dopfer S, Gruber G, Buchacher A, Muster T, Katinger H., Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5. *AIDS.* 1996 Jun;10(6):587-93.
- Raviv Y, Viard M, Bess J Jr, Blumenthal R., Quantitative measurement of fusion of HIV-1 and SIV with cultured cells using photosensitized labeling. *Virology.* 2002 Feb 15;293(2):243-51
- Read S, Malmstrom V, Powrie F., Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192(2):295-302.
- Reitz MS Jr, Wilson C, Naugle C, Gallo RC, Robert-Guroff M., Generation of a neutralization-resistant variant of HIV-1 is due to selection for a point mutation in the envelope gene. *Cell.* 1988 Jul 1;54(1):57-63.
- Ren J, Singh AK, Gregerson DS, Shichi H., Induction of immunotolerance in rats by intratesticular administration of an eicosapeptide of bovine S-antigen. *Autoimmunity.* 1996;25(1):19-31.
- Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecuadrada JL, Ling KL, Pratap S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V, Powrie F, Banham AH., Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol.* 2005 Jun;35(6):1681-91.

- Ronchetti S, Nocentini G, Riccardi C, Pandolfi PP., Role of GITR in activation response of T lymphocytes.  
Blood. 2002 Jul 1;100(1):350-2.
- Ruegg CL, Monell CR, Strand M., Identification, using synthetic peptides, of the minimum amino acid sequence from the retroviral transmembrane protein p15E required for inhibition of lymphoproliferation and its similarity to gp21 of human T-lymphotropic virus types I and II.  
J Virol. 1989 Aug;63(8):3250-6.
- Ruegg CL, Strand M., A synthetic peptide with sequence identity to the transmembrane protein GP41 of HIV-1 inhibits distinct lymphocyte activation pathways dependent on protein kinase C and intracellular calcium influx.  
Cell Immunol. 1991 Oct 1;137(1):1-13.
- Sackett K, Shai Y., How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain.  
J Mol Biol. 2003 Oct 10;333(1):47-58.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.  
J Immunol. 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
- Salzwedel K, West JT, Hunter E., A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity.  
J Virol. 1999 Mar;73(3):2469-80.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Sattentau QJ, Moore JP., Human immunodeficiency virus type 1 neutralization is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer.  
J Exp Med. 1995 Jul 1;182(1):185-96.
- Scanlan CN, Pantophlet R, Wormald MR, Ollmann Saphire E, Stanfield R, Wilson IA, Katinger H, Dwek RA, Rudd PM, Burton DR., The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120.  
J Virol. 2002 Jul;76(14):7306-21.
- Schagger H, von Jagow G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.  
Anal Biochem. 1987 Nov 1;166(2):368-79.
- Schibli DJ, Montelaro RC, Vogel HJ., The membrane-proximal tryptophan-rich region of the HIV glycoprotein, gp41, forms a well-defined helix in dodecylphosphocholine micelles.  
Biochemistry. 2001 Aug 14;40(32):9570-8.
- Shevach EM., Regulatory T cells in autoimmunity.  
Annu Rev Immunol. 2000;18:423-49. Review.
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S., Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance.  
Nat Immunol. 2002 Feb;3(2):135-42. Epub 2002 Jan 22.

- Shnaper S, Sackett K, Gallo SA, Blumenthal R, Shai Y., The C- and the N-terminal regions of glycoprotein 41 ectodomain fuse membranes enriched and not enriched with cholesterol, respectively.  
J Biol Chem. 2004 Apr 30;279(18):18526-34. Epub 2004 Feb 23.
- Simmons G, Wilkinson D, Reeves JD, Dittmar MT, Beddows S, Weber J, Carnegie G, Desselberger U, Gray PW, Weiss RA, Clapham PR., Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry.  
J Virol. 1996 Dec;70(12):8355-60.
- Spinicelli S, Nocentini G, Ronchetti S, Krausz LT, Bianchini R, Riccardi C., GTR interacts with the pro-apoptotic protein Siva and induces apoptosis.  
Cell Death Differ. 2002 Dec;9(12):1382-4. No abstract available.
- Stiegler G, Armbruster C, Vcelar B, Stoiber H, Kunert R, Michael NL, Jagodzinski LL, Ammann C, Jager W, Jacobson J, Vetter N, Katinger H., Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: a phase I evaluation.  
AIDS. 2002 Oct 18;16(15):2019-25.
- Stylianou E, Aukrust P, Kvale D, Muller F, Froland SS., 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 Apr;116(1):115-20.
- Takehita, S., et al., Induction of IL-6 and IL-10 production by recombinant HIV-1 envelope glycoprotein 41 (gp41) in the THP-1 human monocytic cell line.  
Cell Immunol, 1995. 165(2): p. 234-42.
- Tan K, Liu J, Wang J, Shen S, Lu M., Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 11;94(23):12303-8.
- Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR., CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade.  
J Exp Med. 2001 Jun 4;193(11):1311-8.
- Thali M, Moore JP, Furman C, Charles M, Ho DD, Robinson J, Sodroski J., Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding.  
J Virol. 1993 Jul;67(7):3978-88.
- Tian H, Xiao Y, Zhu M, Chen YH., HIV epitope-peptides in aluminum adjuvant induced high levels of epitope-specific antibodies.  
Int Immunopharmacol. 2001 Apr;1(4):763-8.
- Tommasini A, Ferrari S, Moratto D, Badolato R, Boniotto M, Pirulli D, Notarangelo LD, Andolina M., X-chromosome inactivation analysis in a female carrier of FOXP3 mutation.  
Clin Exp Immunol. 2002 Oct;130(1):127-30.
- 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 Dec 9;100(25):15059-64. Epub 2003 Nov 7.

Trkola A, Kuster H, Rusert P, Joos B, Fischer M, Leemann C, Manrique A, Huber M, Rehr M, Oxenius A, Weber R, Stiegler G, Vcelar B, Katinger H, Aceto L, Gunthard HF., Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies.  
Nat Med. 2005 Jun;11(6):615-22. Epub 2005 May 8.

Trkola A, Pomales AB, Yuan H, Korber B, Maddon PJ, Allaway GP, Katinger H, Barbas CF 3rd, Burton DR, Ho DD, et al., Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG.  
J Virol. 1995 Nov;69(11):6609-17.

Trkola A, Pomales AB, Yuan H, Korber B, Maddon PJ, Allaway GP, Katinger H, Barbas CF 3rd, Burton DR, Ho DD, et al., Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG.  
J Virol. 1995 Nov;69(11):6609-17.

Trkola A, Purtscher M, Muster T, Ballaun C, Buchacher A, Sullivan N, Srinivasan K, Sodroski J, Moore JP, Katinger H., Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1.  
J Virol. 1996 Feb;70(2):1100-8.

Turner BG, Summers MF., Structural biology of HIV,  
J Mol Biol. 1999 Jan 8;285(1):1-32. Review.

Vahlenkamp TW, Tompkins MB, Tompkins WA., Feline immunodeficiency virus infection phenotypically and functionally activates immunosuppressive CD4+CD25+ T regulatory cells.  
J Immunol. 2004 Apr 15;172(8):4752-61.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P., Tumor necrosis factor signaling.  
Cell Death Differ. 2003 Jan;10(1):45-65. Review.

Wang H, Nishanian P, Fahey JL., Characterization of immune suppression by a synthetic HIV gp41 peptide.  
Cell Immunol. 1995 Apr 1;161(2):236-43.

Watkins BA, Buge S, Aldrich K, Davis AE, Robinson J, Reitz MS Jr, Robert-Guroff M., Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to neutralization by natural antisera occurs through single amino acid substitutions that cause changes in antibody binding at multiple sites.  
J Virol. 1996 Dec;70(12):8431-7.

Watkins BA, Davis AE, Fiorentini S, di Marzo Veronese F, Reitz MS Jr., Evidence for distinct contributions of heavy and light chains to restriction of antibody recognition of the HIV-1 principal neutralization determinant.  
J Immunol. 1996 Feb 15;156(4):1676-83.

Weber J., The pathogenesis of HIV-1 infection.  
Br Med Bull. 2001;58:61-72. Review.

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

Wild C, Greenwell T, Shugars D, Rimsky-Clarke L, Matthews T., The inhibitory activity of an HIV type 1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure.

AIDS Res Hum Retroviruses. 1995 Mar;11(3):323-5.

Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH., Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. J Med Genet. 2002 Aug;39(8):537-45. Review.

Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC., Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution.

Nature. 1981 Jan 29;289(5796):366-73.

Wolbank S, Kunert R, Stiegler G, Katinger H., Characterization of human class-switched polymeric (immunoglobulin M [IgM] and IgA) anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies 2F5 and 2G12.

J Virol. 2003 Apr;77(7):4095-103.

Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, Kaiser LR, June CH., Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation.

J Immunol. 2002 May 1;168(9):4272-6

Xiao Y, Liao M, Lu Y, Dierich MP, Chen YH., Epitope-vaccines: a new strategy to induce high levels of neutralizing antibodies against HIV-1.

Immunobiology. 2000 Jan;201(3-4):323-31.

Younes A, Aggarwall BB., Clinical implications of the tumor necrosis factor family in benign and malignant hematologic disorders.

Cancer. 2003 Aug 1;98(3):458-67. Review.

Zwick MB, Kelleher R, Jensen R, Labrijn AF, Wang M, Quinnan GV Jr, Parren PW, Burton DR., A novel human antibody against human immunodeficiency virus type 1 gp120 is V1, V2, and V3 loop dependent and helps delimit the epitope of the broadly neutralizing antibody immunoglobulin G1 b12.

J Virol. 2003 Jun;77(12):6965-78.

Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Saphire EO, Binley JM, Moore JP, Stiegler G, Katinger H, Burton DR, Parren PW., Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41.

J Virol. 2001 Nov;75(22):10892-905.

Zwick MB, Parren PW, Saphire EO, Church S, Wang M, Scott JK, Dawson PE, Wilson IA, Burton DR., Molecular features of the broadly neutralizing immunoglobulin G1 b12 required for recognition of human immunodeficiency virus type 1 gp120.

J Virol. 2003 May;77(10):5863-76.

Zwick MB, Wang M, Pognard P, Stiegler G, Katinger H, Burton DR, Parren PW., Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies.

J Virol. 2001 Dec;75(24):12198-208.

**7.2 Lehrbücher**

Modrow, Susanne Falke, Dietrich Truyen, Uwe: Molekulare Virologie, 2. Auflage 2003, Spektrum Akademischer Verlag, ISBN 382741086X

Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport: Immunologie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag 2002, ISBN 3827410797

Voet, Donald Voet, Judith G.: Biochemie, Hrsg. v. Alfred Maelicke u. Werner Müller-Esterl, ISBN 3527292497

Mülhardt, Cornel : Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, ISBN 3827414601

## 7. Anhang

**Tabelle 1: Liste der IL-10-Cytokin-Assays**

<b>Nr.</b>	<b>Spender</b>	<b>Kopplung</b>	<b>Datum</b>	<b>IL-10 pg/ml</b>
1	AB	<b>K84</b>	05.01.2005	260
2	AB	<b>K84</b>	25.01.2005	370
3	AB	<b>K85</b>	05.01.2005	20
4	AB	<b>K86</b>	05.01.2005	90
5	AB	<b>K87</b>	05.01.2005	0
6	AB	<b>K88</b>	05.01.2005	0
7	AB	<b>K89</b>	05.01.2005	40
8	AM	<b>K84</b>	13.01.2005	110
9	AM	<b>K88</b>	13.01.2005	13
10	AM	<b>K90</b>	10.02.2005	60
11	AM	<b>K91</b>	10.02.2005	170
12	AM	<b>K92</b>	10.02.2005	80
13	BK	<b>K100</b>	04.05.2005	5
14	BK	<b>K97</b>	04.05.2005	140
15	BK	<b>K98</b>	04.05.2005	140
16	BK	<b>K99</b>	04.05.2005	60
17	CS	<b>K100</b>	04.05.2005	0
18	CS	<b>K84</b>	27.01.2005	90
19	CS	<b>K85</b>	27.01.2005	30
20	CS	<b>K86</b>	27.01.2005	10
21	CS	<b>K88</b>	27.01.2005	0
22	CS	<b>K89</b>	27.01.2005	50
23	CS	<b>K90</b>	27.01.2005	0
24	CS	<b>K91</b>	27.01.2005	180
25	CS	<b>K97</b>	04.05.2005	110
26	CS	<b>K98</b>	04.05.2005	50
27	CS	<b>K99</b>	04.05.2005	45
28	IB	<b>K84</b>	25.01.2005	600
29	IB	<b>K90</b>	17.03.2005	80
30	IB	<b>K91</b>	17.02.2005	350
31	IB	<b>K91</b>	17.03.2005	120
32	IB	<b>K92</b>	17.02.2005	340
33	IB	<b>K93</b>	17.02.2005	50
34	IB	<b>K94</b>	17.02.2005	120
35	IB	<b>K95</b>	17.02.2005	110
36	JD	<b>K84</b>	13.01.2005	130
37	JD	<b>K88</b>	13.01.2005	16
38	JM	<b>K90</b>	17.03.2005	210
39	JM	<b>K91</b>	17.03.2005	150
40	JR	<b>K84</b>	03.12.2004	15
41	MH	<b>K100</b>	25.05.2005	0
42	MH	<b>K84</b>	05.01.2005	200
43	MH	<b>K85</b>	05.01.2005	100
44	MH	<b>K86</b>	05.01.2005	160
45	MH	<b>K87</b>	05.01.2005	15
46	MH	<b>K88</b>	05.01.2005	40
47	MH	<b>K89</b>	05.01.2005	170
48	MH	<b>K97</b>	25.05.2005	0
49	MH	<b>K99</b>	25.05.2005	10
50	MJ	<b>K85</b>	15.12.2004	0

51	MJ	<b>K86</b>	15.12.2004	0
52	MJ	<b>K87</b>	15.12.2004	0
53	ML	<b>K90</b>	17.03.2005	110
54	ML	<b>K91</b>	17.03.2005	200
55	MP	<b>K84</b>	15.12.2004	35
56	MP	<b>K84</b>	25.01.2005	840
57	MS	<b>K84</b>	13.01.2005	120
58	MS	<b>K88</b>	13.01.2005	48
59	NB	<b>K100</b>	25.05.2005	0
60	NB	<b>K84</b>	05.01.2005	170
61	NB	<b>K85</b>	05.01.2005	5
62	NB	<b>K86</b>	05.01.2005	10
63	NB	<b>K87</b>	05.01.2005	0
64	NB	<b>K88</b>	05.01.2005	0
65	NB	<b>K89</b>	05.01.2005	20
66	NB	<b>K90</b>	10.02.2005	0
67	NB	<b>K91</b>	10.02.2005	220
68	NB	<b>K92</b>	10.02.2005	40
69	NB	<b>K97</b>	25.05.2005	0
70	NB	<b>K99</b>	25.05.2005	0
71	RB	<b>K84</b>	15.12.2004	170
72	RB	<b>K85</b>	15.12.2004	0
73	RB	<b>K86</b>	15.12.2004	0
74	RB	<b>K87</b>	15.12.2004	0
75	RB	<b>K91</b>	17.02.2005	310
76	RB	<b>K92</b>	17.02.2005	100
77	RB	<b>K93</b>	17.02.2005	70
78	RB	<b>K94</b>	17.02.2005	70
79	RB	<b>K95</b>	17.02.2005	10
80	SN	<b>K84</b>	03.12.2004	250
81	SN	<b>K84</b>	15.12.2004	480
82	SN	<b>K84</b>	27.01.2005	350
83	SN	<b>K85</b>	27.01.2005	290
84	SN	<b>K86</b>	15.12.2004	0
85	SN	<b>K86</b>	27.01.2005	140
86	SN	<b>K87</b>	15.12.2004	0
87	SN	<b>K88</b>	27.01.2005	190
88	SN	<b>K89</b>	27.01.2005	250
89	SN	<b>K90</b>	27.01.2005	50
90	SN	<b>K91</b>	27.01.2005	370
91	SN	<b>K97</b>	15.04.2005	220
92	SN	<b>K98</b>	15.04.2005	260
93	SN	<b>K85</b>	15.12.2004	0
94	UF	<b>K84</b>	13.01.2005	220
95	UF	<b>K88</b>	13.01.2005	105

Tabelle 2: IL-10-Werte der fraktionierten Konjugat

	<b>Ausgangsmaterial</b>	<b>hochmolekular</b>	<b>niedermolekular</b>	<b>Konjugat</b>
<b>IB</b>	76,51	16,65	0,00	<b>K90</b>
<b>ML</b>	106,22	54,77	0,00	
<b>JM</b>	209,84	128,25	53,90	
<b>IB</b>	124,81	59,71	0,00	<b>K91</b>
<b>ML</b>	202,88	128,23	0,00	
<b>JM</b>	253,19	125,92	0,00	



1. Behrendt, R., Lau, M., Schmidt, C.-M., Kurth, R., Denner, J.  
HIV-1 and porcine endogenous retroviruses (PERV) modulate cytokine production by human immune cells  
Jahrestagung Gesellschaft für Virologie, Hannover, 16.-19.3.2005
  
2. Behrendt, R., Lau, M., Schmidt, C.-M., Kurth, R., Denner, J.  
The transmembrane envelope protein: an immunosuppressive component of HIV and other retrovirus particles.  
Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Wien, 1.-4. Juni 2005.  
European J. Med. Res., 10, SII, 73 (2005)
  
3. Joachim Denner, Rayk Behrendt, Reinhard Kurth  
Modulation of cytokine production by the transmembrane envelope protein gp41 of HIV-1  
2005 INTERNATIONAL MEETING OF THE INSTITUTE OF HUMAN VIROLOGY  
August 29, 2005 – September 2, 2005

## 7. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Michael Hecker, der mir die Anfertigung einer externen Diplomarbeit ermöglicht hat. Weiterhin danke ich ihm für die Bereitschaft, als Gutachter dieser Arbeit tätig zu sein.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke ich Herrn Prof. Reinhardt Kurth ganz herzlich.

Für die immerwährende Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft während der Diplomarbeit danke ich Herrn Dr. Joachim Denner. Ich möchte ihm ebenfalls für die Bereitschaft danken, als Gutachter der Diplomarbeit zu fungieren.

Außerdem möchte ich der gesamten Abteilung P13 des Robert-Koch-Instituts danken, die sich tagtäglich mit mir im Nahkampf befanden und mir immer hilfreich zur Seite standen. Mein besonderer Dank geht an Britta Kluge, Kristina Büscher, Martina Lau, Christa-Maria Schmidt und Uwe Fiebig für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Frau Christiane Bug und Dr. Stephen Norley möchte ich für die Bereitstellung des Durchflusscytometers und dem Crashkurs in Immunmarkierung danken.

Ich danke meiner Familie für die kompromisslose finanzielle und moralische Unterstützung während des Studiums. Besonders danke ich meiner Lebensgefährtin Steffi Grewe, die mir durch die Hilfe in alltäglichen Dingen ein unbeschwertes Arbeiten ermöglichte.