

Freie Universität Berlin
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Institut für Biologie, Mikrobiologie

**Induktion von
CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen
durch retrovirale transmembrane Hüllproteine**

Diplomarbeit

von

Alexander Falenski

Berlin, September 2007

Für meine Eltern, Dominik und Jessica

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Diplomarbeit selbständig angefertigt sowie Literatur und Hilfsmittel vollständig angegeben zu haben.

Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kurth
Prof. Dr. Rupert Mutzel

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	10
1.1. Retroviren.....	10
1.2. Retrovirale Hüllproteine und die Isu-Domäne	10
1.3. Porcine endogene Retroviren	13
1.4. Das humane endogene Retrovirus K.....	13
1.5. Natives und adaptives Immunsystem.....	14
1.5.1. Das native Immunsystem	14
1.5.2. Das adaptive Immunsystem	15
1.5.3. Regulatorische T-Zellen.....	17
2. Zielsetzung	19
3. Material	20
3.1. Antikörper und Seren	20
3.2. Chemikalien	20
3.3. Geräte	22
3.4. Kommerzielle Kits	24
3.5. Nährmedien	24
3.6. Peptide.....	25
3.7. Primer und Sonden.....	25
3.8. Puffer.....	25
3.9. Verbrauchsmaterialien	27
3.10. Hefe.....	28
4. Methoden	30
4.1. Arbeiten mit Hefen.....	30
4.1.1. Vermehrung von <i>Hansenula polymorpha</i>	30
4.1.2. Integration des Vektors pFPMT121 ins Hefegenom.....	30
4.1.3. Lyse von Hefezellen.....	31
4.1.4. Lagerung von Hefen über längere Zeit	31
4.2. Arbeiten mit DNA.....	32
4.2.1. Agarose-Gelelektrophorese.....	32
4.2.2. DNA-Isolation aus Hefen.....	32
4.2.3. Polymerase-Kettenreaktion	33
4.2.4. Sequenzierung von DNA	34
4.3. Arbeiten mit PBMCs.....	34
4.3.1. Isolation von humanen PBMCs aus Vollblut.....	34
4.3.2. Bestimmung der Lebendzellzahl.....	35
4.3.3. Kultivierung von PBMCs.....	35
4.3.4. Markierung von PBMCs mittels Antikörpern.....	35

4.3.5.	Durchflusszytometrie	36
4.3.6.	IL-10-Zytokin-ELISA	37
4.4.	Arbeiten mit Proteinen	37
4.4.1.	Polymerisierung von Peptiden	37
4.4.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Peptiden	38
4.4.3.	Tricin-Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
4.4.4.	Western Blot.....	39
4.4.5.	ECL-Entwicklung.....	40
4.4.6.	DAB-Färbung.....	40
4.4.7.	Affinitätschromatografische Aufreinigung von Proteinen und Dialyse.....	41
4.4.8.	Kalte Aceton/Methanol-Fällung.....	42
4.5.	Arbeiten mit RNA	42
4.5.1.	Herstellung von RNase-freiem Wasser	42
4.5.2.	RNA-Isolation aus PBMCs	43
4.5.3.	Konzentrationsbestimmung von RNA	43
4.5.4.	One-Step Real-Time Quantitative PCR	44
5.	Ergebnisse	46
5.1.	Optimierte Gewinnung des rekombinanten transmembranen Hüllproteins des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K TM)	46
5.2.	Ansätze zur Gewinnung des rekombinanten transmembranen Hüllproteins p15E des porcinen endogenen Retrovirus (PERV p15E)	48
5.3.	Expression von IL-10, IFN- α 1 und FoxP3 in PBMCs nach Einwirkung von retroviralen Hüllproteinen	51
5.4.	Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) nach Einwirkung von retroviralen Hüllproteinen.....	59
5.5.	Kinetik der Zytokinmodulation bei verschiedenen Blutspendern.....	64
6.	Diskussion	67
6.1.	Aufreinigung des transmembranen Hüllproteins HERV-K TM aus <i>Hansenula polymorpha</i>	67
6.2.	Produktion des transmembranen Hüllproteins PERV p15E durch <i>Hansenula polymorpha</i>	68
6.3.	Expressionslevels von FoxP3, IL-10 und IFN- α 1	68
6.4.	Induktion regulatorischer T-Zellen	70
6.5.	Produktion von IL-10	71
6.6.	Ausblick	72
	Zusammenfassung.....	73
	Literaturverzeichnis.....	74

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Schematischer Aufbau des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV	11
Abb. 1-2: CKS-17 und homologe Isu-Domänen.....	11
Abb. 1-3: Sequenzhomologien zwischen Isu-Domänen verschiedener Retroviren und unterschiedlichen Interferonen ²²	12
Abb. 1-4: Inhibition der T-Zell-Aktivierung durch Tregs.....	18
Abb. 3-1: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pFPMT121-MF α -His ₆ -TCS ...	29
Abb. 5-1: Nachweis der DNA-Sequenz von HERV-K TM in der Hefe-DNA mittels PCR....	46
Abb. 5-2: Western Blot-Analyse der Hefezell-Lysate	47
Abb. 5-3: Test verschiedener Lysepuffer zur Aufreinigung von HERV-K TM mittels Western Blot-Analyse	48
Abb. 5-4: Nachweis des Vektors in der Hefe-DNA mittels PCR	49
Abb. 5-5: Nachweis der DNA-Sequenz von PERV p15E in der Hefe-DNA mittels PCR	49
Abb. 5-6: Nachweis von PERV p15E mittels Western Blot-Analyse (His-Tag).....	50
Abb. 5-7: Nachweis von PERV p15E mittels Western Blot-Analyse (Ziegen Serum 20)	51
Abb. 5-8: Induktion der IL-10-Ausschüttung in humanen PBMCs durch retrovirale Proteine ⁵²	
Abb. 5-9: Änderung des Transkriptionslevels der Gene von FoxP3 (A), IL-10 (B) und IFN- α 1 (C) in humanen PBMCs.....	53
Abb. 5-10: Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in humanen PBMCs	55
Abb. 5-11: Änderung des IL-10-Transkriptionslevels in humanen PBMCs.....	57
Abb. 5-12: Änderung des IFN- α 1-Transkriptionslevels in humanen PBMCs	58
Abb. 5-13: Quantifizierung der FoxP3 ⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie	60
Abb. 5-14: Quantifizierung der FoxP3 ⁺ Zellen sowie der CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie	61
Abb. 5-15: Quantifizierung der CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie	63
Abb. 5-16: Messung des Zytokingehaltes mittels ELISA.....	65

Tabellenverzeichnis

Tab. 4-1: Zusammensetzung der SDS-Gele.....	39
---	----

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	Allophycocyanin, <i>antigen-presenting cell</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA4	cytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat
dest.	destilliert
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid hydrochlorid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GITR	<i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i>
h	Stunde
HARS1	<i>Hansenula polymorpha autonomously replicating sequence</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HERV-K	Humanes endogenes Retrovirus K
HEX	Hexachlorofluorescein
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEX	<i>immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked</i>
Isu	immunsuppressiv
kDa	Kilodalton
LP	Lysepuffer
μ	mikro
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
MuLV	Murines Leukämie-Virus
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
n.g.	nicht getestet
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PERV	Porcines endogenes Retrovirus
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	<i>rotations / rounds per minute</i>
RPMI	<i>Rosswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
RTQ-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sek	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TM	Transmembranes Hüllprotein
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
üN	über Nacht
v/v	Volumenanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
w/v	Gewichtsanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
WB	WesternBlot
z.B.	zum Beispiel
ZS	Ziegenserum

Einbuchstabencodes für Aminosäuren

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

Einbuchstabencodes für Nukleinsäuren

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

1. Einleitung

1.1. Retroviren

Zu den Retroviridae gehören α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren sowie Lenti- und Spumaviren. Zwei identische positivsträngige ssRNA-Moleküle bilden das Genom, das durch das viruseigene Enzym Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben wird. Diese kann dann durch die ebenfalls vom Retrovirus kodierte Integrase ins Wirtsgenom integriert werden.

Das Genom des Provirus enthält zwei identische *long terminal repeats* (LTRs), die die Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env* in der genannten Reihenfolge einrahmen. *Pro* kodiert für eine Protease, die für die Prozessierung der Gag-, Pol- und Env-Transkripte zuständig ist. *Gag* (*group specific antigen*) kodiert für das Matrixprotein, das Kapsidprotein und das Nukleokapsid-Protein, die zusammen das Virusgenom sowie die Reverse Transkriptase und die Integrase umhüllen. Die genannten Enzyme werden durch *pol* kodiert. *Env* enthält die Information für das Oberflächenhüllprotein und das transmembrane Hüllprotein. In dieser Arbeit sind die transmembranen Hüllproteine des porcinen endogenen Retrovirus sowie des humanen endogenen Retrovirus von besonderem Interesse.

1.2. Retrovirale Hüllproteine und die Isu-Domäne

Am besten untersucht sind die Hüllproteine des humanen Immundefizienzvirus (HIV). Dieses kodiert im *env*-Gen das Vorläuferprotein gp160, das durch eine Protease in das Oberflächenhüllprotein gp120 und das Fusionsprotein gp41 gespalten wird^{1,2}. Vor dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle bindet gp120 an CD4 (*cluster of differentiation 4*)^{3,4}. Zusätzlich bindet der β -Chemokin-Rezeptor CCR5 der Makrophagen bzw. der α -Chemokin-Rezeptor CXCR4 der T-Zellen an gp120^{5,6}. Hierdurch wird eine Konformationsänderung bewirkt, die das Fusionsprotein gp41 freigibt. Letzteres besteht aus der innerhalb des Virus befindlichen Endodomäne und der externen Ectodomäne (Abb. 1-1). Diese wiederum kann in eine C-terminale und eine N-terminale Subdomäne unterteilt werden, die beide durch einen Cystein-Cystein-Loop miteinander verbunden sind. Zum Eintritt in die Wirtszelle verankert sich ein gp41-Trimer in der Membran der Zelle und faltet sich zu einem Sechs-Helix-Bündel um, wobei hydrophobe Wechselwirkungen das *coiled coil* stabilisieren⁷. Dadurch werden die Membranen des Virus und der Wirtszelle aneinander angenähert, so dass es zur Membranfusion und dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle kommt.

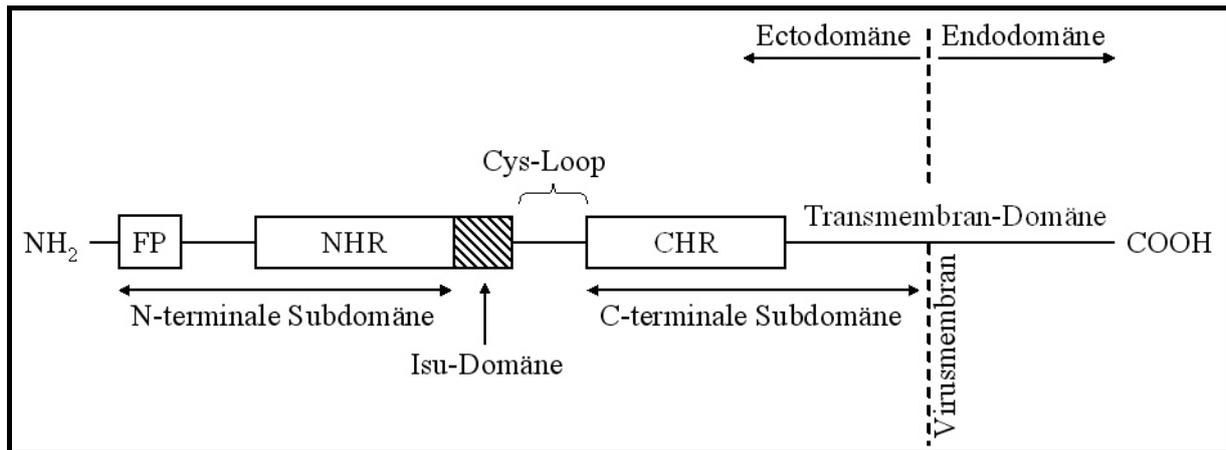


Abb. 1-1: Schematischer Aufbau des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV⁸

FP – Fusionspeptid, NHR – N-terminale Helixregion, CHR – C-terminale Helixregion, Isu-Domäne – immunsuppressive Domäne

Zwischen der N- und der C-terminalen Subdomäne befindet sich im Bereich des Leucinzipfers (env583-599) die immunsuppressive (Isu-) Domäne⁹. Diese ist bei HIV und anderen Retroviren hoch konserviert, so dass für die Gammaretroviren eine 17 Aminosäuren lange Konsensus-Sequenz, genannt CKS-17, abgeleitet werden konnte¹⁰ (Abb. 1-2).

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

Abb. 1-2: CKS-17 und homologe Isu-Domänen

FeLV – Felines Leukämievirus, MuLV – Murines Leukämievirus, PERV – porcines endogenes Retrovirus, HERV – humanes endogenes Retrovirus, HIV – humanes Immundefizienzvirus; rot gefärbte Buchstaben repräsentieren von der CKS-17-Sequenz abweichende Aminosäuren. Abbildung nach (10).

Zu den Retroviren, die diese Isu-Domäne im transmembranen Hüllprotein enthalten, gehören auch das murine Leukämievirus (MuLV), das porcine endogene Retrovirus (PERV), das humane endogene Retrovirus K (HERV-K) und das feline Leukämievirus (FeLV). Letzteres bewirkt Immundefizienzen und Leukämie in Katzen und ähnelt in den ausgelösten Symptomen stark dem durch HIV induzierten *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) bei Menschen^{11,12}. Durch die Entwicklung von Impfstoffen gegen FeLV erhofft man sich, diejenigen Faktoren in Erfahrung zu bringen, die bei der Herstellung von antiretroviralen Impfstoffen – besonders gegen HIV – helfen können.

Für CKS-17 und die immunsuppressive Domäne des gp41 von HIV-1 (HIV-Isu) konnte in zahlreichen Versuchen die Inhibition der Lymphozyten-Proliferation *in vitro* nachgewiesen

werden^{9,10,13,14,15}. Ebenfalls wurde eine erhöhte Produktion von Interferon- α (IFN- α) sowie des Makrophagen inhibierenden Interleukins 10 (IL-10) und eine verminderte Produktion des die T-Zell-Proliferation stimulierenden IL-2 ermittelt^{16,17}. Diese Auswirkungen zeigten sich, wenn z.B. HIV-Isu an ein Carrier-Protein wie BSA gebunden wird⁹ bzw. wenn CKS-17 als Dimer vorliegt¹⁸. Die 17 Aminosäuren langen Isu-Peptide allein wirkten dagegen nicht immunsuppressiv^{9,18}. Die für das Isu-Peptid *in vitro* nachgewiesenen Auswirkungen (erhöhte IL-10- und IFN- α -Produktion, verringerte IL-2-Produktion) werden auch bei Personen festgestellt, die mit HIV infiziert sind.

Eine weitere Eigenschaft der immunsuppressiven Domäne ist ihre Homologie zu den Klasse-I-Interferonen^{19,20} (Abb. 1-3), die an den aus IFN- α R1 und IFN- α R2 bestehenden Rezeptor binden. Auch IFN- α selbst sowie ein Decapeptid aus IFN- α , das homolog zur Isu-Domäne von p15E ist, hat immunsuppressive Auswirkungen²¹. Die Isu-Domäne könnte also durch Interaktion mit dem Interferon-Rezeptor wie ein Interferon selbst wirken²².

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

Abb. 1-3: Sequenzhomologien zwischen Isu-Domänen verschiedener Retroviren und unterschiedlichen Interferonen²²

Umrandete und grau hinterlegte Aminosäuren sind identisch mit denen der Isu-Domäne von FeLV, MuLV und PERV-A, umrandete Aminosäuren zeigen konservierte Aminosäureaustausche (R=K, L=I=V, F=Y). FeLV – felines Leukämievirus, MuLV – murines Leukämievirus, PERV – porcines endogenes Retrovirus, TP – Trophoblastenprotein.

1.3. Porcine endogene Retroviren

Porcine endogene Retroviren (PERVs) gehören zu den γ -Retroviren. Anhand von Sequenzunterschieden im *env*-Gen lassen sich diese in PERV-A, PERV-B und PERV-C einteilen, wobei die ersten beiden Subtypen humane Zellen *in vitro* infizieren können^{23,24,25}. Dies ist besonders im Zusammenhang mit der Xenotransplantation von Schweineorganen in den Menschen von Bedeutung. Durch den Mangel an Organen wurde nach Alternativen gesucht und in den Schweinen ein günstig zu haltender Organspender gefunden, der von der Anatomie der inneren Organe her dem Menschen ähnelt und der unter bestimmten Bedingungen niedrige Mengen an Mikroorganismen enthält. Allerdings sind PERVs im Genom aller Schweinerassen integriert^{26,27}. Bisher konnte zwar noch keine Übertragung *in vivo* festgestellt werden^{28,29,30}, jedoch besteht nach einer Transplantation das Risiko einer Infektion mit PERVs, was zu Tumoren und/oder einer Immundefizienz führen kann²².

Die in die Membran eingebetteten viralen Proteine sind bei PERV das Oberflächenhüllprotein gp70 und das transmembrane Hüllprotein p15E. Dieses enthält – wie HIV-1 – ein hydrophobes Fusionspeptid zur Verankerung in der Wirtszellmembran. Außerdem besteht es aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Helixregion sowie einer Transmembrandomäne. Am C-terminalen Ende der N-terminalen Helix befindet sich die Isu-Domäne³⁰.

1.4. Das humane endogene Retrovirus K

Das humane endogene Retrovirus K (HERV-K) gehört zu den Klasse-II ERVs. Diese sind phylogenetisch mit den β -Retroviren verwandt³¹. Von den humanen endogenen Retroviren ist die HERV-K-Familie mit ihren 30 bis 50 Proviren die einzige der HERVs, in der für alle viralen Proteine *open reading frames* erhalten geblieben sind^{32,33}. Letztere sind durch Mutationen jedoch zumeist fehlerhaft. Zur Expression von HERV-K-Genen kann es durch Zytokine und Hormone sowie durch UV-Strahlung kommen^{34,35}. Virale Proteine konnten in Teratokarzinomen^{36,37} und Melanomen^{38,39,40} nachgewiesen werden. Infektiöse HERV-K-Partikel sind bisher noch nicht festgestellt worden.

Aufgrund der Expression von HERV-Ks in Krebspatienten ist es denkbar, dass das transmembrane Hüllprotein von HERV-K (gp36) einen immunsupprimierenden Effekt auf das menschliche Immunsystem hat. Untersuchungen zu diesem Thema wurden bereits begonnen⁴¹.

1.5. Natives und adaptives Immunsystem

1.5.1. Das native Immunsystem

Der menschliche Körper verfügt über zwei Abwehrstrategien gegen Pathogene: Das native und das adaptive Immunsystem.

Das native (angeborene) Immunsystem ist die erste Barriere gegen Mikroorganismen. Dazu gehören physikalische Barrieren wie Haut und Schleimhäute sowie in den Epithelien produzierte antimikrobielle Moleküle (Defensine, Cathelicidine). Die zellulären und chemischen Abwehrmechanismen richten sich gegen generelle Eigenschaften von Mikroorganismen wie doppelsträngige RNA-Moleküle oder Lipopolysaccharide. *Pattern recognition receptors* wie Toll-like-, Mannose- oder N-formyl-methionyl-Rezeptoren sorgen für die Erkennung von Molekülen, die spezifisch für Viren, Bakterien und Pilze sind.

Phagozyten (Makrophagen, Neutrophile) und natürliche Killerzellen sowie Proteine (Complement-Faktoren und Cytokine) sorgen für die Abtötung der Pathogene. Die aus Stammzellen des Knochenmarks entstandenen Makrophagen erkennen Mikroben über Zelloberflächenproteine und phagozytieren diese. Anschließend produzieren sie zu deren Abtötung Lysozyme sowie reaktive Sauerstoffmoleküle (*reactive oxygen species*, ROS) und Stickoxide. Durch die Sekretion von Cytokinen (z.B. Tumor-Nekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1)) veranlassen sie Endothelzellen zur Produktion von Selektinen, die es den im Blut befindlichen Leukozyten (z.B. Neutrophilen, Monocyten) ermöglichen, an diese zu binden. Interleukin-1 und TNF induzieren in Makrophagen und Endothelzellen ebenfalls die Bildung von Chemokinen, die die Leukozyten zur Wanderung zwischen den Epithelzellen hindurch zur Infektion veranlassen.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zu den Lymphozyten, sind jedoch weder B- noch T-Lymphozyten. Sie haben aktivierende und inhibierende Rezeptoren auf der Oberfläche, so dass Zellen, die sowohl den Liganden für NK-Zellen als auch ein inhibitorisches Peptid exprimieren, nicht zerstört werden. Wird jedoch in Zellen die Expression von Klasse-I-Molekülen des *major histocompatibility complex* (MHC) inhibiert (z.B. in Tumorzellen oder durch eine Infektion mit einem Virus), wird die NK-Zelle aktiviert. Auch das von Makrophagen produzierte Zytokin IL-12 sowie die Typ-I-Interferone Interferon- α (IFN- α) und IFN- β aktivieren die cytotoxischen Eigenschaften der natürlichen Killerzellen. Diese initiieren durch die Ausschüttung von Granzymen die Apoptose der infizierten Zelle.

Das Komplement-System besteht aus Serumproteinen, die Mikroben anhand von Oberflächenstrukturen, gebundenen Antikörpern oder durch Mannose-bindendes Lectin erkennen. Daraufhin werden weitere Komplement-Proteine rekrutiert, die zur Opsonisierung von Mikroorganismen, zur Aktivierung von Leukozyten und zur Bildung eines die Zelle lysierenden *membrane attack complex* führen.

1.5.2. Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Immunantwort reagiert nicht so schnell auf Mikroorganismen, wie es bei den Mechanismen des angeborenen Immunsystems der Fall ist. Dafür ist die Immunantwort jedoch spezifischer.

Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems gehören Antigen präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APC) und Lymphozyten. Letztere sind in T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen gegliedert. B- und T-Zellen entstehen aus Stammzellen im Knochenmark.

Die B-Lymphozyten bilden dort Antikörper, integrieren diese in ihre Plasmamembran und wandern in die Milz, wo sie reifen. Anschließend bewegen sie sich in die Lymphfollikel der Lymphknoten. Bindet dort eine T-Helferzelle an diesen Antikörper und aktiviert die B-Zelle, differenziert diese dann zur Gedächtnis- oder zur Antikörper produzierenden Plasmazelle. Plasmazellen wandern zum großen Teil ins Knochenmark und bilden dort verschiedene Immunglobuline (Ig). Mit IgG markierte Mikroben und Toxine werden daran gehindert, in Zellen einzudringen (sie werden neutralisiert) und für die Phagozytose markiert. Natürliche Killerzellen erkennen IgG und lysieren markierte Wirtszellen. Durch die Antikörper IgG, IgM und IgA wird das Komplement-System aktiviert. IgE stimuliert Mastzellen zur Sekretion von Granula bei allergischen Reaktionen.

Während B-Zellen in der Milz reifen, geschieht dies bei den T-Zellen nach ihrer Wanderung in den Thymus. Reife Lymphozyten gelangen ins Blut. Diese so genannten naiven Lymphozyten teilen sich nicht und haben keine Funktion – bis sie auf Antigene treffen. Damit die Zellen, die nach ein bis drei Monaten sterben, bei einer ausbleibenden Infektion nicht verschwinden, sind IL-7 und der B-Zell-aktivierende Faktor BAFF für deren Überleben nötig. Im Vergleich zur Gesamtheit der Lymphozyten ist die Zahl der naiven Lymphozyten sehr gering. Daher werden die Antigene durch APCs in speziellen Organen konzentriert. Dazu präsentieren dendritische Zellen nach der Phagozytose eines Mikroorganismus dessen hydrolysierte Proteine (Antigene) an MHC-Moleküle gebunden auf der Zelloberfläche und

wandern zu den Lymphknoten bzw. zur Milz und bleiben dort. Von den vorbei fließenden T- bzw. B-Lymphozyten können diejenigen mit den passenden Rezeptoren nun an die Antigene auf den dendritischen Zellen binden. Die dadurch aktivierten Lymphozyten (Lymphoblasten) entwickeln sich zu Effektorzellen, zu denen T-Helferzellen, cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) und Antikörper-produzierende B-Zellen gehören.

Nach der klonalen Selektionstheorie^{42,43} entsteht eine große Zahl Lymphozyten mit unterschiedlichen Antigen-Rezeptoren. Erkennt ein Lymphozyt ein präsentiertes Antigen wird er aktiviert und vervielfältigt. Dabei kann die Zahl der T-Zellen auf das 50000fache und die Zahl der B-Zellen auf das 5000fache ansteigen.

Lymphozyten können anhand spezifischer Oberflächenproteine, genannt *cluster of differentiation* (CD), unterschieden werden. Durch eine Infektion des Wirtes mit Bakterien, Viren oder bestimmten Parasiten wird in Makrophagen und natürlichen Killerzellen die Sekretion von IL-12 und IFN- γ induziert, die dann zur Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu T_H1-Zellen führt. Diese werden durch Chemokine zum Ort der Infektion geleitet und wandern zwischen den Endothelzellen hindurch ins infizierte Gewebe (siehe auch 1.5.1). Dort bewirken sie die Entwicklung von Monocyten zu Makrophagen und aktivieren diese durch IFN- γ und direkten Zellkontakt über das Klasse-II-MHC-Protein. Diese töten die phagozytierten Mikroorganismen, sorgen für die Entfernung toter Zellen und leiten über Wachstumsfaktoren die Erneuerung körpereigener Zellen ein.

Die Entwicklung von T_H2-Zellen wird durch IL-4 induziert. Sie sind für die Bekämpfung von Helminthen zuständig, die wegen ihrer Größe nicht von Makrophagen phagozytiert werden können. Daher stimulieren T_H2-Zellen über IL-4-Sekretion die Bildung von IgE, die an diese Pathogene binden. Über IL-5 aktivieren sie Eosinophile, die durch Ausschüttung bestimmter Proteine Helminthen abtöten. T_H2-Zellen stehen auch im Zusammenhang mit allergischen Reaktionen.

Zu den Effektorzellen gehören auch die CD8⁺ cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs). Diese erkennen an Klasse-I-MHC-Moleküle gebundene Antigene auf körpereigenen Zellen und binden daran. Dadurch wird die CTL aktiviert und zur Ausschüttung eines Komplexes aus Granzymen, Perforin und Serglycin angeregt. Durch das Perforin gelangt der Komplex in die Zielzelle, wo Granzyme deren Apoptose einleiten.

Nach der Aktivierung durch Antigene entwickeln sich einige B- und T-Zellen zu Gedächtniszellen, die eine Lebensdauer von mehreren Jahre haben. Sie sind effektiver als naive Lymphozyten, da sie für ein Antigen spezifisch sind und darauf schneller reagieren.

1.5.3. Regulatorische T-Zellen

Natürliche regulatorische T-Zellen (Tregs) gehören zu den CD4⁺ T-Zellen und entwickeln sich wie die übrigen T-Zellen im Thymus⁴⁴. Ihre Existenz wurde bereits 1971 postuliert⁴⁵ (damals Suppressor-T-Zellen genannt); ein Nachweis gelang jedoch erst 1995, als festgestellt wurde, dass von regulatorischen T-Zellen das Oberflächenprotein CD25, die α -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors, hoch exprimiert wird und somit als Marker genutzt werden kann⁴⁶.

Ein weiterer Marker für regulatorische T-Zellen ist der intrazelluläre Transkriptionsfaktor Forkhead Box Protein 3 (FoxP3)^{47,48,49}, der der präziseste Marker für Tregs ist⁴⁸. Auch der Glukocorticoid-induzierte Tumornekrosefaktor-Rezeptor (GITR), Ox40, HLA-DR⁵⁰ sowie eine reduzierte Expression des Interleukin-7-Rezeptors CD127⁵¹ dienen als Marker, doch sind diese nicht so spezifisch wie FoxP3, da durch sie die Tregs von aktivierten Effektor oder Memory-T-Zellen nicht vollständig unterschieden werden können.

FoxP3 besteht aus der gegabelten („forkhead“) DNA-Bindedomäne am C-Terminus sowie einer Cys₂His₂-Zinkfinger-Domäne und einem *coiled coil* Leucin-Zipper-Motiv. Ohne den Transkriptionsfaktor könnten sich die CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen nicht bilden⁴⁸. FoxP3-defiziente Menschen entwickeln eine Krankheit, die IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*), die mit Diabetes Typ 1, Allergien und *inflammatory bowel disease* (IBD) einhergeht⁵².

FoxP3 wird auch in naiven CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen peripherer Blutgefäße nach Induktion durch TGF- β oder Stimulation mit Antigenen gebildet, wobei die T-Zellen dann die Funktion von Tregs übernehmen („adaptive“ / „induzierbare“ Tregs)^{53,54,55}. Diese reagieren allerdings nur auf diejenigen Antigene, durch die sie induziert wurden.

Bei Mäusen und gesunden Menschen beträgt der Anteil der CD4⁺ CD25⁺ Zellen an den CD4⁺ Zellen 5-10 %^{47,56}. Durch Entfernen der CD4⁺ CD25⁺ Tregs konnte festgestellt werden, dass ohne diese einige Autoimmunkrankheiten entstehen, die durch nachträgliche Applikation von Tregs wieder rückgängig gemacht werden können^{46,57}. Auch die Immunreaktionen auf Tumore und transplantierte Organe konnten durch die Veränderung des Anteils an Tregs

beeinflusst werden^{58,59}. Tregs sekretieren die entzündungshemmenden Zytokine IL-10 und *transforming growth factor-β* (TGF-β). Sie supprimieren andere T-Zellen durch direkten Zellkontakt. Dabei interagiert das auf der Oberfläche der regulatorischen T-Zellen befindliche cytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4 (CTLA4) mit B7 auf der Antigen präsentierenden Zelle (Abb. 1-4). Diese wird zur Bildung der Indolamin-2,3-dioxygenase angeregt und baut Tryptophan ab, was zusammen mit entstehenden Abbauprodukten die Proliferation von T-Helferzellen und cytotoxischen T-Zellen inhibiert.

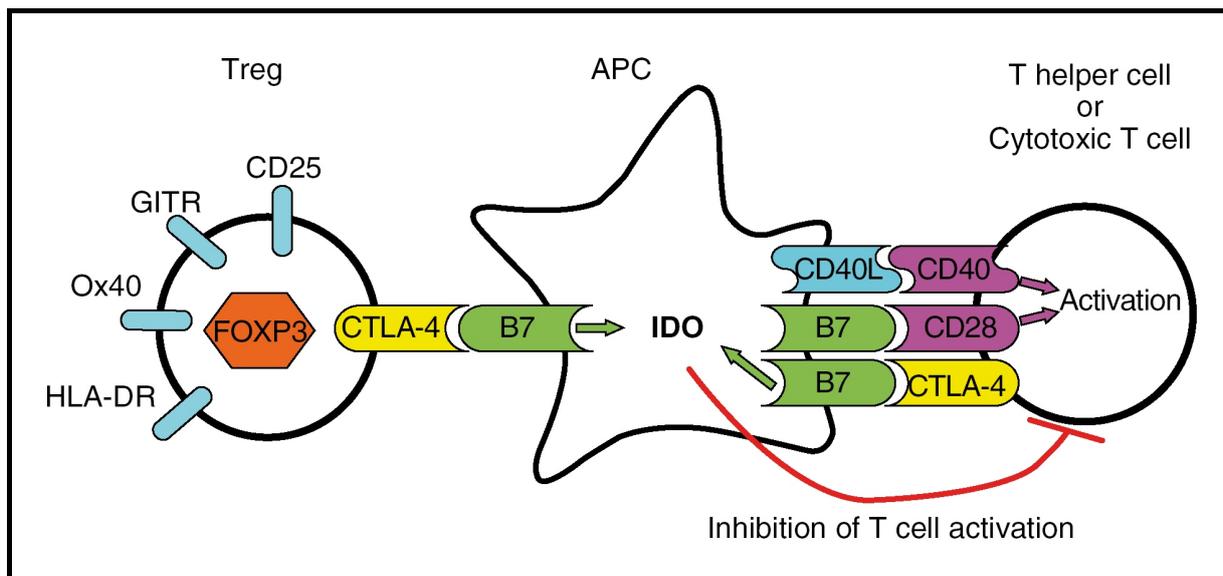


Abb. 1-4: Inhibition der T-Zell-Aktivierung durch Tregs⁶⁰.

Über die CD40L-CD40- sowie die B7-CD28-Interaktion aktiviert die Antigen-präsentierende Zelle (APC) T-Lymphozyten. Tregs inhibieren diese Aktivierung durch Induktion von IDO über die CTLA4-B7-Interaktion. CTLA4 wird auch von aktivierten T-Zellen exprimiert.

2. Zielsetzung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob retrovirale transmembrane Hüllproteine (TM-Proteine) in der Lage sind, regulatorische T-Zellen (Tregs) zu aktivieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass retrovirale TM-Proteine eine immunsupprimierende Wirkung haben. Wurden auf Tumorzellen TM-Proteine verschiedener Retroviren exprimiert, konnte eine Abstoßung durch das Immunsystem verhindert werden, wobei Tregs involviert waren. Die Expression des TM-Proteins des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K TM) in humanen Teratokarzinomen und Melanomen wirft die Frage auf, ob auch hier eine Immunsuppression ausgelöst wird und Tregs induziert werden. Auch soll untersucht werden, ob infektiöse Retroviren wie das humane Immundefizienzvirus (HIV) und das murine Leukämievirus (MuLV) sowie porcine endogene Retroviren (PERVs) Tregs induzieren.

Dazu sollen die TM-Proteine von HERV-K und PERV rekombinant in der Hefe *Hansenula polymorpha* hergestellt werden, um den Einfluss bakterieller Endotoxine auszuschließen. Im Falle von HIV und MuLV soll ein synthetisches Peptid, das der sogenannten Isu-Domäne entspricht, untersucht werden. Hierbei wird ein Heteropolymer aus beiden Isu-Domänen verwendet.

Zur Untersuchung werden die retroviralen Proteine mit humanen PBMCs inkubiert. Anschließend sollen die Zellen mit Antikörpern gegen die Marker von Tregs – CD4, CD25 und FoxP3 – markiert werden. Mittels Durchflusszytometrie soll der Anteil an Tregs bestimmt werden. Zusätzlich wird die Menge an gebildetem IL-10 im Kulturüberstand mittels ELISA ermittelt. Durch Isolation der RNA aus den PBMCs und anschließender quantitativer Real-Time PCR wird die Veränderung des mRNA-Transkriptionslevels von FoxP3, IL-10 und Interferon- α 1 bestimmt. Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zur Charakterisierung der immunsuppressiven Eigenschaften retroviraler Hüllproteine erbracht werden.

3. Material

3.1. Antikörper und Seren

Name	Herkunft / Firma	Verdünnung
<u>Fluorochrom-Konjugate</u>		
Anti-CD3-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich	5 µl / 1,8 x 10 ⁶ Zellen
Anti-CD4-APC	Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland	5 µl / 1,8 x 10 ⁶ Zellen
Anti-CD4-APC	eBioscience, Cornerstone, USA	5 µl / 1,8 x 10 ⁶ Zellen
Anti-CD8a-APC	eBioscience, Cornerstone, USA	5 µl / 1,8 x 10 ⁶ Zellen
Anti-CD8a-PE	eBioscience, Cornerstone, USA	5 µl / 1,8 x 10 ⁶ Zellen
Anti-CD25-PE	eBioscience, Cornerstone, USA	5 µl / 1,8 x 10 ⁶ Zellen
Anti-CD25-PE	BD Biosciences, San Jose, USA	5 µl / 1,8 x 10 ⁶ Zellen
Anti-CD25-PE	Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland	5 µl / 1,8 x 10 ⁶ Zellen
Anti-FoxP3-FITC	eBioscience, Cornerstone, USA	5 µl / 1,8 x 10 ⁶ Zellen
<u>Primärantikörper</u>		
Penta-His-Antikörper	Qiagen, Hilden, Deutschland	0,2 µg/ml (WB)
Ziegenserum (ZS) 16	AG Dr. Denner, RKI, immunisiert mit PERV p15E	1:1000 (WB)
Ziegenserum (ZS) 20	AG Dr. Denner, RKI, immunisiert mit PERV p15E; Fiebig et al., 2003	1:1000 (WB)
<u>Sekundärantikörper</u>		
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	1:3000 (WB)
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	1:3000 (WB)

3.2. Chemikalien

Chemikalie	Firma
5 x Sequenzierungspuffer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid-Lösung Rotiphorese [®] Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Standard	Pierce, Rockford, USA
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bacto-Pepton	BD Diagnostic Systems, Sparks, USA
BigDye [®] -Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Chemikalie	Firma
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G-250	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAB (3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydro- chlorid-dihydrat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dNTP-Mix, 10mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Entwickler G153	Agfa, Köln, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol reinst	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid hydrochlorid (EDC)	Pierce, Rockford, USA
FKS (fötales Kälberserum, 10 %)	PAA, Pasching, Österreich
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Guanidin-hydrochlorid, 99,5 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES-Puffer (1 M)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Inositol (myo-Inositol)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin (200 mM, Low Endotoxin)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lymphocyte Separation Medium	PAA, Pasching, Österreich
Magermilchpulver Sucofin	TSI GmbH, Zeven, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂ , 25 mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
3-(n-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
N-Hydroxysulfosuccinimid	Pierce, Rockford, USA
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ni-NTA Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
Nonidet™ P-40 (NP-40)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 0.1 μ g/ μ l	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Orange G	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PCR-Puffer (10 x)	Roche, Mannheim, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (10000 U / 10000 μ g/ μ l)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Chemikalie	Firma
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rapid Fixierer G354	Agfa, Köln, Deutschland
RNase-freies Wasser	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold™, 5 U/μl)	Roche, Mannheim, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	USB Corporation, Cleveland, USA
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tricin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TrisHCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau (0.4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserbadkonservierer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Yeast Nitrogen Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

3.3. Geräte

Gerät	Firma
96 Plate Washer™	Tecan, Crailsheim, Deutschland
accu-jet® (Pipettierhilfe)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Agarosegel-Kammer Mini Sub® Cell GT	BioRad, München, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Sanyo MCO-20AIC	Sanyo Biomedical, Ewald Innovations-technik GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Duomax 1030 (Wippe)	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
ELISA Reader Spectra Classic	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln, Deutschland
FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, USA
Fraktionssammler für Säulenchromatographie: Pharmacia Biotech SuperFrac Fraction Collector	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland
GelDoc 2000	BioRad, Hercules, USA
IKA-Vibrax-VXR Schüttler	Janke&Kunkel, IKA® Labortechnik, Staufen, Deutschland
Kodak X-Omatic Cassette	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kühlzentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop ID 03	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland

Gerät	Firma
Mikrowelle Micro-Chef FM B930	Moulinex, Deutschland
Mx4000 [®] Multiplex Quantitative PCR System	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
NanoDrop [®] Spectrophotometer ND-1000	peQLab, Erlangen, Deutschland
pH Meter MP 220	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipetus [®] -akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Power Pac 200 bzw. 300	BioRad, München, Deutschland
Pumpe für Säulenchromatographie	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland
Pharmacia Biotech Pump P-1	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Schüttelwasserbad GFL 1083	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Schüttler Sartorius Certomat IS	Amersham / GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
SDS-Gelkammer Hoefer-SE 250	Thermo Electron Corporation (Kendro), Langenselbold, Deutschland
Sterilbank Herasafe KS12	The Baker Company, Sanford, USA
Sterilbank SterilGARD, Class II Type A / B3 Biological Safety Cabinet	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ThermoStat Plus (Thermomixer)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5415D	BioRad, München, Deutschland
Trans-Blot SD [®] Semi-Dry Transfer Cell	Janke&Kunkel, IKA [®] Labortechnik, Staufen, Deutschland
VF2 (Vortexer)	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Vortex Genie 2	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage Sartorius Excellence E2000D	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Wasserbad	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zählkammer Neubauer Improved	Thermo Electron Corporation (Kendro), Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Electron Corporation (Kendro), Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Sepatech Minifuge RF	

3.4. Kommerzielle Kits

Kit	Firma
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
BD OptEIA™ Human IL-10 ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham / GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience, Cornerstone, USA
Quanti Tect Gene Expression Assays IL-10	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System	Invitrogen, Carlsbad, USA
TaqMan Gene Expression Assays IFN-α1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

3.5. Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
<u>Hefen</u> Induktionsmedium	2 % Bacto-Pepton 2 % Methanol 1 % Hefeextrakt 15 µg/ml Kanamycin 15 µg/ml Inositol
Minimalmedium	2 % Glucose 0,67 % Yeast Nitrogen Base 15 µg/ml Kanamycin 15 µg/ml Inositol
Vollmedium	2 % Bacto-Pepton 2 % Glucose 1 % Hefeextrakt 15 µg/ml Kanamycin 15 µg/ml Inositol
Vollmedium-Agarplatten	Vollmedium 2 % Agar-Agar
<u>PBMCs</u> PBMC-Nährmedium	RPMI-Medium 1640 (500ml) 10 % FKS 2 % L-Glutamin 1 % HEPES 1 % SP (Streptomycin, Penicillin) à 10 mg/ml bzw. à 10000 U (100 µg/ml Endkonzentration)

3.6. Peptide

Peptid	Aminosäure-Sequenz	Herkunft
HIV-Isu	H-KQLQARILAVERYLKDQQL-NH ₂	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Deutschland
MuLV-Isu	H-LQNRRLGLDLLFLKEGGL-OH	Multiple Peptide Systems, San Diego, USA

3.7. Primer und Sonden

Name	5'-3'-Sequenz	Fragmentgröße [bp]
FoxP3-Real-for	CGACCCCCTTTCACCTACGCC	150
FoxP3-Real-rev	GGATGGCGTTCTTCCAGGTGGC	
FoxP3-Sonde	6Fam -TCCGCTGGGCCATCCTGGAGGCTC-3BQ1	149
GAPDH for	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	
GAPDH rev	TGGTCCACACCCATGACGA	
GAPDH-Sonde	HEX-CTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGG- BHQ1	
HERV-TM NotI for	CGATGCGGCCCGCTAGCAGGAGTTGCATTGCAC	480
HERV-TM BglIII rev	GCTAAGATCTTTACGTAGTACTTCCAATGGTCTTA	
SV 215 PFMD for	TCTCTCAGAGAGGGGAATGG	
SV 216 Mox rev	TTCTCAAAGCGGTATGTCC	
PERV TM rev	GGTAGATCTTCAGTTGAACCATCCTTCAAA	

Sonde und Primer für die quantitative IL-10-Real-Time PCR sowie SV 215 und SV 216 stammen von Qiagen, Hilden, Deutschland. Die IFN- α 1-Primer und die Sonde wurden von Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland bezogen. Alle übrigen Primer und Sonden wurden bei Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland bestellt.

3.8. Puffer

Puffer	Zusammensetzung
PBS	136,9 mM NaCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2

Agarosegelelektrophorese

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

Puffer	Zusammensetzung
50 x TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Eisessig 50 mM EDTA
<u>Intra- und extrazelluläres Färben von PBMCs</u>	
Puffer F	PBS, 2 % (v/v) Formaldehyd
Puffer P	PBS, 0,2 % (v/v) Tween20
Puffer W	PBS, 2 % FKS
<u>Lyse von Hefezellen</u>	
Cracking Buffer	8 M Harnstoff 5 % SDS 2,5 % Bromphenolblau
Lysepuffer 1 (LP 1)	2 % Triton X-100 1 % SDS 100 mM NaCl 20 mM Tris 1 mM EDTA, pH 6,8
Lysepuffer 2 (LP 2)	10 mM MOPS, pH 6,8 1 % SDS 8 M Harnstoff 10 mM EDTA
Lysepuffer 3 (LP 3)	10 mM TrisHCl, pH 8,0 1 % SDS 8 M Harnstoff 10 mM EDTA
Lysepuffer 4 (LP 4)	2,5 M LiCl 50 mM TrisHCl, pH 8,0 4 % Triton X-100 62,5 mM EDTA
Lysepuffer 5 (LP 5)	150 mM NaCl 50 mM TrisHCl, pH 8,0 0,1 % NP-40 1 % Complete
<u>Nickel-Affinitätschromatographie</u>	
Bindepuffer B	8 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris, pH 8,0 0,3 % SDS
Waschpuffer C	8 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris, pH 6,3

Puffer	Zusammensetzung
Elutionspuffer E	8 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris, pH 4,5
<u>SDS-PAGE</u>	
Anodenpuffer	200 mM Tris, pH 8,9
Gelpuffer	3 M TrisHCl, pH 8,4 0,3 % SDS
Kathodenpuffer	100 mM Tris, pH 8,25 100 mM Tricin 0,1 % (w/v) SDS
Probenpuffer	50 mM TrisHCl, pH 6,8 12 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol 4 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
<u>Western Blotting</u>	
Blockierungspuffer	PBS 5 % Milchpulver 0,05 % Tween20
Transferpuffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol 1,875 ml 20 %iges SDS
Waschpuffer	PBS, 0,05 % Tween20

3.9. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
96-well-Platten (ELISA), Microlon	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Blotting-Filterpapier	peQLab, Erlangen, Deutschland
CL-Xposure™ Clear Blue X-Ray Film	Pierce, Rockford, USA
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Einmalspritze 20 ml	BBraun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Falcon® Flexible Plate, 96 Well, (Proteinkonzentrationsbestimmung)	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich
Gasperlen, 250-500 µm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Immobilon™ Transfer Membran, 0,2 µm	Millipore, Eschborn, Deutschland
Impföse, 1 µl	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Verbrauchsmaterial	Firma
Kanüle Sterican Gr. 1	BBraun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Leucosep [®] -Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Nunclon [™] delta Surface 96-Well-Platte (Zellkultur)	Nunc A/S Roskilde, Dänemark
Optical Cap 8x Strip	Stratagene, Cedar Creek, USA
Parafilm [®] M	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
PCR SoftStrip 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter	nerbe plus, Gesellschaft für medizinische und labortechnische Einmalartikel mbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Plastibrand [®] Einmal-Küvetten, PS	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Plastibrand [®] Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
RNase-free Microfuge Tubes	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Röhrchen für Hefe-Flüssigkulturen, PP	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten à 1, 5, 10 und 25 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Spectra/Por [®] Biotech Cellulose Ester	Spectrum, Los Angeles, USA
Dialysis Membrane, MWCO 1000	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Sterilfilter FP30/0,2 CA-S Rotring	Stratagene, Cedar Creek, USA
Strip Tube 8 x 0,2 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Vacutainer [®] Brand Safety-Lok [™] Blood Collection Set	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Vacutainer [®] Tube Sodium Heparin	Serva, Heidelberg, Deutschland
VISKING [®] Dialysis Tubing, MWCO 12-14 kDa	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflasche Standard 150 cm ²	TPP [®] (Techno Plastic Products AG), Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP [®] (Techno Plastic Products AG), Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen, PP, 15 und 50 ml	

3.10. Hefe

Zur Gewinnung der rekombinanten Proteine HERV-K TM und PERV p15E wurde *Hansenula polymorpha* RB11 verwendet. Dieser Stamm besitzt eine Uracil-Auxotrophie, die durch die Transfektion des Vektors pFPMT121⁶¹ (Abb. 3-1) aufgehoben wird. Zwischen dem MOX-Promotor und dem MOX-Terminator befindet sich eine *multiple cloning site* (MCS), in die die DNA-Sequenz von HERV-K TM bzw. PERV p15E eingebaut ist. Außerdem liegen dort die Sequenzen für einen His₆-Tag zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins, für den *mating factor* α (MF α), der die Sekretion von HERV-K TM bzw. PERV p15E auslösen soll,

und für eine *thrombin cleavage site* (TCS) zum Entfernen der His-Tags. Durch Kultivierung der Hefezellen in Glucose bzw. Methanol kann der MOX-Promotor inhibiert bzw. aktiviert und somit die Expression der genannten Proteine reguliert werden. Zur Integration von pFPMT121 in die genomische DNA enthält der Vektor die *Hansenula polymorpha* *autonomously replicating sequence 1* (HARS1).

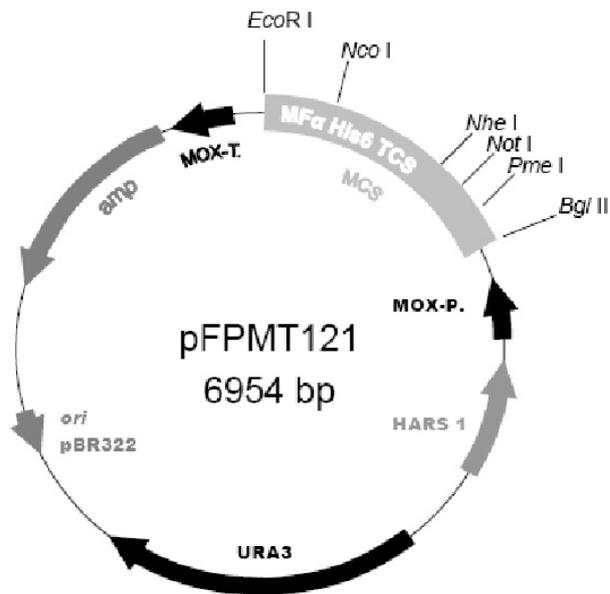


Abb. 3-1: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pFPMT121-MF α -His₆-TCS

Hefezellen welche die DNA-Sequenz von HERV-K TM stabil ins Genom integriert hatten bzw. die den Vektor pFPMT-MF α -His₆-PERV-TM mit der Sequenz von PERV p15E enthielten, waren in der Arbeitsgruppe Dr. Denner bereits gewonnen worden.

4. Methoden

4.1. Arbeiten mit Hefen

4.1.1. Vermehrung von *Hansenula polymorpha*

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 3 ml Minimalmedium per Impföse mit einer Glycerin-Kultur bzw. einer Hefekolonie angeimpft und einen Tag bei 37 °C und 230 rpm geschüttelt. Nicht sofort benötigte Anteile der Vorkultur wurden zur späteren Verwendung bis zu sechs Monate bei 4 °C gelagert.

Zur Herstellung rekombinanter Proteine wurden 200 µl Vorkultur in 4 ml Minimalmedium gegeben. Das Volumen des Kulturmediums wurde anschließend auf die gewünschte Menge schrittweise vergrößert. Vor der Vermischung mit frischem Medium wurde stets ein Aliquot durch das Mikroskop auf Bakterienkontamination untersucht. Damit eine ausreichende Belüftung gewährleistet war, wurden Röhrchen bzw. Erlenmeyerkolben gewählt, die ein vier- bis fünfmal höheres Fassungsvermögen aufwiesen als die darin befindliche Hefekultur.

Die angewachsene Hefekultur wurde 5 min bei 700 x g zentrifugiert und das Pellet im Induktionsmedium resuspendiert. Das darin enthaltene Methanol induzierte den Mox-Promotor und aktivierte somit die Expression des gewünschten Proteins. Die Inkubationszeit betrug 24 h.

4.1.2. Integration des Vektors pFPMT121 ins Hefegenom

Nach der Transfektion des Vektors pFPMT121 wurden einige Hefezellkolonien gepickt und abwechselnd in Voll- und Minimalmedium kultiviert. Wenn sich die Zellen im Vollmedium teilten, konnten nur diejenigen Zellen überleben, die den Vektor mit dem darauf befindlichen *ura3*-Gen enthielten, da der *Hansenula polymorpha*-Stamm RB11 Uracil nicht bilden kann. Damit nach einer Teilung beide Tochterzellen überleben konnten, musste der Vektor durch Rekombination stabil ins Genom integriert werden. Dies wurde durch die *Hansenula polymorpha autonomously replicating sequence 1* (HARS1) unterstützt. Auf diese Weise wurden nach sechsmaligem Wechsel des Mediums Hefezellen mit ins Genom integriertem Vektor selektioniert.

4.1.3. Lyse von Hefezellen

Für die Lyse von Hefezellen wurden zwei verschiedene Methoden angewandt:

Lyse bei 37 °C

Nach der Induktion der Proteinexpression und einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 2800 x g wurden die Zellen in 1 ml Bindepuffer B pro Gramm Zellpellet für 24 h bei 37 °C geschüttelt. Am folgenden Tag wurde die Suspension 10 min bei 2800 x g zentrifugiert und der pH-Wert des Überstandes mit NaOH auf 8,0 eingestellt. Die Aufreinigung des Proteins aus dem Überstand erfolgte über eine Ni-NTA-Säule (siehe 4.4.7).

Lyse bei 4 °C

Die Hefezellen wurden 5 min bei 2800 x g zentrifugiert, mit 80 ml eisgekühltem bidestilliertem Wasser gewaschen und nach dem Abzentrifugieren des Wassers für mindestens 12 h bei -80 °C eingefroren. Durch das Einfrieren und Auftauen sollten die Zellwände geschädigt werden, um die Lyse zu unterstützen. Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und mit Bindepuffer B sowie Glasperlen im Verhältnis 1 : 4 : 0,6 fünf Minuten lang stark gevortext. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt befand sich das Protein mit dem His-Tag nun im Überstand und wurde über eine Ni-NTA-Matrix aufgereinigt (siehe 4.4.7).

4.1.4. Lagerung von Hefen über längere Zeit

Die Hefezellen wurden bei 4 °C bis zu 6 Monate aufgehoben. *Cryo Stocks* wurden durch Vermischung der Zellen mit sterilem, 100 %igem Glycerin (im Verhältnis 1 : 2) hergestellt und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2. Arbeiten mit DNA

4.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Durch das Aufkochen mit TAE-Puffer bilden die Bestandteile der Agarose – D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose – eine Matrix. Belädt man nach dem Erkalten des Gels die Geltaschen mit DNA-haltigen Lösungen und legt ein elektrisches Feld an, so wandert die DNA wegen der negativ geladenen Sauerstoff-Atome in den Phosphatgruppen zur Anode. In Abhängigkeit von Länge und Konformation wird das DNA-Fragment unterschiedlich stark von der Matrix gebremst, so dass die größten Fragmente am langsamsten laufen.

Zur Auftrennung der DNA wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele in der Agarosegel-Kammer Mini Sub[®] Cell GT [BioRad] gegossen. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von 8 V/cm Elektrodenabstand ausgesetzt. Als Größenstandard diente der O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix [Fermentas]. Zum Nachweis der DNA-Banden wurde das Gel 20 min in eine Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) gelegt. Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA und emittiert unter Einwirkung von UV-Licht (254 nm) sichtbares Licht. Das Abbild des Gels wurde mit der Geldoc 2000 [BioRad] digitalisiert.

4.2.2. DNA-Isolation aus Hefen

Zur Gewinnung der DNA wurden Hefezellkulturen (3 ml) 5 min bei 700 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal in 500 µl H₂O_{bidest} gewaschen, in 200 µl Lysepuffer 1 und 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) resuspendiert und mit 200 µl Glasperlen 30 sek stark gevortext. Die Suspension wurde 2 min bei 16.000 x g zentrifugiert und die obere DNA-haltige Phase durch eine Ethanol-fällung einkonzentriert. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und absolutem Ethanol im Verhältnis 1 : 0,1 : 2,5 vermischt. Es folgte eine Inkubation bei -20 °C für 20 min und eine Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C. Ein darauf folgender Waschschriff mit 1 ml 70 %igem Ethanol entfernte das Natriumacetat. Das DNA-Pellet wurde bei RT getrocknet und in 100 µl H₂O_{bidest} resuspendiert.

4.2.3. Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) lassen sich DNA-Fragmente amplifizieren⁶². Dazu werden die gewünschte DNA-Probe, Oligonukleotidprimer, die thermostabile DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) sowie Puffer und Nukleotide in einem PCR-Tube in den PCR-Cycler gestellt. Durch Erhitzung des Gemisches auf 95 °C (Denaturierung) werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen zerstört. Die *sense* und *antisense primer* werden so gewählt, dass sie *upstream* und *downstream* des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes mit den entstandenen DNA-Einzelsträngen hybridieren (*annealing*). Die dazu notwendige Temperatur hängt von der Sequenz der Primer ab. Zur Verlängerung zu neuen doppelsträngigen DNA-Molekülen fügt die Polymerase Nucleosidtriphosphate am 3'-Ende der Primer an. Die optimale Elongationstemperatur der *Taq*-Polymerase liegt bei 72 °C. Durch Wiederholung des Zyklus aus Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritt wird der gewünschte DNA-Abschnitt vervielfacht – theoretisch mit $X \cdot 2^n$ (X = Menge der Moleküle in der eingesetzten DNA-Probe, n = Zyklen).

Reaktionsansätze:

<u>Amplifikation von HERV-K TM</u>	
DNA (400 ng)	
Primer HERV-TM NotI for (10 pmol/μl)	0,50 μl
Primer HERV-TM BglIII rev (10 pmol/μl)	0,50 μl
MgCl ₂	0,50 μl
dNTPs	0,50 μl
10 x PCR-Puffer	2,50 μl
AmpliTaQ Gold (5 U/μl)	0,25 μl
H ₂ O	ad 25,00 μl

Amplifikation von pFPMT121

DNA (400 ng)	
Primer SV 215 (10 pmol/μl)	0,50 μl
Primer SV 216 (10 pmol/μl)	0,50 μl
MgCl ₂	0,50 μl
dNTPs	0,50 μl
10 x PCR-Puffer	2,50 μl
AmpliTaQ Gold (5 U/μl)	0,25 μl
H ₂ O	ad 25,00 μl

Amplifikation von PERV p15E

DNA (400 ng)	
Primer SV 215 (10 pmol/μl)	0,50 μl
Primer PERV TM (10 pmol/μl)	0,50 μl
MgCl ₂	0,50 μl
dNTPs	0,50 μl
10 x PCR-Puffer	2,50 μl
AmpliTaQ Gold (5 U/μl)	0,25 μl
H ₂ O	ad 25,00 μl

Temperaturprofil: 7' 95 °C; 40 x (60'' 95 °C, 45'' 48 °C, 45'' 72 °C); 5' 72 °C; ∞ 4°C

4.2.4. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung dient der Bestimmung der Nukleotidsequenz einer DNA-Probe. Hier wurde eine Sequenzierung nach einer erfolgreichen Klonierung durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich die DNA-Sequenz des Inserts durch Mutationen verändert hatte. Dazu wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger angewandt⁶³, bei der während einer PCR durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosidtriphosphaten wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe die Verlängerung der DNA-Zweitstrangsynthese abbricht. Aus den entstandenen DNA-Fragmenten wurde vom Sequenzier-Labor des Robert Koch-Instituts durch Kapillarelektrophorese und anschließende Fluoreszenzspektroskopie die DNA-Sequenz ermittelt. Diese konnte dann mit der DNA-Star-Software von LaserGene erfasst und mit der Originalsequenz verglichen werden.

Reaktionsansatz:

DNA (400 ng)	
Primer (10 pmol/μl)	0,5 μl
BigDye [®] -Mastermix	1,0 μl
5 x Puffer	1,5 μl
H ₂ O	ad 10,0 μl

Temperaturprofil: 90“ 96 °C; 25 x (10“ 96 °C, 5“ 48 °C, 4' 60 °C); ∞ 4 °C

Die Annealing-Temperatur war an die Primer SV 215 und PERV TM rev angepasst.

4.3. Arbeiten mit PBMCs

4.3.1. Isolation von humanen PBMCs aus Vollblut

Die Separation mononuclearer Zellen aus frischem, peripherem Blut erfolgte mittels LeucoSep[®] [greiner bio-one] und wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Das dabei benötigte Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll-Isopaque) wurde von PAA bezogen. Sollten nach der Zentrifugation des Blutes in Leucosep-Röhrchen noch Erythrozyten mit den PBMCs vermischt sein, wurden diese durch eine 20minütige Inkubation in 0,86 %igem Ammoniumchlorid bei 37 °C zerstört. Im Anschluss an die vorgegebenen Waschschrte wurde die Lebendzellzahl bestimmt.

4.3.2. Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot einer PBMC-Suspension mit 0,4 %igem Trypanblau [Sigma-Aldrich] im Verhältnis 1 : 1 vermischt. Bereits tote Zellen wurden durch den Farbstoff wegen Schäden an Zellmembranen intrazellulär blau gefärbt und bei der Zählung der PBMCs nicht berücksichtigt. Die gefärbte Zellsuspension wurde auf eine Neubauerzählkammer aufgetragen und aus der Anzahl der Zellen in den vier Zählfeldern der Mittelwert berechnet. Anhand folgender Formel wurde die Zellzahl berechnet:

$$N \text{ [Zellen/ml]} = \text{Mittelwert} \times 2 \times 10^4$$

[2 = Trypanblau-Verdünnung; 10^4 = Faktor der Neubauerzählkammer]

Die isolierten PBMCs wurden anschließend im PBMC-Nährmedium resuspendiert und dabei auf 3×10^6 Zellen/ml verdünnt.

4.3.3. Kultivierung von PBMCs

Die frisch isolierten PBMCs wurden im Brutschrank [Sanyo Biomedical] bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Dies erfolgte in Nunclon™ delta Surface 96-Well-Platten [Nunc]. Zu jeweils 100 µl Zellsuspension wurden 50µl PBMC-Nährmedium und 50 µl Protein-/Peptidlösung pipettiert, so dass eine Konzentration von $1,5 \times 10^6$ PBMCs/ml erreicht wurde. Die Zellen wurden stets in 40 µg/ml HERV-K TM oder in 62,5 µg/ml bzw. 100 µg/ml HIV-Isu-/MuLV-Isu-Heteropolymer inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation in PBMC-Medium.

Die Zeiträume der Inkubation variierten zwischen wenigen Stunden und 7 Tagen und sind im Ergebnisteil für jeden Versuch angegeben.

4.3.4. Markierung von PBMCs mittels Antikörpern

Nach der Inkubation der PBMCs (siehe 4.3.3) wurden diese für die durchflusszytometrische Untersuchung mit Antikörpern markiert. Zur späteren Kalibrierung der Kanäle des Durchflusszytometers wurden viermal ca. $1,8 \times 10^6$ der in Medium inkubierten Zellen den Mikrotiterplatten entnommen. Dagegen wurden von den mit HERV-K TM, HIV-Isu/MuLV-

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

4.3.5. Durchflusszytometrie

Zur Quantifizierung der Antikörper-markierten Proteine CD4, CD25 und FoxP3 wurden die PBMCs mittels Durchflusszytometrie am FACSCalibur [BD Biosciences] untersucht. Bei dieser Methode wird die Zellsuspension durch eine dünne Kapillare an einem Laser vorbeigeleitet, so dass nur jeweils eine Zelle von dem Laser bestrahlt wird. Detektoren registrieren dabei das reflektierte Licht. Trifft es auf eine Zelle, wird es zum einen gebeugt (*forward scatter*), wodurch auf die Zellgröße geschlossen werden kann. Zum anderen wird das Laserlicht je nach Oberflächenstruktur der Zelle gebrochen (*side scatter*). Durch diese beiden Messdaten können z.B. innerhalb der PBMCs Lymphozyten von Monozyten unterschieden werden.

Die mit Antikörpern konjugierten Fluoreszenz-Farbstoffe Allophycocyanin (APC), Phycoerythrin (PE) und Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC), mit denen die Proteine CD4,

CD25 und FoxP3 markiert wurden, werden durch den Laser angeregt und emittieren Licht einer für sie spezifischen Wellenlänge. Dadurch können mit einer Messung alle drei Proteine detektiert werden. Es wurden stets 3×10^5 Zellen gemessen. Mittels der Software CellQuest Pro [BD Biosciences] wurden die Daten verarbeitet und in Microsoft Excel aufbereitet. Dabei wurden für die Dreifachansätze der Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt.

4.3.6. IL-10-Zytokin-ELISA

Die Menge an Interleukin-10 (IL-10) im Überstand von PBMC-Kulturen, die mit HERV-K TM oder HIV-/MuLV-Isu inkubiert worden waren, wurde mit dem OptEIA™ Human IL-10 ELISA Set von BD Biosciences bestimmt. Bei diesem *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 100 µl *capture-antibody* in *coating buffer* 1:1 bei 4 °C inkubiert. Dann wurde jedes Well durchmischt, dreimal mit 300 µl Waschpuffer pro Well gewaschen und die Mikrotiterplatte auf Zellstoff ausgeschlagen, um Pufferreste zu entfernen. Nach einstündiger Inkubation mit 200 µl *assay diluent* pro Well wurden die drei Waschschritte wiederholt. Die Überstände aus der Inkubation mit PBMCs wurden aufgetaut und 100 µl pro Well aufgetragen. Als Standard wurden Verdünnungen von 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6, 7,8 und 0 pg/ml rekombinantes IL-10 pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Nach fünf Waschgängen wurde der *working detector*, der den *detection antibody* und Avidin-HRP enthielt, appliziert (100 µl/Well). Es wurde 1 h bei RT inkubiert, 7 x gewaschen (Einwirkzeit jeweils 30 sek) und die Substratlösung hinzugegeben (100 µl/Well). Nach 30 min in Dunkelheit und bei RT wurden 50 µl Stopplösung in jede Vertiefung pipettiert und die Absorption am ELISA Reader Spectra Classic [Tecan] bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Referenzwert: 560 nm). Durch den Vergleich mit der Kalibriergeraden konnte der IL-10-Gehalt der Proben bestimmt werden.

4.4. Arbeiten mit Proteinen

4.4.1. Polymerisierung von Peptiden

Zur Herstellung von Heteropolymeren aus HIV-Isu und MuLV-Isu wurden zu 2 ml PBS jeweils 4 mg Peptid, 38,4 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid hydrochlorid (EDC) und 2 mg N-Hydroxysulfosuccinimid hinzugegeben. Hierbei bindet das Carbodiimid

an die Carboxy-Gruppe des MuLV-Isu-Peptids und aktiviert es, weshalb dann dieses Zwischenprodukt mit der Aminogruppe eines weiteren Peptids reagieren kann⁶⁴ und unter Abspaltung von N,N-1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)harnstoff die Peptidbindung entsteht. N-Hydroxysulfosuccinimid erhöht die Halbwertszeit des Zwischenproduktes in Wasser⁶⁵ und verlängert somit die Reaktionszeit.

Nach drei Stunden bei RT und wiederholtem Vortexen wurde das Peptid drei Tage lang gegen PBS dialysiert (MWCO: 1000 Da) [Spectra/Por[®] Biotech]. Zuletzt wurde mittels BCA[™] Protein Assay Kit die Peptidkonzentration bestimmt und durch SDS-PAGE und Western Blot (siehe 4.4.3 und 4.4.4) schließlich die Kondensation der Peptide mit Ziegenserum 1 [AG Dr. Denner] und den polyclonalen Rabbit Anti-Goat Immunglobulins/HRP [DakoCytomation] nachgewiesen.

Die HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymere wurden aufgrund der Polymerisierungsmethode auch als Konjugat bezeichnet, wobei jeder Ansatz eine neue Nummer bekam (z.B. Konjugat 138). Zum Teil wurden auch mehrere Konjugat-Ansätze miteinander vermischt (z.B. Konjugat 142/144).

4.4.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Peptiden

Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA[™] Protein Assay Kit der Firma Pierce durchgeführt. Dazu wurden pro zu testender Probe jeweils 10 µl in drei Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Als Vergleichsstandard diente der „Albumin Standard“ [Pierce], von dem dreimal 10 µl der Verdünnungen 200, 400, 600, 800, 1000 und 1200 µg/ml auf dieselbe Mikrotiterplatte gegeben wurden. Anschließend wurden 200 µl eines 50 : 1-Gemisches der Reagenzien A und B zu jeder Probe hinzupipettiert und vermischt.

Der Reaktion liegt zu Grunde, dass Proteine im alkalischen Milieu Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen reduzieren⁶⁶. Im Laufe einer 30minütigen Reaktionszeit bei 37°C wurde also das Kupfersulfat aus Reagenz B durch die Proteine zu Kupfer (Cu⁺) reduziert, welches einen Chelatkomplex mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure aus Reagenz A bildet. Dieser Komplex ist an einem Absorptionsmaximum bei 562 nm zu erkennen. Die Messung wurde mit dem ELISA Reader Spectra Classic von Tecan bei 560 nm durchgeführt.

4.4.3. Tricin-Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die Tricin-Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Schägger und von Jagow durchgeführt⁶⁷. Dazu wurden die Proteine mit Probenpuffer vermischt und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Das im Probenpuffer enthaltene Detergenz SDS bindet an die Proteine und durch seinen anionischen Charakter werden diese negativ geladen, so dass das Verhältnis von Ladung zu Masse konstant bleibt. Die Proteine werden sowohl durch die Hitze, als auch durch das SDS sowie das ebenfalls im Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol denaturiert. Letzteres zerstört Disulfidbrücken zwischen Cystein-Seitenketten. Die so in ihrer Primärstruktur vorliegenden Proteine können dadurch ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Das 1,5 mm dicke Gel bestand aus einem 4 %igen Sammelgel (pH 6,8) und einem 10 bzw. 15 %igen Trenngel (pH 8,8) (siehe Tab. 4-1).

Tab. 4-1: Zusammensetzung der SDS-Gele

<u>Sammelgel, 4 %ig</u>	<u>Trenngel, 10 %ig</u>	<u>Trenngel, 15 %ig</u>
1,0 ml Gelpuffer	2,5 ml Gelpuffer	2,5 ml Gelpuffer
1,6 ml H ₂ O dest.	2,5 ml H ₂ O dest.	1,3 ml H ₂ O dest.
0,4 ml Acrylamid (30%)	2,5 ml Acrylamid (30%)	3,8 ml Acrylamid (30%)
50 μ l APS	50 μ l APS	50 μ l APS
5 μ l TEMED	5 μ l TEMED	5 μ l TEMED

Am Übergang vom Sammel- zum Trenngel sammeln sich die Proteine und werden dann vom gleichen Startpunkt aus ihrer Größe nach im Trenngel aufgetrennt. Zum Vergleich mit Proteinen einer bekannten Größe wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder [Fermentas] verwendet. Die Auftrennung wurde in der SDS-Gelkammer Hoefer-SE 250 bei einer Stromstärke von 30 mA begonnen. Letztere wurde nach Erreichen des Trenngels auf 50 mA erhöht.

4.4.4. Western Blot

Proteine werden durch das Western Blotting von einem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, auf der dann durch Inkubation mit Seren oder Antikörpern bestimmte Proteine aus einer Vielzahl identifiziert werden können.

Das SDS-Gel sowie zwei Blotting-Filterpapiere wurden für 10 min in Transferpuffer gelegt. Die PVDF-Membran (0,2 μ m) [Millipore Immobilon] wurde kurz in Methanol und danach ebenfalls für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurde der Blot-Sandwich in

der Reihenfolge Anode, Blot-Papier, PVDF-Membran, SDS-Gel, Blot-Papier, Kathode in der Trans-Blot SD[®] Semi-Dry Transfer Cell [BioRad] aufgebaut. Diese wurde zum Übertragen der Proteine auf die Membran für 30 min auf 20 V eingestellt. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT in Blockierungspuffer geschwenkt, um proteinfreie Flächen abzusättigen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte 1,5 h bei RT bzw. üN bei 4 °C. Nach dem Waschen mit Waschpuffer (3 x 10 min) wurde für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert, um dann nach nochmals 3 x zehnmütigem Waschen mit Waschpuffer die Proteine mittels DAB oder ECL sichtbar zu machen.

4.4.5. ECL-Entwicklung

Zum Nachweis von mit Antikörpern markierten Proteinen wurde das ECL[™] Western Blotting Detection Reagents Kit von Amersham verwendet. Das im Kit enthaltene Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion) wird durch die mit den Sekundärantikörpern konjugierte *horse radish peroxidase* (HRP) und Wasserstoffperoxid oxidiert, wobei ersteres in einen angeregten Zustand versetzt wird. Die gespeicherte Energie wird in Form von Licht (Chemilumineszenz) wieder abgegeben. Die *enhanced chemiluminescence* (ECL) äußert sich in verstärkter und länger anhaltender Emission von Licht, die durch Zugabe von Phenolen erreicht wird.

Von den beiden in dem Kit enthaltenen Reagenzien wurde pro zu entwickelnder PVDF-Membran jeweils 1 ml miteinander vermischt. Darin wurde die Membran 1 min bei RT und Dunkelheit inkubiert und anschließend in einer Photokassette [Kodak] der CL-XPosure[™] Clear Blue X-Ray Film [Pierce] aufgelegt. Dieser wurde in der Entwicklermaschine Curix 60 [Agfa] entwickelt.

4.4.6. DAB-Färbung

Mit Antikörpern markierte Proteine auf der PVDF-Membran sind über den Sekundärantikörper an die *horse radish peroxidase* gebunden. Nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid wandelt das Enzym das Diaminobenzidin in ein unlösliches Molekül um. Auf diese Weise färbt sich die Membran an den Stellen braun, an denen die Peroxidase sitzt und somit an den markierten Proteinen.

Die gewaschene Membran wurde 10 min in 25 mM TrisHCl (pH 8,2) gewaschen. Dann wurden 20 ml der 25 mM TrisHCl-Lösung mit 50 µl 30 %igem Wasserstoffperoxid und einer Spatelspitze DAB vermischt und der Blot einige Minuten bis zum Erkennen von Banden darin geschwenkt. Durch Waschen (3 x 5 min) in H₂O_{bidest} wurde die Reaktion gestoppt. Die Membran wurde zwischen zwei Zellstofftüchern getrocknet und mit der GelDoc 2000 (BioRad) abfotografiert bzw. eingescannt.

4.4.7. Affinitätschromatografische Aufreinigung von Proteinen und Dialyse

Die aufzureinigenden rekombinanten Proteine aus *Hansenula polymorpha* enthielten einen 6 x His-Tag und konnten daher durch die Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Metall-Affinitätschromatografie aufgereinigt werden.

Die 3 ml-Säule wurde mit 15 ml Bindepuffer B (pH 8,0) equilibriert (2 ml/min). Anschließend wurden 80 ml Lysat, das ebenfalls aus Bindepuffer B (pH 8,0) sowie den gelösten Proteinen bestand, auf die Säule gegeben (1 ml/min). Da in der Ni-NTA-Agarose [Invitrogen] jeweils ein Nickel-Atom an vier Stellen durch das NTA koordinativ gebunden war, konnten an den zwei verbleibenden Bindungsstellen Histidine aus dem His-Tag daran binden und so das getaggte Protein in der Säulen-Matrix festhalten. Es folgte ein Waschschriff mit 15 ml Waschpuffer C (pH 6,3, 2 ml/min), bei der die Säule z.B. von histidinhaltigen Proteinen und Metallproteasen befreit wurde. Eluiert wurde mit Elutionspuffer E (pH 4,5, der pH-Wert wurde erst kurz vorher eingestellt; 0,5 ml/min) in 20 x 1 ml-Fractionen. Wegen ihres pK_a von 6,0 können Histidin-Reste durch eine Verringerung des pH-Wertes auf 5,9-4,5 protoniert werden. Ist dies der Fall, lösen sich die Proteine von der Ni-NTA-Agarose und werden eluiert.

Anschließend wurden die Fractionen mittels BCATM Protein Assay Kit [Pierce] (siehe 4.4.2) auf das Vorhandensein von Protein untersucht. Der Farbumschlag der Reagenzien des Kits zeigt zwar nur bei Lösungen mit bis zu 3 M Harnstoff genaue Molekulargewichte an, aber hier war es nur wichtig zu wissen, in welchen Fractionen Protein vorhanden war.

Die positiv getesteten Fractionen wurden in einem Dialyseschlauch (*molecular weight cut-off*, MWCO = 12-14 kDA) drei Tage lang gegen 2 l PBS bei RT dialysiert, um den Harnstoff zu entfernen. Das PBS wurde dabei mehrmals gewechselt. Anschließend wurde mittels kalter Aceton/Methanol-Fällung das SDS entfernt und die Protein-Lösung aufkonzentriert (siehe 4.4.8).

Regeneration der Ni-NTA-Agarose

Im Falle einer Grau- oder Braufärbung wurde die Ni-NTA-Agarose (3 ml) nach der Anleitung im *QIAexpressionist™* Handbuch [Qiagen] regeneriert. Statt 100 mM NiSO₄ wurde jedoch eine 39 mM NiCl₂-Lösung verwendet. Diese Änderung ist in der Arbeitsgruppe etabliert. Nacheinander wurde die Säulen-Matrix mit folgenden Lösungen gewaschen: 6 ml Regenerationspuffer (6 M GuHCl, 0,2 M Essigsäure), 15 ml H₂O, 9 ml 2 % SDS, 3 ml 25 % Ethanol, 3 ml 50 % Ethanol, 3 ml 75 % Ethanol, 15 ml 100 % Ethanol, 3 ml 75 % Ethanol, 3 ml 50 % Ethanol, 3 ml 25 % Ethanol, 3 ml H₂O, 5 ml 100 mM EDTA (pH 8,0), 30 ml H₂O, 15 ml NiCl₂, 6 ml H₂O, 6 ml Regenerationspuffer, 6 ml Bindepuffer B.

4.4.8. Kalte Aceton/Methanol-Fällung

Die kalte Aceton/Methanol-Fällung diente der Aufkonzentrierung der Proteinlösung und dem Entfernen des bei der Lyse benötigten SDS.

Die Proteinlösung wurde aus dem Dialyseschlauch entnommen, in 1 ml-Fractionen aufgeteilt und mit dem Concentrator 5301 [Eppendorf] auf jeweils etwa 200 µl eingengt. 800 µl Präzipitations-Reagenz (50 % saures Aceton mit 1 mM HCl + 50 % Methanol) wurden zugegeben und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 14000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl PBS gelöst. Diese Präzipitation wurde dreimal durchgeführt. Mit dem BCA™ Protein Assay Kit [Pierce] wurde daraufhin die Konzentration des Proteins im PBS bestimmt, das dann bei -20 °C gelagert wurde.

4.5. Arbeiten mit RNA

4.5.1. Herstellung von RNase-freiem Wasser

RNase-freies Wasser wurde durch einrühren von 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) in H₂O_{bidest} hergestellt. Das DEPC bindet kovalent an Histidin-Seitenketten der RNasen und inaktiviert sie damit. Die Lösung wurde 2 h bei 37 °C durchmischt und anschließend 20 min autoklaviert. Dadurch wurde sowohl das Wasser sterilisiert als auch das Diethylpyrocarbonat in seine Bestandteile CO₂ und Ethanol zersetzt.

4.5.2. RNA-Isolation aus PBMCs

Zur Isolation von RNA aus PBMCs wurde standardmäßig das RNeasy[®] Mini Kit [Qiagen] verwendet. Ca. $1,8 \times 10^6$ Zellen wurden nach beendeter Inkubationszeit (siehe 4.3.3) 5 min bei $2000 \times g$ zentrifugiert. 120 μl des Überstandes wurden für die Bestimmung des IL-10-Gehaltes mittels ELISA bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren, der Rest wurde verworfen. Die Zellen wurden mit 800 μl PBS gewaschen und erneut 5 min bei $2000 \times g$ zentrifugiert. Daraufhin wurden sie in 600 μl RLT-Puffer und 6 μl β -Mercaptoethanol stark gevortext und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Das Guanidinthiocyanat im RLT-Puffer sowie das β -Mercaptoethanol dienten der Denaturierung von RNasen im Zell-Lysat sowie der Lyse der Zellen.

Anschließend wurden die Proben mit 700 μl Ethanol (70 % in DEPC-Wasser) vermischt. Von der Suspension wurden 700 μl auf eine RNeasy Minisäule gegeben und 15 sek bei $10000 \times g$ zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit den restlichen 600 μl wiederholt. Dabei wurde die RNA an der Silicamembran der Minisäulen zurückgehalten. Die Säule wurde mit 350 μl Puffer RW1 gewaschen (15 sek, $10000 \times g$) und dann mit 80 μl einer Mischung aus DNase-Lösung und RDD-Puffer (Verhältnis 1 : 7; RNase-Free DNase Set [Qiagen]) 15 min inkubiert. Es folgten Waschschrte mit 350 μl Puffer RW1 und mit 500 μl Puffer RPE (jeweils 15 sek Zentrifugation bei $10000 \times g$) und dann erneut mit 500 μl Puffer RPE (1 min, $12000 \times g$). Nach dem Verwerfen der abzentrifugierten Flüssigkeit wurde die Säule noch einmal 1 min bei $12000 \times g$ zentrifugiert. Zuletzt wurde die RNA mit 50 μl DEPC-Wasser eluiert (1 min, $10000 \times g$). Die RNA-Isolation erfolgte bei RT und in RNase-freien Reaktionsgefäßen.

Nach dem Messen der RNA-Konzentration (siehe 4.5.3) wurde die RNA mit DEPC-Wasser auf 10 ng/ μl verdünnt und in 16 μl -Aliquots bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

4.5.3. Konzentrationsbestimmung von RNA

Der RNA-Gehalt wurde mit dem NanoDrop[®] Spectrophotometer ND-1000 [peQLab] gemessen. Dabei wurde zum Kalibrieren $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verwendet. Dann wurde von jeder RNA-Probe 1 μl gemessen und der RNA-Gehalt in ng/ μl ermittelt. Die Reinheit der Proben wurde durch den Quotient der Wellenlängen 260 nm / 280 nm ermittelt. Nukleinsäuren absorbieren bei 260 nm, wogegen die zyklischen Seitenketten einiger Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin bei 280 nm absorbieren. Ergibt der Quotient beider optischer Dichten 1,8 bis 2,0, so wird die Nukleinsäurelösung als frei von Proteinen bezeichnet.

4.5.4. One-Step Real-Time Quantitative PCR

Bei der quantitativen One-Step Real-Time PCR wird die RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend ein Sequenzabschnitt mittels spezifischer Primer vervielfältigt. Durch Zugabe einer TaqMan-Sonde, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff und einem Quencher hybridisiert ist, kann anhand der Stärke der Fluoreszenz die Zahl der ursprünglich vorhandenen RNA-Moleküle eines bestimmten Gens ermittelt werden. Die Sonde wird so gewählt, dass sie mit dem zu amplifizierenden Gen hybridisiert. An einem Ende der Sonde sitzt das Fluorochrom (z.B. 6-Carboxyfluorescein = FAM) und am anderen Ende der Quencher (z.B. Black Hole Quencher 1, BHQ1)⁶⁸. Nach Anregung des Fluorochroms gibt dieses die Energie durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) an den Quencher weiter, sofern sich beide in hinreichender Nähe (10-100 Å) zueinander befinden^{69,70}. Bei der Amplifikation des Gens baut die *Taq*-DNA-Polymerase die Sonde ab, wodurch sich die Fluoreszenz des Fluorochroms – weil es vom Quencher getrennt wurde – intensiviert⁷¹. Da die Fluoreszenz umso stärker ist, je mehr Template vorhanden ist, können Gene auf diese Weise quantifiziert werden.

Dadurch, dass die Umschreibung von RNA in cDNA und die Messung der Fluoreszenz in einem Schritt durchgeführt wurden, konnte die Kontamination durch Fremd-DNA minimiert werden.

Gemessen wurde die Fluoreszenz des Forkheadbox-Protein-3 (FoxP3)-Gens sowie die der Gene von Interleukin-10 (IL-10) und Interferon- α 1 (IFN- α 1). Als Vergleich diente das „Housekeeping“-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), auf dessen Expression nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode von Livak und Schmittgen normalisiert wurde⁷². Als Negativkontrolle wurde ein Reaktionsansatz mit H₂O_{bidest} statt mit RNA untersucht. Zusätzlich wurde von jeder RNA-Probe ein Aliquot mit der AmpliTaq Gold und ohne Reverser Transkriptase angesetzt, um mögliche DNA-Kontaminationen feststellen zu können.

Zur Amplifikation wurde das Mx4000[®] Multiplex Quantitative PCR System [Stratagene] verwendet. Die SuperScript[™] III Reverse Transkriptase (SSIII RT), die Platinum[®]-*Taq*-Polymerase und der Puffer stammen aus dem SuperScript[™] III Platinum[®] One-Step Quantitative RT-PCR System von Invitrogen.

Reaktionsansätze:

<u>FoxP3/GAPDH-Duplex-Real-Time</u>		<u>FoxP3/GAPDH-Duplex-Real-Time Kontrolle ohne Reverse Transkriptase</u>	
RNA (50 ng)	5,00 µl	RNA (50 ng)	5,00 µl
Pf (Fox-For-Real) For	0,50 µl	Pf (Fox-For-Real) For	0,50 µl
Pf (Fox-For-Real) Rev	0,50 µl	Pf (Fox-For-Real) Rev	0,50 µl
Sonde (Fox-Probe)	0,50 µl	Sonde (Fox-Probe)	0,50 µl
GAPDH For	0,50 µl	GAPDH For	0,50 µl
GAPDH Rev	0,50 µl	GAPDH Rev	0,50 µl
GAPDH-Sonde	0,50 µl	GAPDH-Sonde	0,50 µl
2 x Reaction Mix	12,50 µl	PCR-Puffer	2,50 µl
SSIII RT/Platinum-Taq	0,50 µl	dNTPs	0,50 µl
Nucleasefreies H ₂ O _{bidest}	ad 25,00 µl	MgCl ₂	1,75 µl
		AmpliTaq Gold	0,25 µl
		Nucleasefreies H ₂ O _{bidest}	ad 25,00 µl

Temperaturprofil: 10' 50 °C, 2' 95 °C; 50 x (15" 95 °C, 30" 60 °C); ∞ 4 °C

Die Primer und Sonden von IL-10 und IFN-α1 wurden von Qiagen bzw. Applied Biosystems bezogen. Da das bereits vorhandene SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System weiter verwendet werden sollte, wurde das dazugehörige Temperaturprofil beibehalten und nur die Annealing-Temperaturen und -Zeiten aus den Empfehlungen der Hersteller übernommen sowie gegebenenfalls ein Elongationsschritt hinzugefügt.

IL-10-Real-Time

RNA (50 ng)	5,00 µl
10 x QuantiTect Assay Mix	2,50 µl
2 x Reaction Mix	12,50 µl
SSIII RT/Platinum-Taq	0,50 µl
Nucleasefreies H ₂ O _{bidest}	ad 25,00 µl

Temperaturprofil: 10' 50 °C, 2' 95 °C; 45 x (15" 95 °C, 30" 56 °C, 30" 72 °C); ∞ 4 °C

IFN-α1-Real-Time

RNA (50 ng)	5,00 µl
IFNalpha1 20 x TaqMan Gene Expression Assay Mix	1,00 µl
2 x Reaction Mix	10,00 µl
SSIII RT/Platinum-Taq	0,40 µl
Nucleasefreies H ₂ O _{bidest}	ad 20,00 µl

Temperaturprofil: 10' 50 °C, 2' 95 °C; 50 x (15" 95 °C, 1' 60 °C); ∞ 4 °C

Die cDNA wurde anschließend bei -20 °C eingefroren.

5. Ergebnisse

5.1. Optimierte Gewinnung des rekombinanten transmembranen Hüllproteins des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K TM)

Ein Ziel der Diplomarbeit war es, die Auswirkungen des rekombinanten transmembranen Hüllproteins von HERV-K TM auf PBMCs zu untersuchen und dadurch auf mögliche immunsuppressive Eigenschaften zu schließen. Hierfür wurden größere Mengen von HERV-K TM benötigt, weshalb die Gewinnung dieses Proteins aus Hefezellen optimiert werden sollte.

Für die Produktion von HERV-K TM wurden durch die Arbeitsgruppe Zellen von *Hansenula polymorpha* RB11 bereitgestellt, in denen die DNA-Sequenz des Proteins bereits stabil ins Genom integriert war⁴¹. Zur Überprüfung wurde zunächst die DNA aus den Zellen isoliert und die Anwesenheit der DNA-Sequenz durch eine PCR mit HERV-K TM-spezifischen Primern bestätigt (Abb. 5-1).

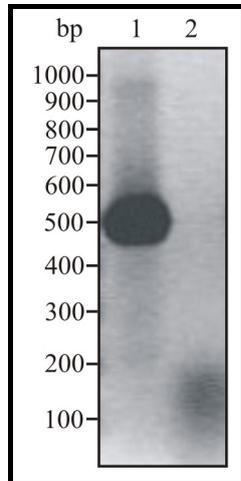


Abb. 5-1: Nachweis der DNA-Sequenz von HERV-K TM in der Hefe-DNA mittels PCR

1 %iges TAE-Agarosegel
Marker: O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix

1 = HERV-K TM
2 = H₂O-Kontrolle

Anschließend sollte die Ausbeute an HERV-K TM erhöht werden. Dazu wurde zuerst der Zellaufschluss optimiert: Nachdem zuvor die Hefezellen einen Tag lang bei 37°C in dem „Bindepuffer B“ inkubiert worden waren, wurden nun ca. 2 ml des Zellpellets bei 4 °C mit 1,2 ml Glasperlen und 5 ml des Bindepuffers B versetzt und 2 x 2,5 min stark gevortext. Zwischendurch und am Ende wurden die Proben für eine Minute auf Eis abgekühlt. Nach dem Zentrifugieren der Suspension wurde der Überstand abgenommen, es wurden 3 ml des Puffers auf das Zellpellet gegeben und wieder wie angegeben gevortext. Die Überstände wurden

vereint und HERV-K TM im Pool der Überstände wurde per SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen (Abb. 5-2).

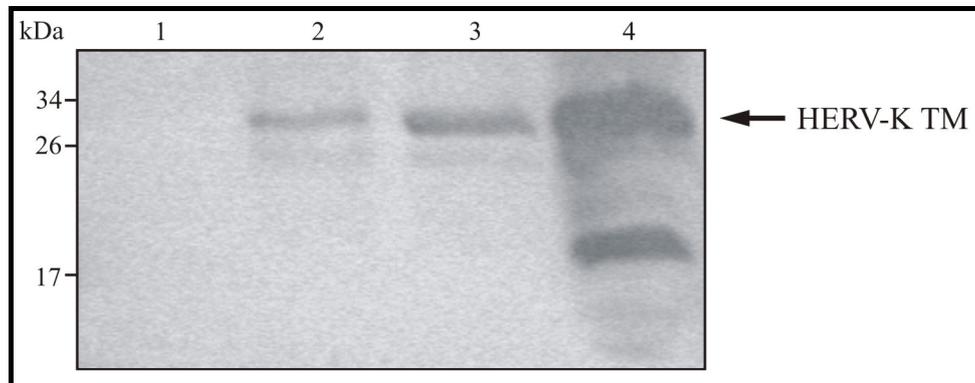


Abb. 5-2: Western Blot-Analyse der Hefezell-Lysate

10 %iges SDS-Gel

Primärantikörper: Anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: Anti-Maus (1:2000); DAB-Färbung (5 min);

Marker: PageRuler™ Prestained Protein Ladder

- 1 = Negativkontrolle (nicht induzierte Hefe)
- 2 = Lysat, ohne Glasperlen
- 3 = Lysat, mit Glasperlen behandelt
- 4 = Pellet, mit Glasperlen behandelt

Durch die Lyse der Hefezellen mit Glasperlen (Abb. 5-2, Spur 3) konnte die Ausbeute an HERV-K TM im Überstand im Vergleich zur vorher verwendeten Methode (Abb. 5-2, Spur 2) erhöht werden. In beiden Spuren sind zwei Banden zu erkennen, von denen die obere bei ca. 30 kDa das glykolysierte und die untere das unglykolysierte HERV-K TM (24 kDa) zeigt⁴¹. Im Zellpellet (Abb. 5-2, Spur 4) sind glykolysiertes und unglykolysiertes sowie degradiertes HERV-K TM verblieben.

Um die Ausbeute an Protein zu erhöhen, sollte im nächsten Schritt die Zusammensetzung des Lysepuffers (LP) optimiert werden. Da das transmembrane Hüllprotein lipophil ist, wurde durch Verwendung unterschiedlicher Detergenzien versucht, einen höheren Anteil von HERV-K TM bei der Lyse in Lösung zu bekommen. Dazu wurden 2 % Triton X-100 und 1 % SDS (LP 1), 8 M Harnstoff und 1 % SDS (LP 2, LP 3), 4 % Triton X-100 (LP 4) sowie 0,1 % NP-40 verwendet (siehe 3.8). Als Positivkontrolle diente der Cracking Buffer, der 8 M Harnstoff und 5 % SDS enthielt (Abb. 5-3).



Abb. 5-3: Test verschiedener Lysepuffer zur Aufreinigung von HERV-K TM mittels Western Blot-Analyse

12 %iges SDS-Gel

Primärantikörper: Anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: Anti-Maus (1:2000), ECL-Detektion (2 sek)

Marker: PageRuler™ Prestained Protein Ladder

- 1 = Negativkontrolle (nicht induzierte Hefe)
- 2 = Bindepuffer B
- 3-7 = Lysepuffer 1-5
- 8 = Positivkontrolle (Cracking Buffer)

Das Solubilisierungsvermögen der Lysepuffer ist in Bezug auf HERV-K TM unterschiedlich groß: Der größte Gehalt an Protein wurde mit dem Cracking Buffer aus den Zellpellets extrahiert (Abb. 5-3, Spur 8). Allerdings zeigt die Bande bei ca. 20 kDa, dass hier auch ein Teil des Proteins degradiert worden war. Daher wurde dieser Puffer nicht zur weiteren Aufreinigung benutzt. Nach LP 6 konnte der bei früheren Aufreinigungen bereits erfolgreich verwendete Bindepuffer B (Abb. 5-3, Spur 2) am meisten HERV-K TM in Lösung bringen.

Insgesamt stellte sich der bereits erprobte Bindepuffer B als der beste der getesteten Lysepuffer heraus. Zusätzlich konnte die Aufreinigung von HERV-K TM durch die Verwendung von Glasperlen optimiert werden.

5.2. Ansätze zur Gewinnung des rekombinanten transmembranen Hüllproteins p15E des porcinen endogenen Retrovirus (PERV p15E)

Zusätzlich zu HERV-K TM sollte ebenfalls das transmembrane Hüllprotein PERV p15E rekombinant hergestellt und anschließend auf immunsuppressive Eigenschaften untersucht werden. Hierzu wurden Zellen von *Hansenula polymorpha* von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt, die bereits den Vektor mit der DNA-Sequenz von PERV p15E enthielten. Verschiedene Zellkolonien wurden gepickt und abwechselnd in Minimal- und Vollmedium kultiviert (siehe 3.5 und 4.1.2). Hefezellen, die sich im Vollmedium teilten und dabei das Plasmid verloren, konnten im Uracil-freien Minimalmedium wegen ihrer Uracil-Auxotrophie

nicht überleben. Eine Integration des Vektors ins Genom, unterstützt durch die *Hansenula polymorpha autonomously replicating sequence 1* (HARS1), ermöglichte es den Zellen, auch im Minimalmedium zu wachsen.

Zunächst wurde die DNA aus verschiedenen transfizierten Hefezell-Kulturen mittels PCR und vektorspezifischer Primer auf das Vorhandensein des Vektors pFPMT-MF α -His₆-PERV-TM untersucht (Abb. 5-4).

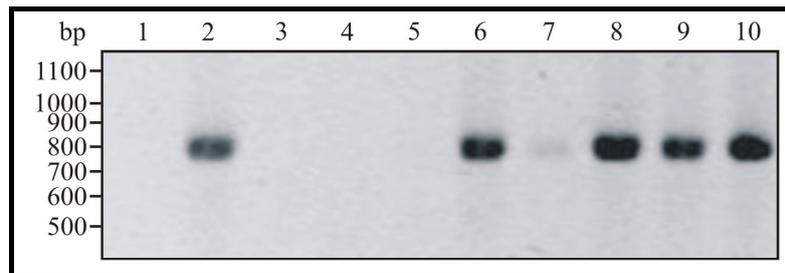


Abb. 5-4: Nachweis des Vektors in der Hefe-DNA mittels PCR

1 %iges TAE-Agarose-Gel
Marker: O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix

1 = H₂O-Kontrolle
2-10 = Hefezell-Kulturen 1-9

In den Hefe-Zellkulturen 1, 5 und 7-9 (Abb. 5-4, Spuren 2, 6, 8-10) konnte der Vektor pFPMT-MF α -His₆-PERV-TM nachgewiesen werden. Für diese fünf Kulturen sollte nun in einer weiteren PCR mit PERV p15E-spezifischen Primern das Insert nachgewiesen werden (Abb. 5-5).

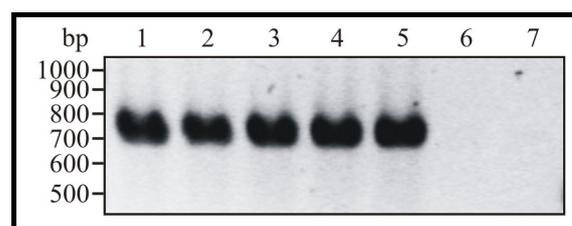


Abb. 5-5: Nachweis der DNA-Sequenz von PERV p15E in der Hefe-DNA mittels PCR

1 %iges TAE-Agarose-Gel
Marker: O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix

1 = Hefezell-Kultur 1
2 = Hefezell-Kultur 5
3 = Hefezell-Kultur 7
4 = Hefezell-Kultur 8
5 = Hefezell-Kultur 9
6 = Negativkontrolle (Hefe-DNA ohne Vektor)
7 = H₂O-Kontrolle

Die Sequenz von PERV p15E war in jeder der fünf getesteten Proben vorhanden (Abb. 5-5). Um auszuschließen, dass die DNA-Sequenz aus der ausgewählten Hefezell-Kultur 1 Punktmutationen enthielt, wurde diese sequenziert (siehe 4.2.4). Die Sequenz wurde mit derjenigen von PERV A/C env (Accession No. AY953542) abgeglichen und war korrekt.

Im Anschluss an die Sequenzierung wurde die so getestete Hefezell-Kultur 1 lysiert und es wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht, ob das transmembrane Hüllprotein PERV p15E exprimiert wurde (Abb. 5-6, Abb. 5-7).

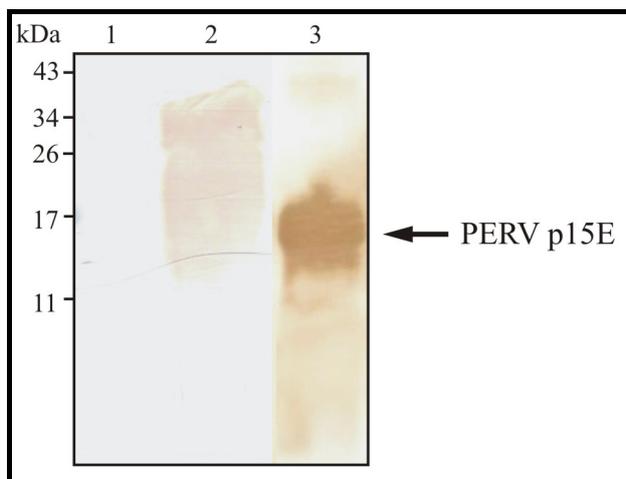


Abb. 5-6: Nachweis von PERV p15E mittels Western Blot-Analyse (His-Tag)

10 %iges SDS-Gel

Primärantikörper: Penta-His-Antikörper (1:1000),
Sekundärantikörper: Anti-Ziege (1:3000),
DAB-Färbung (5 min)

Marker: PageRuler™ Prestained Protein Ladder

1 = induzierte Hefe (Lysat)

2 = induzierte Hefe (Pellet)

3 = Positivkontrolle (rekombinantes PERV p15E aus Bakterien)

Zunächst wurde versucht, das Protein im Western Blot mit dem His-Tag-Antikörper nachzuweisen (Abb. 5-6). Hier konnte weder im Lysat (Spur 1), noch im Pellet (Spur 2) das ca. 15 kDa große PERV p15E detektiert werden. Wegen der langen Entwicklung in Diaminobenzidin wurden im Zellpellet enthaltene Hefepoteine unspezifisch angefärbt.

Für den Fall, dass der His-Tag trotz denaturierender Bedingungen nicht zugänglich sein sollte und deshalb das rekombinante PERV p15E aus *Hansenula polymorpha* nicht nachgewiesen werden konnte, wurde zusätzlich ein Nachweis mit Ziegenserum 20 versucht (Abb. 5-7). Dieses Serum stammt aus einer Ziege, die mit dem rekombinanten PERV p15E aus Bakterien immunisiert worden war.

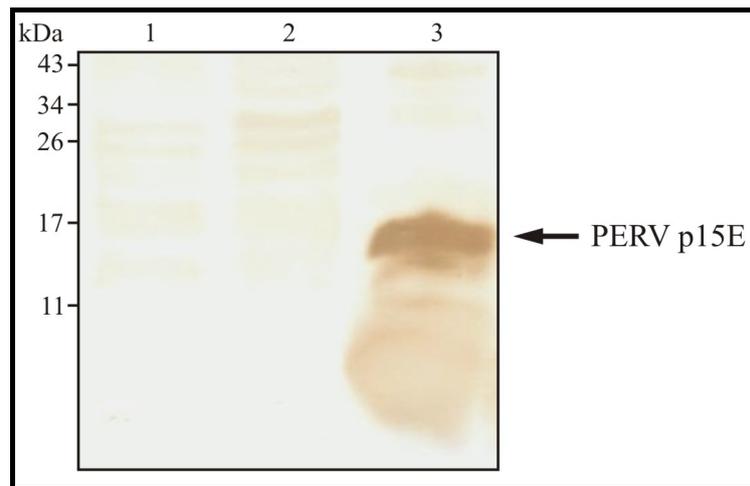


Abb. 5-7: Nachweis von PERV p15E mittels Western Blot-Analyse (Ziegenserum 20)

15 %iges SDS-Gel

Primärantikörper: ZS 20 (1:1000), Sekundärantikörper: Anti-Ziege (1:3000), DAB-Färbung (7 min)
 Marker: PageRuler™ Prestained Protein Ladder

- 1 = Negativkontrolle (Lysat nicht induzierter Hefezellen)
- 2 = induzierte Hefe (Lysat)
- 3 = Positivkontrolle (rekombinantes PERV p15E aus Bakterien)

Auf Höhe von 15 kDa ist das Signal des in Bakterien produzierten PERV p15E zu erkennen (Abb. 5-7, Spur 3). Dies konnte jedoch für das rekombinante PERV p15E aus der Hefe nicht nachgewiesen werden (Abb. 5-7, Spur 2). Die schwach erkennbaren Banden sind unspezifisch angefärbte Proteine.

Das transmembrane Hüllprotein p15E des porcinen endogenen Retrovirus A konnte von *Hansenula polymorpha* RB11 unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht produziert werden.

5.3. Expression von IL-10, IFN- α 1 und FoxP3 in PBMCs nach Einwirkung von retroviralen Hüllproteinen

Für die Retroviren HIV und FeLV ist nachgewiesen worden, dass sie Immunsuppression in Menschen bzw. Katzen bewirken^{11,12}. Auch die Isu-Domänen der transmembranen Hüllproteine dieser Viren zeigten *in vitro* immunsuppressive Eigenschaften^{9,10}. Wegen der strukturellen Homologie dieser Isu-Domänen zu derjenigen von MuLV ist eine ähnliche Wirkung auch hier denkbar. Zudem sind HIV-Isu und MuLV-Isu homolog zu zwei der fünf α -Helices von IFN- α und könnten an den IFN- α -Rezeptor binden²². Eine Veränderung der

Produktion dieses Rezeptors könnte die Folge sein. Daher wurde ein Heteropolymer aus HIV-Isu und MuLV-Isu synthetisiert (siehe 3.6 und 4.4.1) und die mRNA-Expression von IFN- α 1, das eines der beiden IFN- α -Rezeptoruntereinheiten darstellt, untersucht. Außerdem wurde die Expression von FoxP3, einem Marker für Tregs, und von IL-10, einem immunsuppressiven Zytokin, untersucht. Hierzu wurden Lymphozyten eines Spenders für einen, drei und sieben Tage mit retroviralen Proteinen inkubiert. Zu diesen gehörte HERV-K TM (siehe 5.1) und das HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymer. Letzteres wird hier auch als Konjugat bezeichnet.

Für die nachfolgenden Versuche wurden die Konjugate 140/141, 145, 150 und 151 verwendet. Zuvor war gezeigt worden, dass sowohl das verwendete HERV-K TM als auch das HVI-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymer in der Lage waren, IL-10 in humanen PBMCs zu induzieren (Abb. 5-8). Frühere Daten bestätigten dies^{41,73}.

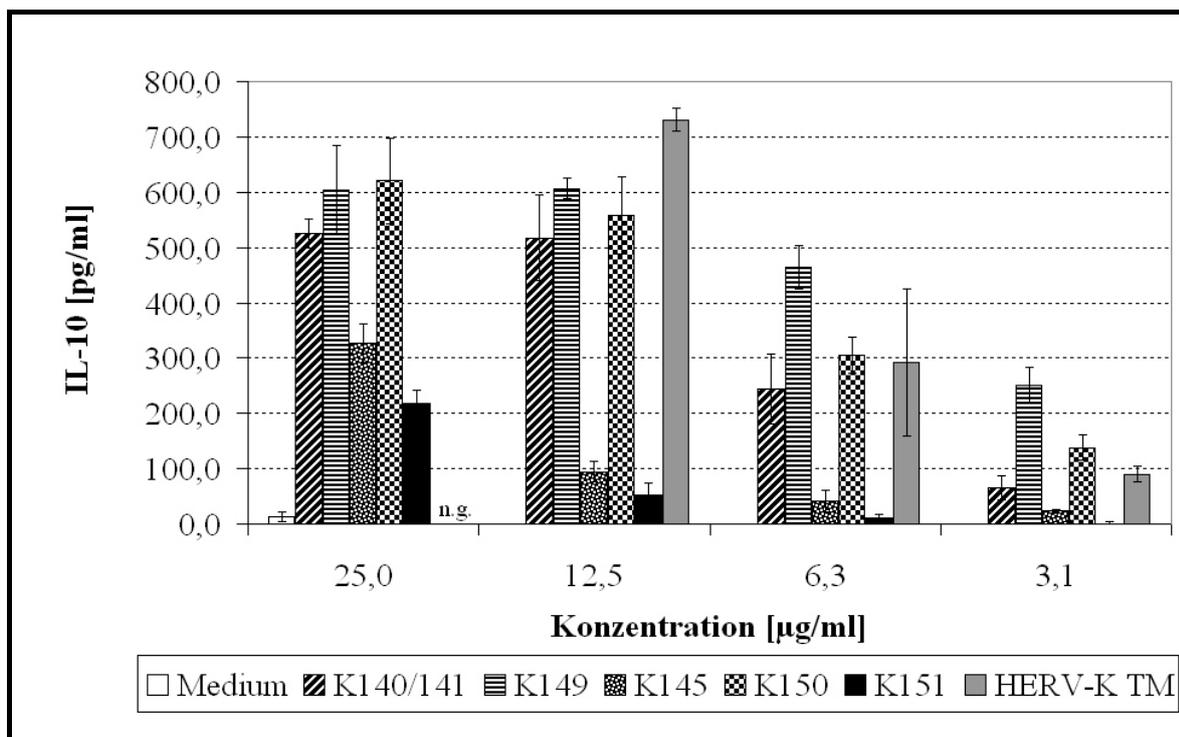


Abb. 5-8: Induktion der IL-10-Ausschüttung in humanen PBMCs durch retrovirale Proteine

Gehalt an IL-10 im Kulturüberstand. Die PBMCs verschiedener Spender wurden für 24 Stunden mit 25,0, 12,5, 6,3 sowie 3,1 µg/ml Konjugat 140/141, 149, 150, 151 bzw. mit HERV-K TM inkubiert. Anschließend wurde die IL-10-Konzentration in den Kulturüberständen mittels OptEIA™ Human IL-10 ELISA Set [BD Biosciences] und photometrischer Messung bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD; K – Konjugat; n.g. – nicht getestet.

Nach der Inkubation der PBMCs mit den genannten retroviralen Proteinen wurde die RNA isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR und spezifischer Primer amplifiziert (Abb. 5-9 bis Abb. 5-12). Dabei wurde auch die Expression der humanen Glycerinaldehyd-3-

phosphat-dehydrogenase (GAPDH) untersucht. Dieses Enzym wird in der Glykolyse benötigt, weshalb dessen Gen konstitutiv transkribiert wird. Dieses *housekeeping*-Gen wurde aus diesem Grund zur Normalisierung der Expression von FoxP3, IL-10 und IFN- α 1 verwendet.

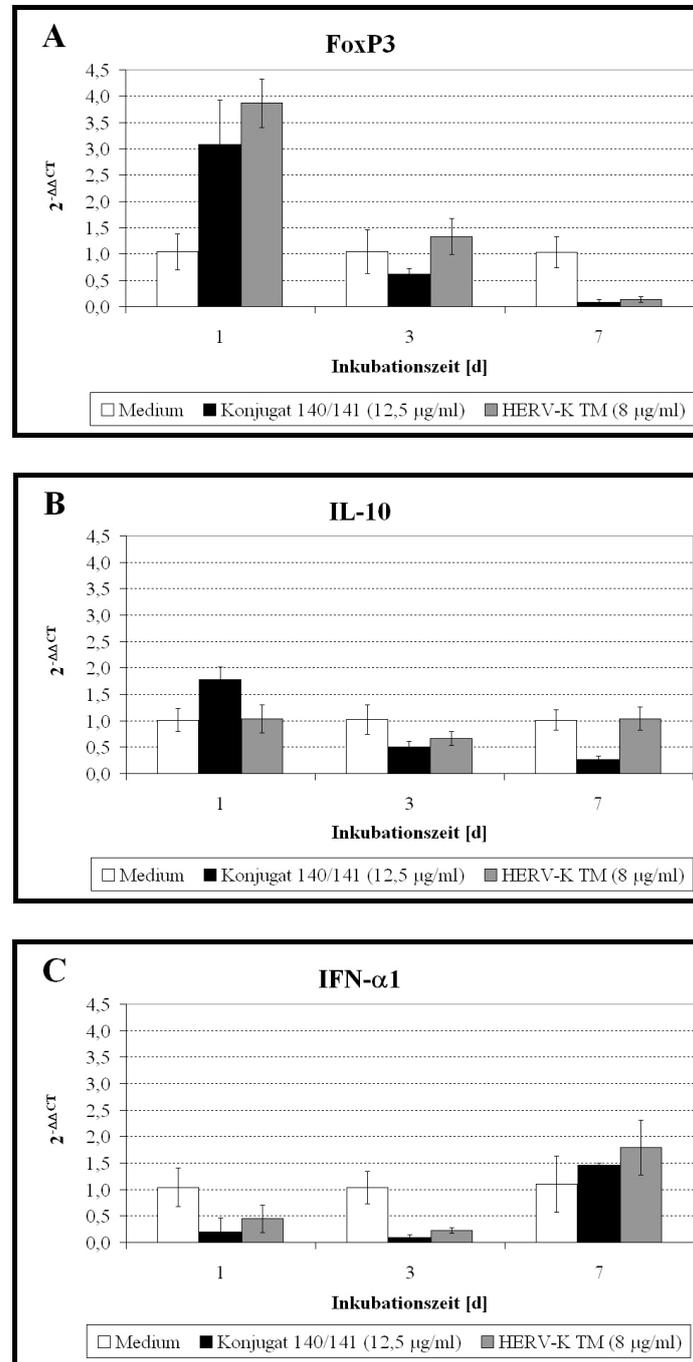


Abb. 5-9: Änderung des Transkriptionslevels der Gene von FoxP3 (A), IL-10 (B) und IFN- α 1 (C) in humanen PBMCs

Expression der mRNA von FoxP3 (A), IL-10 (B) bzw. IFN- α 1 (C) nach 1, 3 und 7 Tagen Inkubation der PBMCs eines Spenders mit 12,5 µg/ml Konjugat 140/141 bzw. 8 µg/ml HERV-K TM. Die mRNA wurde mittels One-Step quantitative Real-Time PCR in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Die relative Anzahl an FoxP3-, IL-10- bzw. IFN- α 1-mRNA-Transkripten wurde auf die relative Anzahl an GAPDH-mRNA-Transkripten nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode normalisiert⁷². Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

Im Vergleich zur Kontrolle (Medium) ist die Expression von FoxP3 nach einem Tag Inkubation mit Konjugat 140/141 bzw. HERV-K TM um das Drei- bzw. fast Vierfache erhöht (Abb. 5-9 A). Nach drei Tagen gab es nur sehr geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Expressionslevels, wohingegen die Expression von FoxP3 nach sieben Tagen Inkubation mit retroviralen Proteinen nur noch ein Zehntel des Kontrollansatzes betrug.

Die Expression von IL-10 in PBMCs, die mit Konjugat 140/141 inkubiert worden waren, ist am ersten Tag gegenüber der Kontrolle um den Faktor 1,8 erhöht (Abb. 5-9 B). Innerhalb der folgenden Tage verringerte sich das Transkriptionslevel, so dass die Kopienzahl der IL-10-mRNA im Vergleich zur Kontrolle nach drei Tagen nur die Hälfte und sieben Tagen nur ein Viertel der Expressionsstärke erreichte. Nach Inkubation mit HERV-K TM fiel das IL-10-Transkriptionslevel auf zwei Drittel des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes der Kontrolle, wohingegen nach einem und nach sieben Tagen kein Unterschied zur Kontrolle messbar war.

Interferon- $\alpha 1$ wurde in den Ansätzen mit den retroviralen Proteinen innerhalb der ersten drei Tage deutlich weniger exprimiert (Abb. 5-9 C). Erst nach sieben Tagen stieg hier das Transkriptionslevel leicht an und erreichte im Vergleich zur Inkubation mit Medium 33 % (Konjugat) bzw. 63 % (HERV-K TM) höhere Werte.

Mit Ausnahme der Expression von IFN- $\alpha 1$ wurden für IL-10 und FoxP3 in den ersten drei Tagen die größten Unterschiede in den Transkriptionslevels beobachtet. Um die Kinetik genauer zu untersuchen, wurde die RNA nun nach fünf Stunden isoliert. Die Probenentnahme nach einem und nach drei Tagen wurde beibehalten (Abb. 5-10 bis Abb. 5-12).

Bereits nach fünf Stunden Inkubationszeit mit den eingesetzten retroviralen Proteinen stieg die Zahl der FoxP3-mRNA-Kopien um den Faktor 2,5 gegenüber der Kontrolle an (Abb. 5-10 A). 24 h nach Inkubation mit Konjugat 145 sank das Expressionslevel auf einen $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 1,6 und verringerte sich nach 72 h schließlich auf einen Wert von 0,5. Bei der Inkubation mit HERV-K TM stieg die Zahl an FoxP3-Transkripten im Vergleich zur Kontrolle dagegen nach 24 h auf um das dreifache an und sank nach 72 h schließlich auf einen $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 1,0.

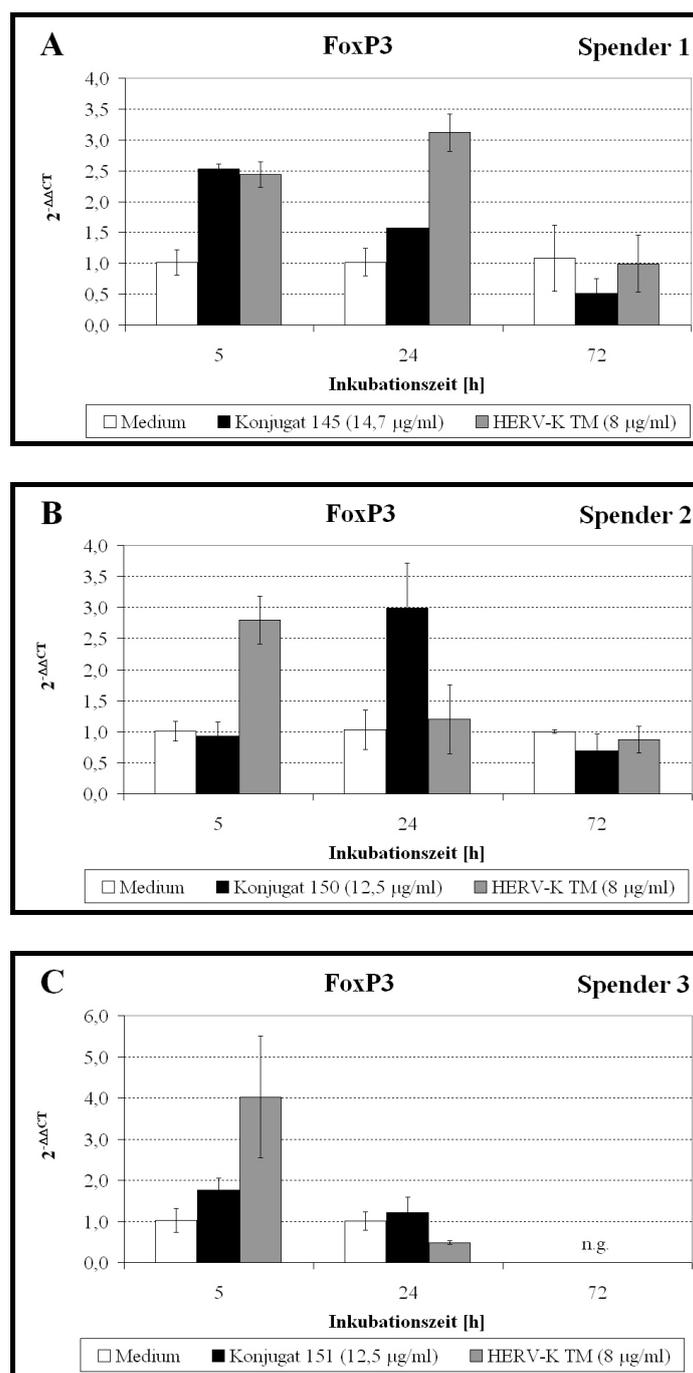


Abb. 5-10: Änderung des FoxP3-Transkriptionslevels in humanen PBMCs

Expression der FoxP3-mRNA nach 5, 24 und 72 Stunden Inkubation der PBMCs von Spender 1 (A), Spender 2 (B) und Spender 3 (C) mit 8 µg/ml HERV-K TM bzw. 14,7 µg/ml Konjugat 145 (A), 12,5 µg/ml Konjugat 150 (B) bzw. 12,5 µg/ml Konjugat 151 (C). Die mRNA wurde mittels One-Step quantitative Real-Time PCR in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Die relative Anzahl an FoxP3-mRNA-Transkripten wurde auf die relative Anzahl an GAPDH-mRNA-Transkripten nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode normalisiert⁷². Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD; n.g. – nicht getestet.

Bei der Wiederholung des Versuches mit PBMCs anderer Spender (Abb. 5-10 B und C) sah die Expression anders aus: Das FoxP3-Expressionslevel in PBMCs, die mit HERV-K TM inkubiert worden waren, erreichte nach fünf Stunden zwar den 2,8fachen Wert der Kontrolle,

doch fiel er anschließend auf einen $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 1,2 ab (Spender 2, Abb. 5-10 B). Nach der Inkubation mit Konjugat 150 stieg hier das Transkriptionslevel erst nach 24 h auf einen $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 3,0 und unterschied sich sonst nicht klar von der Kontrolle.

Im Gegensatz hierzu wurde beim dritten Spender bereits nach 5 h Inkubation mit HERV-K TM ein $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 4,0 gemessen, der damit deutlich über den Werten der vorigen Ansätze lag (Abb. 5-10 C). Allerdings sind in diesem Fall bei der Dreifachmessung stark unterschiedliche Werte aufgetreten, so dass dieser Wert nicht gesichert ist. Die Höhe der Expression verringerte sich nach 24 h stark ($\Delta\Delta C_T$ -Wert: 0,5). PBMCs, die mit Konjugat 151 inkubiert worden waren, wiesen nach 5 h eine um den Faktor 1,8 erhöhte Menge an FoxP3-mRNA auf, der nach 24 h leicht sank.

Insgesamt ergibt sich ein noch unklares Bild von der FoxP3-Expression nach Inkubation mit retroviralen Proteinen. HERV-K TM löste in jedem Versuch nach fünf Stunden eine erhöhte Transkription von FoxP3 aus (Abb. 5-10 A), wogegen dies beim Konjugat je nach Spender nach 5, 24 oder 72 Stunden der Fall war.

Parallel zu den Messungen der FoxP3-Expression wurde auch untersucht, wie stark IL-10 exprimiert worden war.

Die IL-10-Expressionslevels unterschieden sich von Spender zu Spender: Bei Spender 1 wurde nach fünfständiger Inkubation mit HERV-K TM im Vergleich zur Kontrolle ein Anstieg der Expression um den Faktor 4,1 gemessen, der dann nach 24 h auf 2,5 sank und nach 72 h schließlich nur noch 0,7 betrug (Abb. 5-11 A). Dagegen lag das IL-10-Transkriptionslevel nach 5 h Inkubation mit Konjugat 145 bei einem $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 0,4, stieg innerhalb der nächsten 19 Stunden auf das 3,8fache Level der mit Medium inkubierten PBMCs und fiel anschließend auf einen $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 0,9.

Die Zahl der IL-10-mRNA-Kopien war bei Spender 2 bereits nach 5 h Inkubation mit HERV-K TM im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 3,2 erhöht (Abb. 5-11 B). Nach 24 h stieg der $\Delta\Delta C_T$ -Wert auf 10,8 und fiel innerhalb der nächsten zwei Tage wieder auf 3,2 ab. Nach 5 h Inkubation mit Konjugat 150 glich die Expressionsstärke derjenigen der Kontrolle, stieg dann um den Faktor 13,5 an (24 h) und sank nach 72 h auf einen $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 5,4.

Bei Spender 3 stieg dagegen das IL-10-Transkriptionslevel mit zunehmender Inkubationszeit an (Abb. 5-11 C). Dieses war nach Inkubation mit HERV-K TM verglichen mit der Kontrolle um das 2,3fache erhöht (5 h) und stieg auf das 3,4fache (24 h). Konjugat 151 löste zunächst

eine geringere Expression von IL-10 aus. Nach 24 h war die Zahl der IL-10-Transkripte hier um den Faktor 2,3 erhöht.

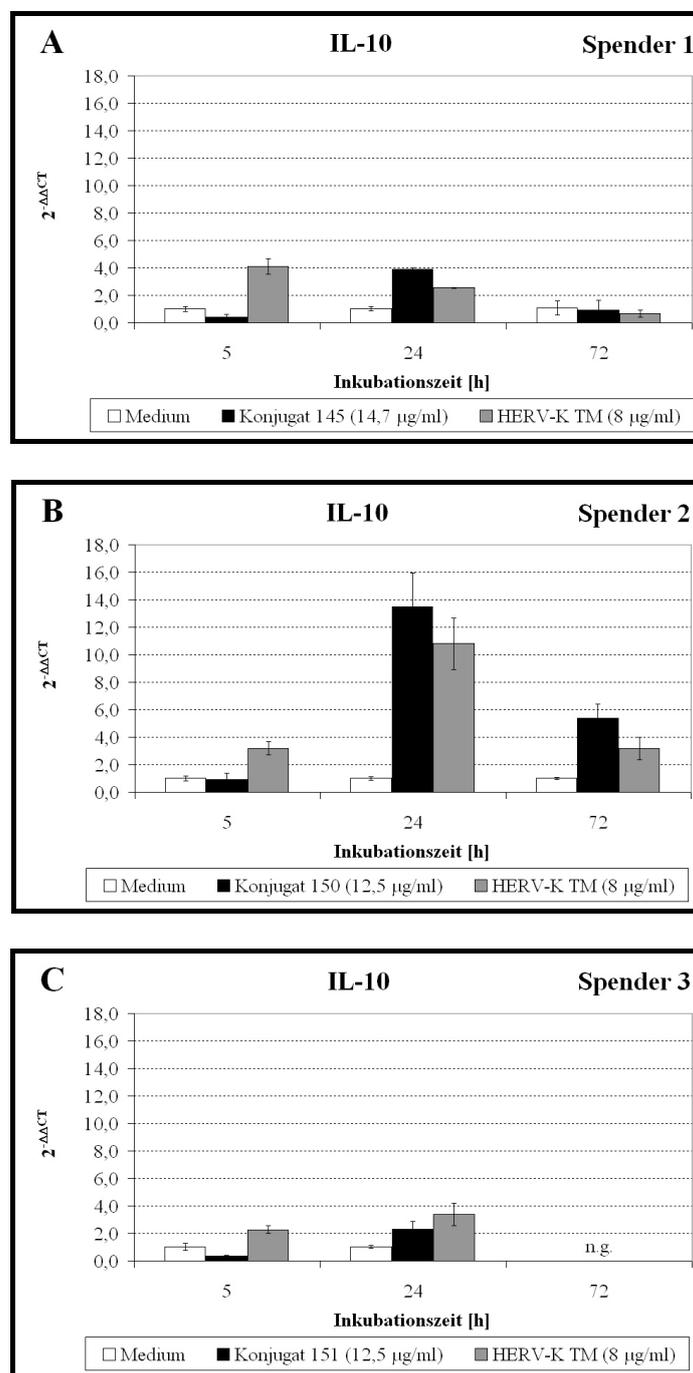


Abb. 5-11: Änderung des IL-10-Transkriptionslevels in humanen PBMCs

Expression der IL-10-mRNA nach 5, 24 und 72 Stunden Inkubation der PBMCs von Spender 1 (A), Spender 2 (B) und Spender 3 (C) mit 8 µg/ml HERV-K TM bzw. 14,7 µg/ml Konjugat 145 (A), 12,5 µg/ml Konjugat 150 (B) bzw. 12,5 µg/ml Konjugat 151 (C). Die mRNA wurde mittels One-Step quantitative Real-Time PCR in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Die relative Anzahl an IL-10-mRNA-Transkripten wurde auf die relative Anzahl an GAPDH-mRNA-Transkripten nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode normalisiert⁷². Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD; n.g. – nicht getestet.

Aus den Messdaten geht hervor, dass eine Inkubation mit 8 µg/ml HERV-K TM das IL-10-Transkriptionslevel im Vergleich zur Inkubation nur mit Medium nach fünf und nach 24 Stunden – in unterschiedlicher Ausprägung – ansteigen lässt. Eine Inkubation mit HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymer erhöht in humanen PBMCs die IL-10-Expression nach 24 Stunden. In allen Fällen sank die Höhe der Expression nach 72 Stunden wieder.

Das Expressionsmuster von Interferon- α 1 sah nach Inkubation der PBMCs unterschiedlicher Spender mit retroviralen Proteinen folgendermaßen aus:

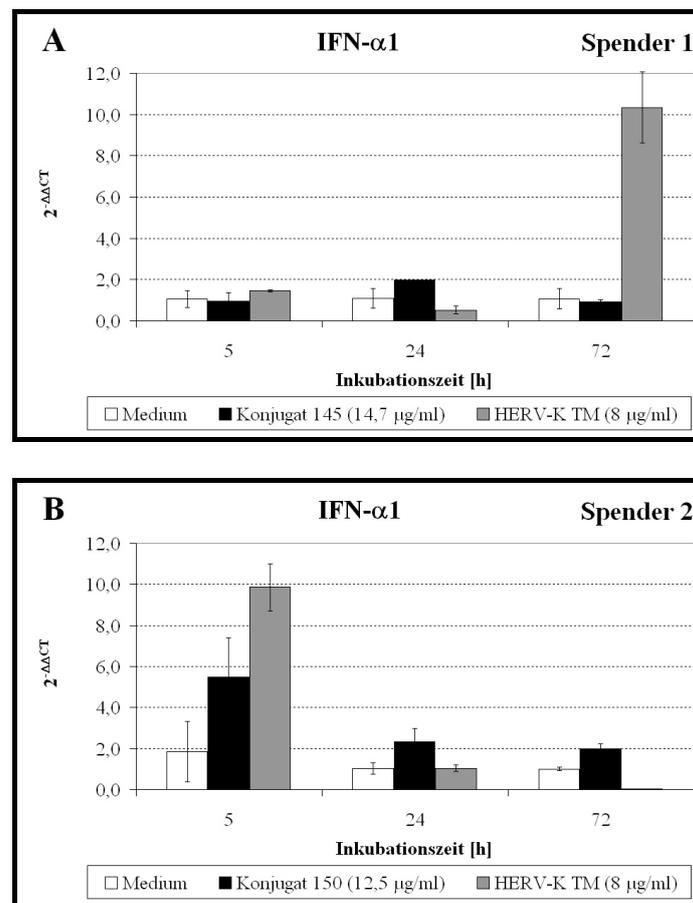


Abb. 5-12: Änderung des IFN- α 1-Transkriptionslevels in humanen PBMCs

Expression der IFN- α 1-mRNA nach 5, 24 und 72 Stunden Inkubation der PBMCs von Spender 1 (A) und Spender 2 (B) mit 8 µg/ml HERV-K TM bzw. 14,7 µg/ml Konjugat 145 (A) bzw. 12,5 µg/ml Konjugat 150 (B). Die mRNA wurde mittels One-Step quantitative Real-Time PCR in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Die relative Anzahl an IFN- α 1-mRNA-Transkripten wurde auf die relative Anzahl an GAPDH-mRNA-Transkripten nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode normalisiert⁷². Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

Interferon- α 1 wurde bei Spender 1 nach 24 h Inkubation mit Konjugat 145 leicht gesteigert exprimiert ($\Delta\Delta C_T$ -Wert: 2,0), war aber zu den anderen Messzeiten nicht auffällig (Abb. 5-12 A). Die Inkubation mit HERV-K TM löste 72 h nach Versuchsbeginn im Vergleich zur Kontrolle eine um den Faktor 10 gesteigerte IFN- α 1-Expression aus.

Ein $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 9,9 wurde bei Spender 2 bereits nach 5 h erreicht, allerdings wiesen hier auch die in Medium inkubierten Lymphozyten einen $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 1,8 auf. Daher ist das Transkriptionslevel für HERV-K TM in diesem Fall um den Faktor 5,5 erhöht (Abb. 5-12 B). Nach 24 h sank die Zahl der mRNA-Kopien auf den Wert der Kontrolle und wies nach 72 h einen $\Delta\Delta C_T$ -Wert von unter 0,1 auf. Nach 5 h Inkubation mit Konjugat 150 stieg die IFN- α 1-Expression auf das 3,1fache Niveau der Kontrolle und fiel anschließend auf einen $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 2,3 (nach 24 h) bzw. 2,0 (nach 72 h).

Die Ergebnisse für Interferon- α 1 sind sehr unterschiedlich. Hier muss in weiteren Versuchen die tatsächliche Veränderung Expressionsstärke für die untersuchten Inkubationszeiten ermittelt werden.

5.4. Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) nach Einwirkung von retroviralen Hüllproteinen

Um den Einfluss retroviraler Hüllproteine auf humane Lymphozyten weiter zu untersuchen, wurden letztere für einen, drei und sieben Tage mit rekombinantem HERV-K TM bzw. mit HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymer bei 37 °C inkubiert. Dabei sollte festgestellt werden, ob sich die Zahl der regulatorischen T-Zellen, die durch die Oberflächenproteine CD4 und CD25 sowie durch den intrazellulären Transkriptionsfaktor FoxP3 charakterisiert werden, verändert.

Die PBMCs wurden mit 12,5 μ g Konjugat 140/141 und 8 μ g HERV-K TM in PBMC-Nährmedium inkubiert. Es folgte die Markierung mit Antikörpern gegen die genannten, für regulatorische T-Zellen spezifischen Proteine und die Quantifizierung am Durchflusszytometer.

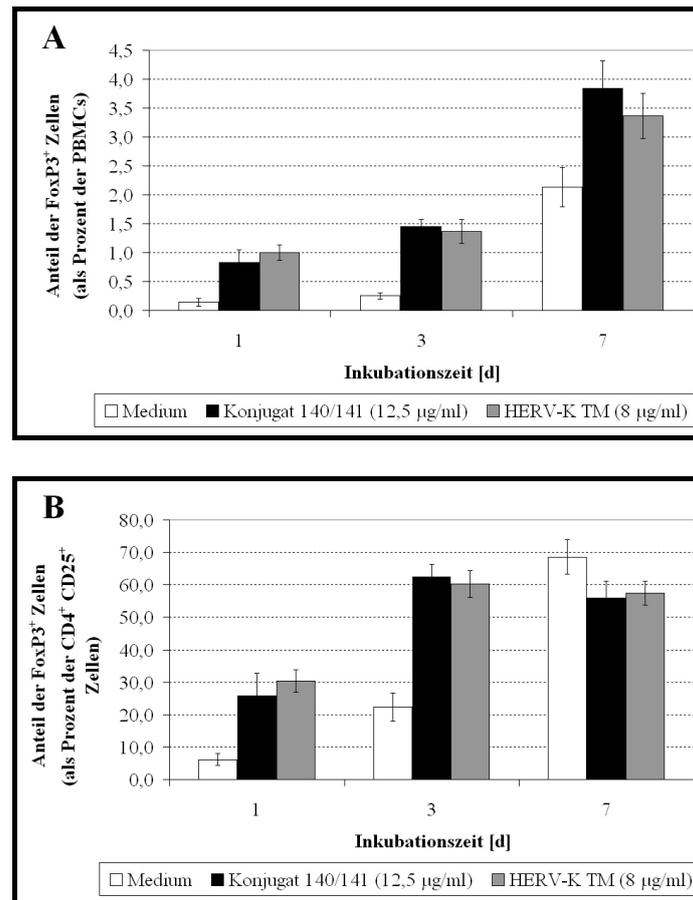


Abb. 5-13: Quantifizierung der FoxP3⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie

Prozentualer Anteil der FoxP3⁺ Zellen an der Gesamtheit der PBMCs (A) bzw. an den CD4⁺ CD25⁺ Zellen (B). Die PBMCs eines Spenders wurden für 1, 3 und 7 Tage mit 8 µg/ml HERV-K TM bzw. 12,5 µg/ml Konjugat 140/141 inkubiert. Anschließend erfolgte eine Markierung der Zellen mit Anti-CD4-APC, Anti-CD25-PE sowie Anti-FoxP3-FITC und die Quantifizierung der Antikörper-markierten Proteine am Durchflusszytometer. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten ± SD.

Der Anteil der FoxP3-positiven Zellen an der gesamten PBMC-Population war im Vergleich zur Kontrolle bei den mit retroviralen Proteinen inkubierten Zellen nach einem Tag um ca. 0,8 Prozentpunkte erhöht (Abb. 5-13 A). Diese Differenz vergrößerte sich nach drei Tagen auf ca. 1,1 Prozentpunkte und nach sieben Tagen auf 1,2 (HERV-K TM) bzw. 1,6 Prozentpunkte (Konjugat).

Für die Zahl der der FoxP3-positiven Zellen unter den CD4- und CD25-positiven Zellen fällt auf, dass unter den mit retroviralen Proteinen für einen Tag inkubierten Zellen etwa vier- bis fünfmal so viele PBMCs FoxP3 gebildet haben wie die in Medium inkubierten Zellen (Medium: 6,2 %, Konjugat: 25,9 %, HERV-K TM: 30,4 %; Abb. 5-13 B). Innerhalb der nächsten zwei Tage verdoppelte sich im Vergleich zu Tag 1 die Zahl der FoxP3-positiven Zellen bei den retroviralen Proteinen, wohingegen sie bei der Kontrolle den dreifachen Wert erreichte. Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen verdreifachte sich bei Inkubation im Medium die Zahl der FoxP3-positiven Zellen erneut (auf 69 %), während sie in den anderen

beiden Ansätzen leicht zurückging. Während die Zahl der $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ Zellen nach der Inkubation mit Medium stetig anstieg, erreichte sie nach Inkubation mit den retroviralen Proteinen nach drei Tagen ihr Maximum und sank anschließend leicht.

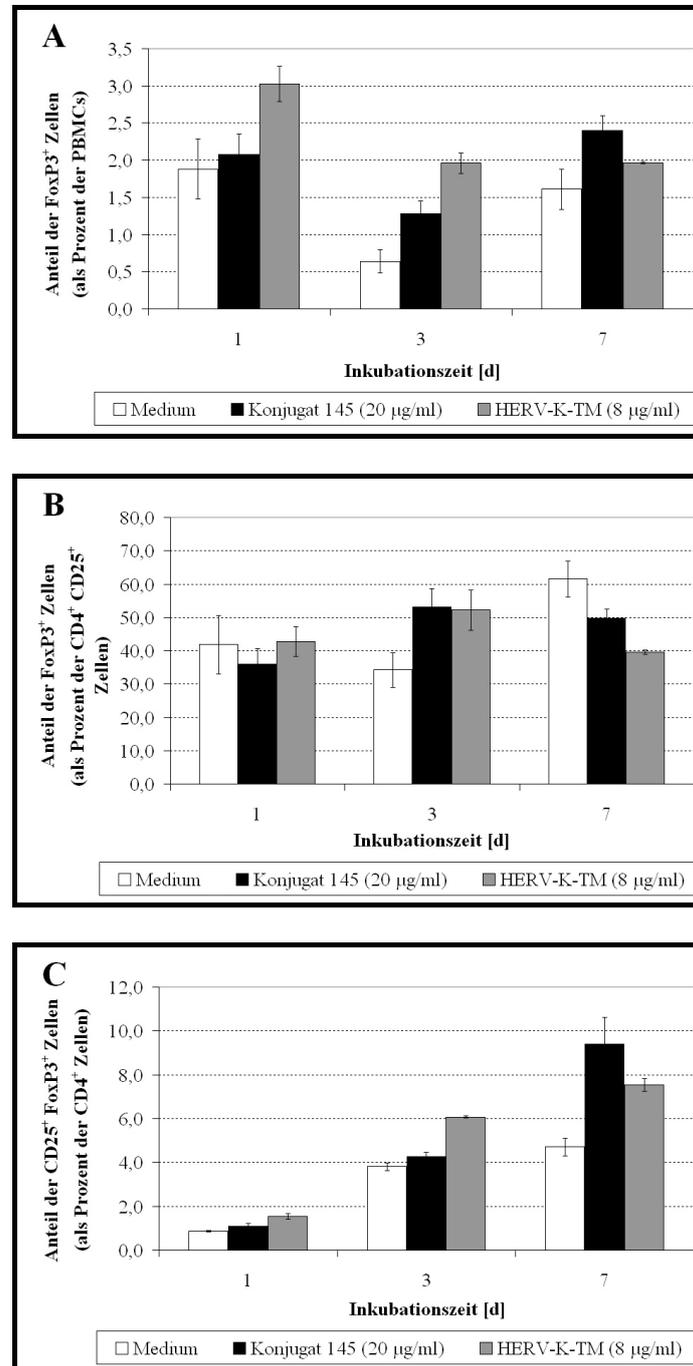


Abb. 5-14: Quantifizierung der $FoxP3^+$ Zellen sowie der $CD25^+ FoxP3^+$ Zellen mittels Durchflusszytometrie

Prozentualer Anteil der $FoxP3^+$ Zellen an der Gesamtheit der PBMCs (A) bzw. an den $CD4^+ CD25^+$ Zellen (B) sowie prozentualer Anteil der $CD25^+ FoxP3^+$ Zellen an den $CD4^+$ Zellen (C). Die PBMCs eines Spenders wurden für 1, 3 und 7 Tage mit 8 µg/ml HERV-K TM bzw. 20 µg/ml Konjugat 145 inkubiert. Anschließend erfolgte eine Markierung der Zellen mit Anti-CD4-APC, Anti-CD25-PE sowie Anti-FoxP3-FITC und die Quantifizierung der Antikörper-markierten Proteine am Durchflusszytometer. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SD.

Im Anschluss wurde der Versuch mit einem anderen Spender wiederholt. Hierbei lag die Zahl der FoxP3⁺ Zellen (Abb. 5-14 A) mit 1,9-3,0 % höher als bei dem oben beschriebenen Versuch (Abb. 5-13 A). Hier ist nur der Unterschied zwischen der Kontrolle und HERV-K TM deutlich erkennbar. Im weiteren Verlauf der Inkubation verringerte sich die Zahl der FoxP3-positiven Zellen. Drei Tage nach Beginn des Versuchs fiel der Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen deutlicher aus, relativierte sich aber nach 7 Tagen.

Bezieht man die FoxP3-positiven Zellen auf die Menge der CD4⁺ CD25⁺ PBMCs, sind am dritten Tag nach Inkubationsansatz deutliche Unterschiede zwischen Kontrollansatz und retroviralen Hüllproteinen aufgetreten (Abb. 5-14 B). Bei letzteren sank die Zahl jedoch anschließend wieder, wohingegen die in Medium inkubierten PBMCs deutlich mehr FoxP3 produzierten.

Zusätzlich wurde diesmal auch der Anteil der CD25⁺ FoxP3⁺ Zellen unter den CD4⁺ Zellen ermittelt, also die Zahl der regulatorischen T-Zellen unter den T-Lymphozyten (Abb. 5-14 C). Hier ist ein kontinuierlicher Anstieg des Anteils an regulatorischen T-Zellen im Verlauf des siebentägigen Versuchs deutlich zu erkennen: Während nach 24 Stunden 0,9 % (Medium) bis 1,5 % (HERV-K TM) der T-Lymphozyten aus regulatorischen T-Zellen bestanden, waren es nach drei Tagen 3,8-6,1 %. Bis zum Ende der Inkubationszeit erhöhte sich die Frequenz der CD25⁺ FoxP3⁺ unter den CD4⁺ Zellen bei den Kontrollansätzen nur geringfügig, wohingegen sie bei HERV-K TM auf 7,5 % und bei Konjugat 145 auf 9,4 % anstieg. Durch den Bezug der FoxP3⁺ Zellen auf die CD4⁺ Zellen ist erkennbar, dass die geringere Zahl der FoxP3⁺ Zellen nach drei Tagen (Abb. 5-14 A) auf eine verringerte Menge an CD4⁺ Zellen zurückzuführen ist.

Aus den beschriebenen Daten wurde eine Erhöhung der FoxP3⁺ Zellen festgestellt. Um die Kinetik am Anfang der Inkubationszeit besser analysieren zu können, wurden im Anschluss vier Versuche von jeweils 5, 24 und 72 h Dauer angesetzt. Dabei wurden die PBMCs verschiedener Blutspender verwendet.

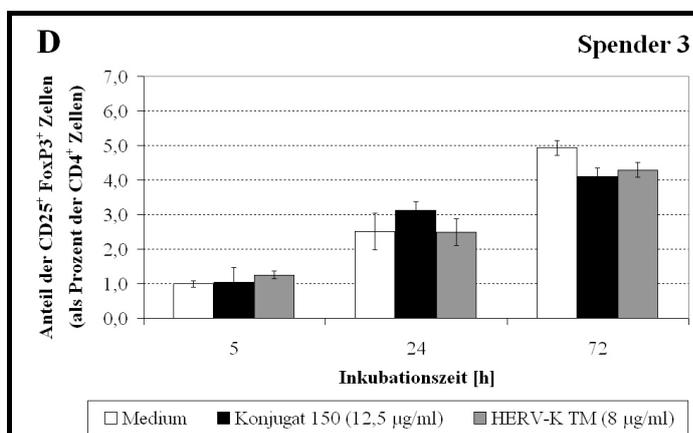
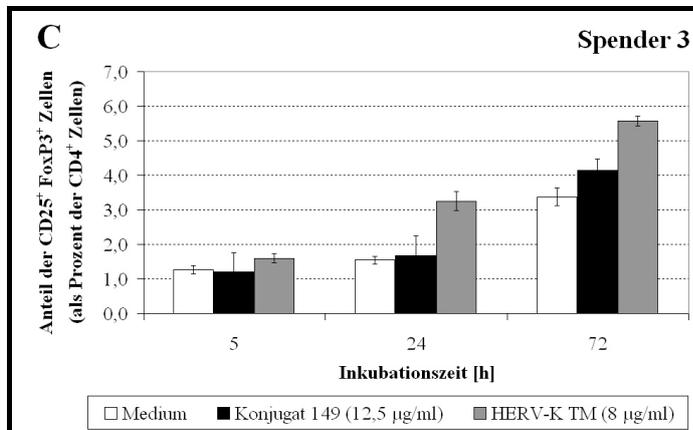
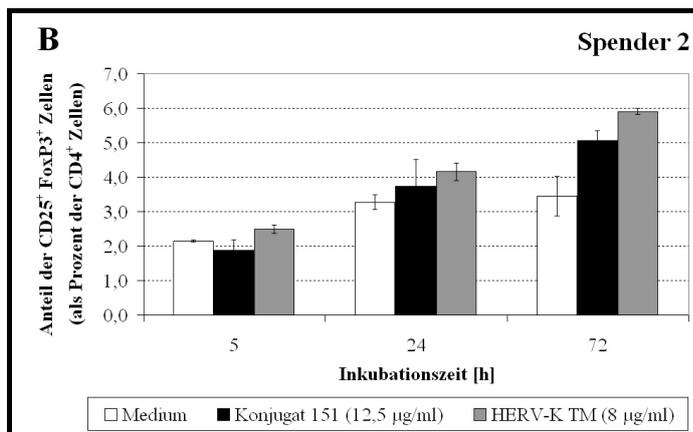
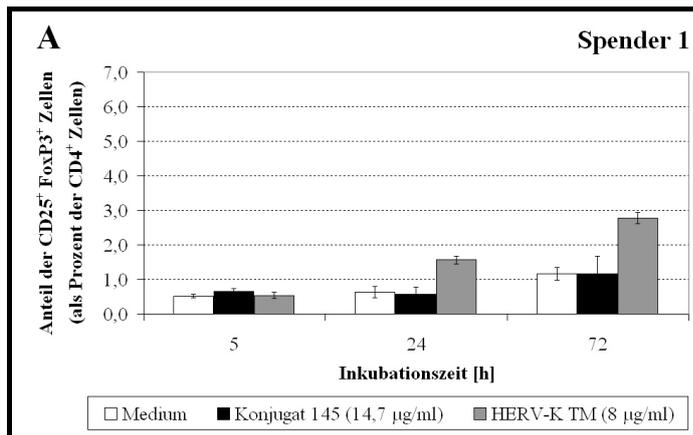


Abb. 5-15: Quantifizierung der CD25⁺ FoxP3⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie

Prozentualer Anteil der CD25⁺ FoxP3⁺ Zellen an den CD4⁺ Zellen. Die PBMCs von Spender 1 (A), Spender 2 (B) und Spender 3 (C+D) wurden für 5, 24 und 72 Stunden mit 8 µg/ml HERV-K TM bzw. 14,7 µg/ml Konjugat 145 (A), 12,5 µg/ml Konjugat 151 (B), 12,5 µg/ml Konjugat 149 (C) bzw. 12,5 µg/ml Konjugat 150 (D) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Markierung der Zellen mit Anti-CD4-APC, Anti-CD25-PE sowie Anti-FoxP3-FITC und die Quantifizierung der Antikörper-markierten Proteine am Durchflusszytometer. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten ± SD.

Durch Inkubation mit retroviralen Proteinen bzw. mit Medium wurden bei den PBMCs verschiedener Spender unterschiedliche Mengen regulatorischer T-Zellen induziert. Während letztere bei Spender 1 (Abb. 5-15 A) nur 0,5 % der CD4-positiven Zellen ausmachen, ist deren Anteil bei Spender 2 viermal so groß (Abb. 5-15 B). Die Zahl der gebildeten regulatorischen T-Zellen in den PBMCs des Spenders 3 liegt mit einem Prozent nach fünf Stunden Inkubationszeit im mittleren Bereich (Abb. 5-15 C + D). Bei drei der Messungen ist der Unterschied in der Frequenz der CD25⁺ FoxP3⁺ Zellen unter den CD4⁺ PBMCs zwischen Kontrolle und HERV-K TM deutlich (Abb. 5-15 A-C). Insgesamt steigt die Zahl der regulatorischen T-Zellen mit zunehmender Inkubationsdauer an.

Vergleicht man die Zahl der bei den Spendern 1-3 induzierten regulatorischen T-Zellen untereinander, so ist kein deutlicher Unterschied zwischen den Kontrollansätzen und den mit retroviralen Proteinen inkubierten Zellen zu erkennen. Tendenziell zeigen letztere jedoch eine erhöhte Bildung von CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Zellen (Abb. 5-15 A-C).

Der Anteil der regulatorischen T-Zellen an den CD4-positiven T-Lymphozyten lag bei den verschiedenen Blutspendern am Tag der Blutabnahme zwischen 0,5 % und 2,2 %. Im Gegensatz hierzu wurden in der Literatur Werte zwischen 5 und 10 % angegeben⁵⁶.

Die vorliegenden, mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten zeigen im Vergleich zu den Kontrollansätzen bei einer Inkubationszeit von drei Tagen – jede für sich genommen – für das rekombinante Transmembranprotein des humanen endogenen Retrovirus K einen geringfügig höheren Anteil an regulatorischen T-Zellen. Dies gilt ebenso für einige Messungen mit dem HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymer, allerdings nicht so konsequent wie für HERV-K TM.

5.5. Kinetik der Zytokinmodulation bei verschiedenen Blutspendern

Zusätzlich zur Charakterisierung der PBMCs mittels Antikörpern und der Bestimmung des RNA-Expressionslevels wurde die Menge an produziertem Interleukin-10 (IL-10) mittels ELISA bestimmt. Da IL-10 von Makrophagen und unter den T-Lymphozyten besonders von

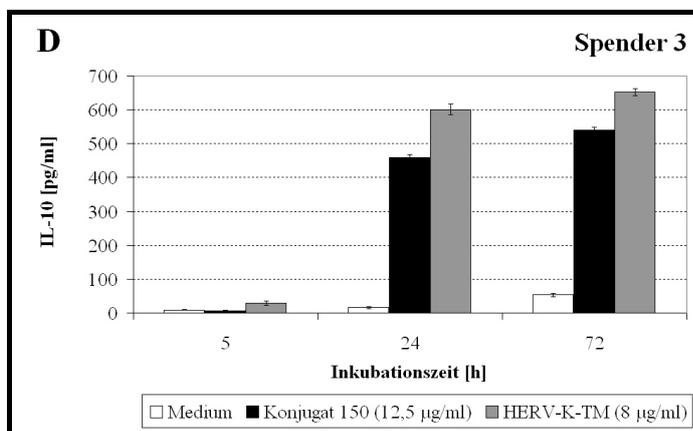
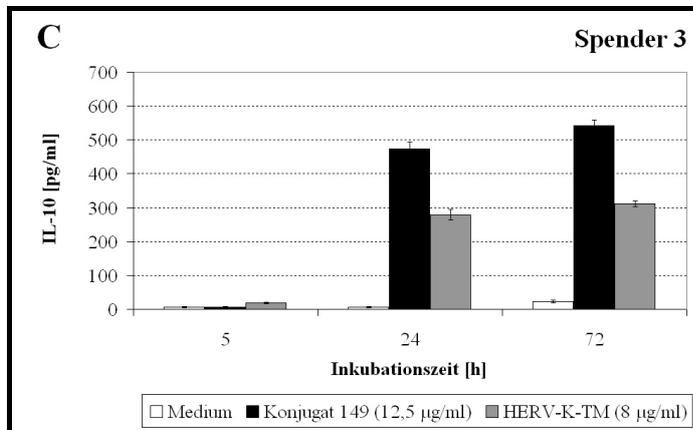
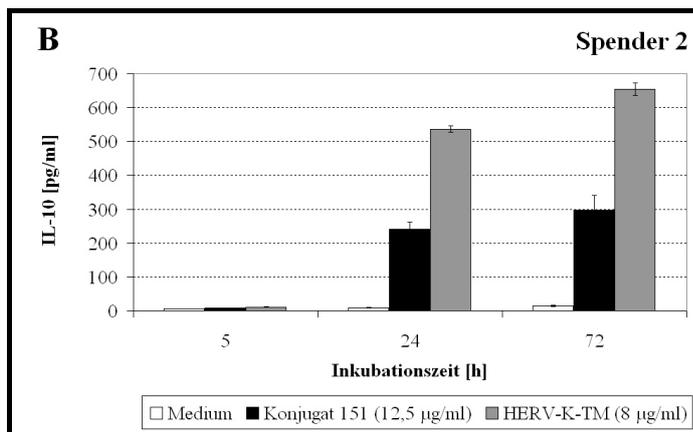
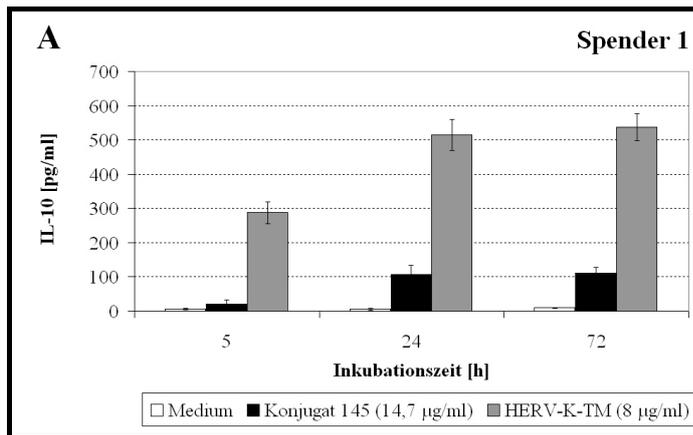


Abb. 5-16: Messung des Zytokingehaltes mittels ELISA

Gehalt an IL-10 im Kulturüberstand. Die PBMCs von Spender 1 (A), Spender 2 (B) und Spender 3 (C+D) wurden für 5, 24 und 72 Stunden mit 8 µg/ml HERV-K TM bzw. 14,7 µg/ml Konjugat 145 (A), 12,5 µg/ml Konjugat 151 (B), 12,5 µg/ml Konjugat 149 (C) bzw. 12,5 µg/ml Konjugat 150 (D) inkubiert. Anschließend wurde die IL-10-Konzentration in den Kulturüberständen mittels OptEIA™ Human IL-10 ELISA Set [BD Biosciences] und photometrischer Messung bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten ± SD.

den regulatorischen T-Zellen gebildet wird, konnte deren Anwesenheit auf diese Weise untersucht werden. Die Ausschüttung von IL-10 inhibiert die Expression von Klasse-II-MHC-Molekülen auf Makrophagen und verhindert bzw. beendet dadurch die Aktivierung von T-Zellen.

Durch die Wiederholung gleicher Versuchsansätze mit unterschiedlichen Blutspendern sollte die Ausschüttung von IL-10 in Abhängigkeit von der Herkunft der PBMCs untersucht werden.

Die IL-10-Ausschüttung war je nach eingesetztem retroviralem Protein unterschiedlich. Bereits nach 5 Stunden Inkubation mit HERV-K TM bildeten die PBMCs des Spenders 1 knapp 300 pg IL-10/ml (Abb. 5-16 A). In den übrigen drei Fällen konnte die Ausschüttung von IL-10 erstmalig nach 24 h nachgewiesen werden (Abb. 5-16 B-D). Betrachtet man die Ansätze mit den Konjugaten, so fällt auf, dass die Zytokinkonzentration zwischen 5 und 24 h nach Inkubationsbeginn stark ansteigt und sich innerhalb der nächsten zwei Tage noch etwas erhöht. Während die gemessene Konzentration zwischen den verschiedenen Spendern stark schwankt (Spender 1: ca. 100 pg/ml, Spender 2: 240-300 pg/ml, Spender 3: ca. 500 pg/ml), bleibt sie bei gleichem Blutspender konstant (Abb. 5-16 C, D). Für die Inkubation mit HERV-K TM verhält es sich genau umgekehrt: Hier beträgt die gemessene IL-10-Konzentration bei den PBMCs der drei Spender zwischen 500 und 650 pg/ml (Abb. 5-16 A, B, D), wohingegen bei Spender 3 einmal 300 pg/ml und einmal 600 pg/ml gemessen wurden.

Die Analyse der Kinetik der IL-10-Produktion zeigte für das HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymer nach den vier vorliegenden Versuchsergebnissen Unterschiede in Abhängigkeit vom Spender. Allerdings wurden hier auch jeweils neue Heteropolymer-Ansätze (Konjugat 145, 149, 150 bzw. 151) verwendet, so dass auch dies ein Grund für die Unterschiede sein könnte. Die Ausschüttung von IL-10 aus PBMCs zeigt dagegen für HERV-K TM – mit Ausnahme einer Messung (Abb. 5-16 C) – zu dem jeweiligen Messzeitpunkt bei den verschiedenen Spendern ähnliche Werte. Unabhängig vom eingesetzten retroviralem Protein stieg die IL-10-Ausschüttung nach 24 h stark an und erreichte nach 72 h noch nicht das Maximum.

6. Diskussion

6.1. Aufreinigung des transmembranen Hüllproteins HERV-K TM aus *Hansenula polymorpha*

Das transmembrane Hüllprotein des humanen endogenen Retrovirus K (gp36) wurde mit dem Ziel produziert, dessen Wirkung auf humane Lymphozyten zu untersuchen. Da eine erhöhte Expression von gp36 in malignen Melanomen nachgewiesen worden war^{38,39}, sollte nun ermittelt werden, ob HERV-K TM supprimierende Auswirkungen auf das Immunsystem hat. Dies wurde durch die Inkubation humaner Lymphozyten mit rekombinantem HERV-K TM *in vitro* und anschließendem Nachweis regulatorischer T-Zellen mittels Durchflusszytometrie und Real-Time-PCR untersucht.

Da bakterielle Endotoxine zu einer Immunmodulation in PBMCs führen, wurde die Verwendung eines eukaryotischen Expressionssystems gewählt. Das in *Hansenula polymorpha* RB11 produzierte HERV-K TM wurde durch Verwendung des Bindepuffers B in Lösung gebracht. Das Vortexen der Hefezellen mit Glasperlen erwies sich als effektivere Lyse-Methode im Vergleich zur vorher praktizierten 24stündigen Lyse in Bindepuffer B bei 37 °C (Abb. 5-2).

Aus der Western Blot-Analyse der Hefezell-Lysate mit Bindepuffer B geht hervor, dass ein großer Teil des von der Hefe synthetisierten HERV-K TM im Zellpellet verblieben ist (Abb. 5-2). Durch den Test weiterer, hier nicht untersuchter Detergenzien könnte die Ausbeute demnach noch gesteigert werden. Schiller et al. versuchten zum Beispiel, einen membrangebundenen Rezeptor aus *Pichia pastoris* mit Cymal-6, Cholat bzw. verschiedenen Gluco- und Maltopyranosiden zu solubilisieren, wobei schließlich *n*-dodecyl- β -D-Maltopyranosid verwendet wurde⁷⁴. Abgesehen von der Art des Detergenzes ist auch dessen Konzentration von entscheidender Bedeutung. Und schließlich darf der Puffer, in dem gp36 am Ende in gelöster Form vorliegen soll, die PBMCs nicht schädigen. Um den optimalen Solubilisierungspuffer für HERV-K TM zu finden, bedarf es noch weiterer Untersuchungen. Der eingesetzte Bindepuffer B reichte für die Gewinnung der in dieser Arbeit benötigten Proteinmengen jedoch völlig aus.

6.2. Produktion des transmembranen Hüllproteins PERV p15E durch *Hansenula polymorpha*

Ebenso wie HERV-K TM sollte auch PERV p15E rekombinant in *Hansenula polymorpha* produziert werden, um es auf mögliche immunmodulierende Auswirkungen auf humane Lymphozyten zu untersuchen. Da die Isu-Domäne von PERV-A identisch mit der CKS-17-Sequenz ist (Abb. 1-3) und da für letzteres Peptid bereits immunsuppressive Auswirkungen auf humane PBMCs nachgewiesen worden waren¹⁸, sind letztere auch für PERV p15E denkbar.

Die Sequenz des transmembranen Hüllproteins war zwar ins Genom integriert worden (Abb. 5-4, Abb. 5-5), doch wurde das Protein selbst von *Hansenula polymorpha* RB11 nicht gebildet (Abb. 5-6, Abb. 5-7). Da die Produktion von HERV-K TM in diesem Hefestamm gut funktioniert hatte, war dieser mit dem gleichen Expressionsvektor transfiziert worden, nur dass er diesmal die Sequenz von PERV p15E enthielt. Es ist bekannt, dass die Fähigkeit von Hefen, ein Protein zu bilden, von diesem selbst abhängt. Daher kann versucht werden, PERV p15E in anderen Hefeorganismen zu produzieren. Neben *Saccharomyces cerevisiae* ist zur Proteinproduktion besonders *Pichia pastoris* ein häufig genutzter Organismus.

Zunächst sollte jedoch untersucht werden, ob die Position des His-Tags möglicherweise eine negative Auswirkung auf die Faltung von PERV p15E hat, was zu der Proteolyse durch die Hefe führen könnte. Hierzu könnte der His-Tag an das andere Ende der Sequenz von PERV p15E kloniert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Bildung des retroviralen Proteins nicht durch den Mox-Promotor sondern durch einen Peroxysomen-Promotor zu induzieren, so dass PERV p15E in den Peroxysomen angereichert wird. Dort wäre es vor dem Abbau durch Proteasen geschützt.

6.3. Expressionslevels von FoxP3, IL-10 und IFN- α 1

Zur Untersuchung möglicher immunsuppressiver Auswirkungen von HERV-K TM bzw. des HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymers auf PBMCs wurde die mRNA letzterer auf die Bildung von FoxP3, IL-10 und IFN- α 1 mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht. Die Daten zeigten, dass im Vergleich zur Kontrolle nach 5 und nach 24 Stunden Inkubation mit HERV-K TM bzw. Konjugat das Expressionslevel von IL-10 gestiegen war (Abb. 5-11). Haraguchi et al. ermittelten nach 5 h Inkubation von PBMCs mit dem CKS-17-Dimer

ebenfalls einen Anstieg der IL-10-mRNA-Expression¹⁸. Für die Expression von FoxP3 sind nach einer Zeit von 5 Stunden erhöhte Werte gemessen worden (Abb. 5-10), wohingegen für IFN- α 1 weitere Untersuchungen zeigen müssen, wie die Expression hier durch retrovirale Proteine beeinflusst wird. Eine mehrmalige Wiederholung des Versuches könnte zeigen, ob eine Regelmäßigkeit in der IFN- α 1-mRNA-Expression auftritt. In jedem Fall ist die Analyse der Expression von IFN- α 2 noch von besonderem Interesse: Durch ihre Homologie zu zwei der fünf α -Helices von IFN- α könnten HIV-Isu und MuLV-Isu mit dem IFN- α -Rezeptor interagieren, wodurch eine Veränderung in dessen Expression (und somit in der Expression von IFN- α 1 und IFN- α 2) ausgelöst werden könnte²².

Bei der Untersuchung der Expression von FoxP3, IL-10 und IFN- α 1 wurden jeweils unterschiedliche Werte ermittelt, so dass nicht auf ein allgemeines Expressionsprofil jedes Gens geschlossen werden konnte. Dies kann mehrere Ursachen haben:

Zum einen hat die Qualität der RNA Einfluss auf die Amplifikation der Gene. Bei der Aufreinigung der RNA mit dem RNeasy Mini Kit [Qiagen] wurden $1,8 \times 10^6$ Zellen pro RNeasy-Säule verwendet. Die Reinheit der RNA lag meist bei einem Quotienten von OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,8 und 2,0. Eine Verunreinigung mit Proteinen lag somit nicht vor. Allerdings kann mit dem Photometer nicht bestimmt werden, ob die RNA degradiert ist und wie groß dieser Anteil bezogen auf die eingesetzten 50 ng/Ansatz ist. Dies könnte ein Grund für die großen Unterschiede in der Expression von IFN- α 1 sein (Abb. 5-12).

Hinzu kommt, dass aufgrund der unterschiedlichen Temperaturprofile von GAPDH und IL-10 bzw. IFN- α 1 die RNA nicht gleichzeitig in einem Ansatz amplifiziert werden konnte. Dies war nur für FoxP3 und GAPDH möglich. Bei der Normalisierung auf GAPDH stammten die Werte also aus verschiedenen, zum Teil an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Amplifikationen.

Weiterhin ist wahrscheinlich, dass die HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymere (Konjugat 145, 149, 150, 151) eine unterschiedlich starke Expression der untersuchten Gene bewirkte. Bedingt durch die Synthesemethode enthalten die isolierten Konjugate nach der Dialyse (MWCO 1 kDa) Homo- und Heteropolymere, die größer als 1 kDa sind. In vorangegangenen Untersuchungen wurde jedoch für HIV-Isu-Homopolymere gezeigt, dass erst Polymere ab einer Größe von 30 kDa eine immunsupprimierende Auswirkung auf humane PBMCs haben⁷³. Ein großer Teil des Heteropolymer-Gemisches ist also biologisch nicht aktiv und kann zu sterischen Hinderungen bei der Interaktion der über 30 kDa großen Polymere mit den Lymphozyten führen. Hinzu kommt, dass bei wachsender Polymergröße die Möglichkeiten

für Quervernetzungen an den Seitenketten der Aminosäuren ansteigen, so dass es unwahrscheinlich ist, dass in zwei Syntheseansätzen gleiche Heteropolymeregemische entstehen.

Um diese Schwankungen in der Zusammensetzung der HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymere zu umgehen, könnte versucht werden, das Protein rekombinant in *Hansenula polymorpha* zu exprimieren. Dadurch hätte es stets die gleiche Länge und Zusammensetzung, die durch die DNA-Sequenz vorgegeben wäre. Hinzu kommt, dass eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben wäre, da auch HERV-K TM in der gleichen Hefeart exprimiert wurde.

6.4. Induktion regulatorischer T-Zellen

Bei der durchflusszytometrischen Messung der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3-positiven Zellen konnte im Vergleich zu den Kontrollansätzen bei einer Inkubationszeit von drei Tagen für das rekombinante HERV-K TM ein höherer Anteil an regulatorischen T-Zellen festgestellt werden (Abb. 5-15). Sowohl für HERV-K TM als auch für Konjugat 145 wurde im Vergleich zur Kontrolle ein deutlicher Anstieg der Zahl an Tregs nach sieben Tagen beobachtet (Abb. 5-14 C). Nach drei Tagen Inkubation mit HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymer lag zum Teil ebenfalls eine Erhöhung der Zahl an Tregs vor. Insgesamt waren die Unterschiede zwischen den Kontrollansätzen und den Ansätzen mit retroviralen Proteinen gering. Der Anteil der FoxP3-positiven Zellen an den CD4- und CD25-positiven Zellen stieg generell mit zunehmender Dauer der Inkubation an.

Bei einem Vergleich des Anteils der regulatorischen T-Zellen an den CD4-positiven Zellen am Tag der Blutabnahme, wird eine Abhängigkeit vom Blutspender deutlich: So lag dieser Anteil z.B. bei Spender 1 bei 0,5 %, während er bei Spender 2 mit 2 % viermal so groß war. Im Gegensatz hierzu waren bei gesunden Spendern zwischen 5 und 10 % der CD4⁺ Zellen CD4/CD25-positiv⁵⁶ und 6 % der CD4⁺ Zellen waren FoxP3/CD4-positiv⁷⁵. Zwar sind die gemessenen Anteile an Tregs nicht direkt mit denen aus der Literatur vergleichbar; bedenkt man jedoch, dass bei Mäusen, deren Anteil an CD4⁺ CD25⁺ Zellen ebenfalls 5-10 % der CD4⁺ Zellen beträgt, 65-82 % der CD4⁺ CD25⁺ Zellen FoxP3 exprimieren, so erscheinen die hier gemessenen 0,5 bis 2 % recht niedrig. Möglicherweise könnten bei einer Erhöhung der Konzentration an Anti-CD4-, Anti-CD25- und Anti-FoxP3-Antikörpern mehr Tregs gefärbt werden. In der Arbeitsgruppe waren routinemäßig 5 µl des Antikörpers auf 1,8 x 10⁶ Zellen

eingesetzt worden, wohingegen der Hersteller 20 μl auf 1×10^6 Zellen in einem Volumen von 100 μl empfohlen hatte.

6.5. Produktion von IL-10

Als Folge der Inkubation mit retroviralen Proteinen wurde im Vergleich zur Inkubation mit Medium in allen Fällen nach einem und nach drei Tagen eine hundert bis über sechshundertfache Steigerung der IL-10-Produktion gemessen (Abb. 5-16). Nach der Inkubation mit HERV-K TM lag die IL-10-Konzentration in drei Fällen auf gleichem Niveau (Abb. 5-16 A, B, D). Im Gegensatz hierzu wurden nach der Inkubation mit Konjugat bei unterschiedlichen Spendern verschiedene IL-10-Konzentrationen (Abb. 5-16 A-C) und bei gleichem Spender auch gleiche IL-10-Konzentrationen gemessen.

Bereits in vorangegangenen Untersuchungen war gezeigt worden, dass verschiedene Peptid-Kopplungen die Bildung von IL-10 durch PBMCs unterschiedlich stark induzierten⁷³. Daher sind die Konjugate vor der Verwendung in den geplanten Experimenten stets in einem Vorversuch mit PBMCs inkubiert worden (siehe Abb. 5-8). Zur Verwendung des Konjugates in den Experimenten sollte der gemessene IL-10-Wert nach 24 h Inkubation mit 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Konjugat optimalerweise über 300 pg/ml betragen, damit es eine immunsupprimierende Wirkung auf PBMCs ausüben konnte. Da 25 $\mu\text{g/ml}$ von Konjugat 145 in humanen mononuklearen Zellen nur 330 pg/ml IL-10 induzierten, wurden statt 12,5 $\mu\text{g/ml}$ zur Messung der Induktion von Tregs 20 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt (siehe Abb. 5-14). Nach der Inkubation der PBMCs stellte sich allerdings heraus, dass diese sich in ihrer Struktur verändert hatten und sich schlechter mit Antikörpern markieren ließen. Letzteres war daran erkennbar, dass das Durchflusszytometer nur noch knapp 20000 (statt 30000, siehe 4.3.5) markierte Zellen detektierte. Es wurde vermutet, dass die eingesetzte Konzentration an Konjugat 145 einen toxischen Effekt auf PBMCs hatte. Daher wurden in den folgenden Untersuchungen trotz der im Vorversuch ermittelten geringen IL-10-Werte nur noch 14,7 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt (siehe Abb. 5-10 A bis Abb. 5-12 A, Abb. 5-15 A, Abb. 5-16 A). Aufgrund weiterhin beobachteter negativer Effekte (deformierte PBMCs, geringer RNA-Gehalt) wurden von Konjugat 151 schließlich 12,5 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt, obwohl die Menge an induziertem IL-10 im Vorversuch gering war (Abb. 5-8). Im Gegensatz hierzu wurde in PBMCs des Spenders 2 die vierfache Menge an IL-10 gebildet (Abb. 5-16 B). Dies deutet darauf hin, dass bei gleich bleibendem Konjugat-Ansatz die Menge an gebildeten IL-10 vom Spender abhängen könnte, so wie es

bereits gezeigt worden ist⁷³. In dieser Untersuchung sind jedoch in den vier Messungen des Zytokingehaltes vier unterschiedliche Konjugate eingesetzt worden, so dass eine Spenderabhängigkeit der Zytokindistribution nicht zweifelsfrei bestätigt werden konnte. Die Synthese größerer Mengen an HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymer gelang bisher nicht. Möglicherweise könnte eine Produktion des Heteropolymers rekombinant in *Hansenula polymorpha* einen ausreichend hohen Ertrag erbringen.

6.6. Ausblick

In dieser Arbeit wurde unter anderem die Auswirkung des HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymers auf humane PBMCs untersucht. Bedingt durch die Synthese ist dieses „Heteropolymer“ ein Gemisch aus Polymeren, die größer als 1 kDa sind. Um die Polymere mit der größten immunsuppressiven Wirkung zu identifizieren, könnte das Heteropolymer-Gemisch mittels HPLC in einzelne Fraktionen aufgeteilt und anschließend durch Massenspektroskopie analysiert werden. Die Fraktionen müssten dann mit humanen PBMCs inkubiert und die IL-10-Konzentration als Anhaltspunkt für die immunsuppressive Wirkung bestimmt werden.

Zur Vermeidung von Endotoxinen wurde HERV-K TM in *Hansenula polymorpha* RB11 produziert. Damit nach der Inkubation von PBMCs mit HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymer und rekombinantem HERV-K TM die erarbeiteten Daten besser vergleichbar sind, sollte das erstere Protein ebenfalls in dem genannten Hefestamm produziert werden. Das hätte auch den Vorteil, dass – bedingt durch die vorgegebene DNA-Sequenz – die Aminosäuresequenz stets gleich wäre. Da HIV-Isu an ein Trägermolekül gekoppelt sein muss, damit es eine immunsuppressive Wirkung auf PBMCs hat, könnte zum Beispiel die DNA-Sequenz von HIV-Isu an diejenige von BSA kloniert werden.

Damit die Ergebnisse aus verschiedenen Inkubationsversuchen miteinander besser vergleichbar sind, wäre die Etablierung einer humanen Zelllinie hilfreich. Somit könnten variierende Messergebnisse, die auf den unterschiedlichen Immunstatus verschiedener Spender zurückgehen, vermieden werden.

Zusammenfassung

Retrovirale Infektionen sind oft mit opportunistischen Infektionen auf der Basis eines supprimierten Immunsystems assoziiert. Es stellt sich die Frage, ob der Mechanismus der Induktion dieser Immunsuppression bei allen Retroviren identisch ist. Wegen ihrer konservierten Aminosäuresequenz – insbesondere in der sogenannten immunsuppressiven Domäne – wurde für die transmembranen Hüllproteine eine mögliche Beteiligung daran vermutet. Bei Versuchen *in vitro* und *in vivo* konnten bereits einige immunsuppressive Eigenschaften beschrieben werden. Als Ergänzung wurde in dieser Arbeit die Zytokinmodulation und die Induktion regulatorischer T-Zellen (Tregs) durch retrovirale Proteine untersucht.

Hierzu wurde zunächst das transmembrane Hüllprotein des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K TM) rekombinant hergestellt. Zur Vermeidung von Endotoxinen, die die Versuchsergebnisse verfälschen könnten, wurde zur Expression der Hefestamm *Hansenula polymorpha* RB11 verwendet. Die Aufreinigung von HERV-K TM aus dem Hefezellpellet wurde durch die Verwendung entsprechender Puffer und Glasperlen bei der Lyse optimiert.

Die Produktion des transmembranen Hüllproteins p15E des porcinen endogenen Retrovirus in *Hansenula polymorpha* RB11 muss noch weiter optimiert werden. Weiterhin wurden die immunsuppressiven Domänen von HIV-1 und MuLV in der Form eines Heteropolymers untersucht.

Nach der Inkubation humaner PBMCs mit HERV-K TM bzw. mit dem HIV-Isu/MuLV-Isu-Heteropolymer wurde für FoxP3, IL-10 und IFN α 1 eine Erhöhung des mRNA-Expressionslevels gemessen. Diese trat nach einer Inkubationszeit von fünf Stunden bzw. bei IL-10 auch nach 24 Stunden auf. Parallel dazu wurde eine 500 bis 600fach erhöhte Freisetzung von IL-10 im Überstand der behandelten Zellen gemessen.

Die Zahl der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs wurde nach Inkubation humaner PBMCs mit den genannten retroviralen Peptiden bzw. Proteinen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass insbesondere HERV-K TM eine geringfügige Steigerung der Zahl an regulatorischen T-Zellen bewirkte. Dieser Anstieg bestätigt die Daten der Expressionsanalyse von FoxP3.

Die hier gezeigte Induktion regulatorischer T-Zellen *in vitro* lässt vermuten, dass dies auch bei einer Infektion mit einem Retrovirus *in vivo* geschieht. Somit konnten weitere Erkenntnisse über den Mechanismus der Immunsuppression gewonnen werden.

Literaturverzeichnis

- ¹ Freed, E.O., Myers, D.J., Risser, R. (1989): Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J. Virol.* **63**: 4670-4675
- ² McCune, J.M., Rabin, L.B., Feinberg, M.B., Lieberman, M., Kosek, J.C., Reyes, G.R., Weissman, I.L. (1988): Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**: 55-67
- ³ Dalgleish, A.G., Beverly, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., Weiss, R.A. (1984): The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**: 763-767
- ⁴ Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C., Montagnier, L. (1984): T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**: 767-768
- ⁵ Alkhatib, G., Broder, C.C., Berger, E.A. (1996): Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. *J. Virol.* **70**: 5487-5494
- ⁶ Simmons, G., Wilkinson, D., Reeves, J.D., Dittmar, M.T., Beddows, S., Weber, J., Carnegie, G., Desselberger, U., Gray, P.W., Weiss, R.A., Clapham, P.R. (1996): 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.* **70**: 8355-8360
- ⁷ Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1997): Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**: 426-430
- ⁸ Shnaper, S., Sackett, K., Gallo, S.A., Blumenthal, R., Shai, Y. (2004): The C- and the N-terminal regions of glycoprotein 41 ectodomain fuse membranes enriched and not enriched with cholesterol, respectively. *J. Biol. Chem.* **279**: 18526-18534
- ⁹ Denner, J., Norley, S., Kurth, R. (1994): The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *AIDS* **8**: 1063-1072
- ¹⁰ Cianciolo, G.J., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Snyderman, R. (1985): Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science* **230**: 453-455
- ¹¹ Mullins, J.I., Chen, C.S., Hoover, E.A. (1986): Disease-specific and tissue-specific production of unintegrated feline leukaemia virus variant DNA in feline AIDS. *Nature* **319**: 333-336
- ¹² Hoover, E.A., Mullins, J.I., Quackenbush, S.L., Gasper, P.W. (1987): Experimental transmission and pathogenesis of immunodeficiency syndrome in cats. *Blood* **70**: 1880-1892
- ¹³ Cianciolo, G., Bogerd, H., Snyderman, R. (1988): Human retrovirus-related synthetic peptides inhibit T lymphocyte proliferation. *Immunol. Lett.* **19**: 7-13
- ¹⁴ Denner, J., Persin, C., Vogel, T., Haustein, D., Norley, S., Kurth, R. (1996): The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **12**: 442-450
- ¹⁵ Ruegg, C., Monell, C., Strand, M. (1989): Inhibition of lymphoproliferation by a synthetic peptide with sequence identity to gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **63**: 3257-3260
- ¹⁶ Barcova, M., Kacani, L., Speth, C., Dierich, M. (1998): 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.* **177**: 905-913
- ¹⁷ Takeshita, S., Breen, E., Ivashchenko, M., Nishanian, P., Kishimoto, T., Vredevoe, D., Martinez-Maza, O. (1995): 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.* **165**: 234-242
- ¹⁸ Haraguchi, S., Good, R.A., James-Yarish, M., Cianciolo, G.J., Day, N.K. (1995): 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* **92**: 3611-3615
- ¹⁹ Chen, Y., Wu, W., Yang, J., Sui, S., Sun, J., Dierich, M. (1999): Antibodies against human IFN-alpha and -beta recognized the immunosuppressive domain of HIV-1 gp41 and inhibit gp41-binding to the putative cellular receptor protein p45. *Immunol. Lett.* **69**: 253-257
- ²⁰ Chen, Y.H., Stoiber, H., Dierich, M.P. (1997): Increased levels of antibodies against interferon-alpha in HIV-1 positive individuals may be explained by a common immunological epitope on the human interferon-alpha and HIV-1 gp41. *Immunol. Lett.* **55**: 15-18
- ²¹ Ruegg, C.L., Strand, M. (1990): Identification of a decapeptide region of human interferon- α with antiproliferative activity and homology to an immunosuppressive sequence of the retroviral transmembrane protein p15E. *J. Interferon Res.* **10**: 621-626
- ²² Denner, J. (1998): Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **862**: 75- 86

- ²³ Le Tissier, P., Stoye, J.P., Takeuchi, Y., Patience, C., Weiss, R.A. (1997): Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* **389**: 681-682.
- ²⁴ Patience, C., Takeuchi, Y., Weiss, R.A. (1997): Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* **3**: 282-286
- ²⁵ Specke, V., Rubant, S., Denner, J. (2001): Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology* **285**: 177-180
- ²⁶ Ericsson, T., Oldmixon, B., Blomberg, J., Rosa, M., Patience, C., Andersson, G. (2001): Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine. *J. Virol.* **75**: 2765-2770
- ²⁷ Patience, C., Switzer, W.M., Takeuchi, Y., Griffiths, D.J., Goward, M.E., Heneine, W., Stoye, J.P., Weiss, R.A. (2001): Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol.* **75**: 2771-2775
- ²⁸ Denner, J., Specke, V., Schwendemann, J., Tacke, S.J. (2001): Porcine endogenous retroviruses (PERVs): adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Ann. Transplant.* **6**: 25-33
- ²⁹ Loss, M., Arends, H., Winkler, M., Przemeczek, M., Steinhoff, G., Rensing, S., Kaup, F., Hedrich, H., Winkler, M., Martin, U. (2001): Analysis of potential porcine endogenous retrovirus (PERV) transmission in a whole-organ xenotransplantation model without interfering microchimerism. *Transplant Int.* **14**: 31-37
- ³⁰ Specke, V., Tacke, S., Boller, K., Schwendemann, J., Denner, J. (2000): Porcine endogenous retroviruses: in vitro host range and attempts to establish small animal models. *J. Gen. Virol.* **82**: 837-844
- ³¹ Bannert, N., Kurth, R. (2006): The Evolutionary Dynamics of Human Endogenous Retroviral Families. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **7**: 149-173
- ³² Löwer, R., Löwer, J., Kurth, R. (1996): The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**: 5177-5184
- ³³ Mayer, J., Sauter, M., Racz, A., Scherer, D., Mueller-Lantzsch, N., Meese, E. (1999): An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nat Genet* **21**: 257-258
- ³⁴ Hohenadl, C., Germaier, H., Walchner, M., Hagenhofer, M., Herrmann, M., Stürzl, M., Kind, P., Hehlmann, R., Erfle, V., Leib-Mösch, C. (1999): Transcriptional activation of endogenous retroviral sequences in human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* **113**: 587-594
- ³⁵ Ono, M., Kawakami, M., Ushikubo, H. (1987): Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J Virol* **61**: 2059-2062
- ³⁶ Löwer, R., Löwer, J., Frank, H., Harzmann, R., Kurth, R. (1984): Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J Gen Virol* **65**: 887-898
- ³⁷ Herbst, H., Sauter, M., Kuhler-Obbarius, C., Loning, T., Mueller-Lantzsch, N. (1998) Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in germ cell and trophoblastic tumors. *APMIS* **106**: 216-220
- ³⁸ Muster, T., Waltenberger, A., Grassauer, A., Hirschl, S., Caucig, P., Romirer, I., Födinger, D., Seppel, H., Schanab, O., Magin-Lachmann, C., Löwer, R., Jansen, B., Pehamberger, H., Wolff, K. (2003): An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res* **63**: 8735-8741
- ³⁹ Büscher, K., Trefzer, U., Hofmann, M., Sterry, W., Kurth, R., Denner, J. (2005): Expression of Human Endogenous Retrovirus K in Melanomas and Melanoma Cell Lines. *Cancer Res* **65**: 4172-4180
- ⁴⁰ Büscher, K., Hahn, S., Hofmann, M., Trefzer, U., Ozel, M., Sterry, W., Löwer, J., Löwer, R., Kurth, R., Denner, J. (2006): Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanoma cell lines. *Melanoma Res.* **16**: 223-234
- ⁴¹ Dao Thi, V.L. (2006): Die Induktion von CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen durch transmembrane Hüllproteine von Retroviren, Diplomarbeit, Technische Universität Berlin
- ⁴² Jerne, N.K. (1955): The natural-selection theory of antibody formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **41**: 849-857
- ⁴³ Burnet, F.M. (1957): A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Australian Journal of Science* **20**: 67-69
- ⁴⁴ Sakaguchi, S. (2005): Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **6**: 345-352
- ⁴⁵ Gershon, R.K., Kodo, K. (1971): Infectious immunological tolerance. *Immunology* **21**: 903-914
- ⁴⁶ Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Ito, M., Toda, M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**: 1151-1164
- ⁴⁷ Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2003): Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor FoxP3. *Science* **299**: 1057-1061
- ⁴⁸ Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. (2003): FoxP3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**: 330-336
- ⁴⁹ Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., Ramsdell, F. (2003): An essential role for Scurfin in CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* **4**: 337-342

- ⁵⁰ Fehervari, Z., Sakaguchi, S. (2004): CD4⁺ Tregs and immune control. *J Clin Invest* **114**: 1209-1217
- ⁵¹ Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., Kelleher, A., Fazekas de St Groth, B. (2006): Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* **203**: 1693-1700
- ⁵² Bennett, C.L. et al. (2001): The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**: 20–21.
- ⁵³ Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M. (2003): Conversion of peripheral CD4⁺ CD25-naïve T cells to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor FoxP3. *J. Exp. Med.* **198**: 1875–1886
- ⁵⁴ Apostolou, I., von Boehmer, H. (2004): *In vivo* instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.* **199**: 1401–1408
- ⁵⁵ Walker, M.R., Kasprovicz, D.J., Gersuk, V.H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J.H., Ziegler, S.F. (2003): Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺ CD25⁺ T cells. *J. Clin. Invest.* **112**: 1437-1443
- ⁵⁶ Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., Hafler, D.A. (2001): CD4⁺ CD25 high regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* **167**: 1245–1253.
- ⁵⁷ Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., Sakaguchi, S. (1996): Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* **184**: 387–396.
- ⁵⁸ Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakaguchi, S. (1999): Induction of tumor immunity by removing CD25⁺ CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* **163**: 5211–5218.
- ⁵⁹ Wood, K.J., Sakaguchi, S. (2003): Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 199-210.
- ⁶⁰ Boasso, A., Vaccari, M., Nilsson, J., Shearer, G.M., Andersson, J., Cecchinato, V., Chougnet, C., Franchini, G. (2006): Do Regulatory T-Cells Play a Role in AIDS Pathogenesis? *AIDS Reviews* **8**: 141-147
- ⁶¹ Dengelmann, A., Muller, F., Sieber, H., Jenzelewski, V., Suckow, M., Strasser, A.W., Gellissen, G. (2002): Strain and process development for the production of human cytokines in *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res.* **2**(3): 349-61
- ⁶² Mullis, K.B. Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335–350
- ⁶³ Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**: 5463-5467
- ⁶⁴ Nakajima, N., Ikada, Y. (1995): Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Biconjugation in Aqueous Media. *Bioconjugate Chem.* **6**: 123-130
- ⁶⁵ Staros, J.V., Wright, R.W., Swingle, D.M. (1986): Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Coupling Reactions. *Anal. Biochem.* **156**: 220-222
- ⁶⁶ Smith, P.K., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- ⁶⁷ Schägger, H., Jagow, G.v. (1987): Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379
- ⁶⁸ Livak, K.J., Flood, J.A., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **4**: 357–362
- ⁶⁹ Förster, V.T. (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics (Leipzig)* **2**: 55–75.
- ⁷⁰ Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C., Wolf, D.E. (1988): Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**: 8790-8794
- ⁷¹ Bassler, H.A., Flood, J.A., Livak, K.J., Marmaro, J., Knorr, R., Batt, C.A. (1995): Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3724–3728.
- ⁷² Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* **25**: 402-408
- ⁷³ Behrendt, R. (2005): Immunsuppressive Eigenschaften transmembraner Hüllproteine von Retroviren. Diplomarbeit, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
- ⁷⁴ Schiller, H., Molsberger, E., Janssen, P., Michel, H., Reiländer, H. (2001): Solubilization and Purification of the Human ET_B Endothelin Receptor Produced by High-level Fermentation in *Pichia pastoris*. *Receptors and Channels* **7**: 453-469
- ⁷⁵ Miyara, M., Sakaguchi, S. (2007): Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *TRENDS in Molecular Medicine* **13**: 108-116

Lehrbücher

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2007): Cellular and Molecular Immunology. 6th Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, USA

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004): Molekularbiologie der Zelle. 4. Aufl., Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Deutschland

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2001): Brock Mikrobiologie. 9. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Deutschland

Mülhardt, C. (2003): Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 4. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Deutschland

Rehm, H. (2006): Der Experimentator – Proteinbiochemie/Proteomics. 5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Deutschland

Danksagungen

Ich danke Prof. Dr. Reinhardt Kurth für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Dr. Joachim Denner möchte ich für die Betreuung meiner Diplomarbeit sowie die ständige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft danken.

Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die Bereitschaft, als Gutachter der Diplomarbeit zu fungieren.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Magdalena Konczal für die vielen Ratschläge, das Korrekturlesen meiner Arbeit sowie für die anregenden Gespräche und die mentale Unterstützung bedanken.

Rayk Behrendt danke ich sehr für die Einarbeitung in die Real-Time PCR und die Durchflusszytometrie, die Unterstützung bei den FACS-Messungen und die Beantwortung zahlloser Fragen.

Für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung möchte ich der Arbeitsgruppe P13 des Robert Koch-Instituts danken. Dabei geht besonderer Dank an Martina Lau und Christa-Maria Schmidt.

Meinen Eltern, meinem Bruder und Jessica danke ich für ihre Unterstützung und die Aufmunterungen.