

FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA  
BIOLOGISCH-PHARMAZEUTISCHE FAKULTÄT



– **DIPLOMARBEIT** –

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DIPLOM-BIOLOGE

---

**ANALYSE DER INTERAKTION DER N-TERMINALEN DOMÄNE  
DES TRANSMEMBRANEN HÜLLPROTEINS GP41 MIT  
ZELLULÄREN PROTEINEN**

---

VORGELEGT VON

KATI SCHARF

– BERLIN, AUGUST 2008 –

**ERSTER GUTACHTER:**

PROF. DR. REINHARD KURTH  
ROBERT KOCH-INSTITUT, BERLIN

**ZWEITER GUTACHTER:**

PD DR. EDITH PFITZNER  
INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, JENA

### **EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre an Eides Statt, dass ich die Diplomarbeit mit dem Titel „Analyse der Interaktion der N-terminalen Domäne des transmembranen Hüllproteins gp41 mit zellulären Proteinen“ selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

*Für meine geliebten Eltern.*

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	IV
TABELLENVERZEICHNIS .....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 HIV und AIDS .....	1
1.1.1 Ursprung .....	1
1.1.2 Taxonomische Einteilung .....	2
1.1.3 Epidemiologie .....	4
1.1.4 Klinischer Verlauf einer HIV-Infektion .....	5
1.1.5 Morphologie und Genom von HIV-1.....	7
1.1.6 Replikation und Reifung von Viruspartikeln .....	8
1.2 Membranglykoproteine und Membranfusion von HIV .....	11
1.2.1 Gp120 und gp41 .....	11
1.2.2 Gp41 vermittelte Membranfusion .....	14
1.3 Immunsystem und Immunsuppression .....	15
1.3.1 Immunsystem.....	15
1.3.2 Retrovirale Immunsuppression .....	16
<b>2 ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>19</b>
<b>3 MATERIAL .....</b>	<b>20</b>
3.1 Chemikalien.....	20
3.2 Puffer.....	22
3.3 Antibiotika .....	23
3.4 Stammlösungen.....	24
3.5 Antikörper .....	25
3.5.1 Primäre Antikörper .....	25
3.5.2 Sekundäre Antikörper .....	25
3.6 Kulturmedien .....	26
3.7 Enzyme und Marker .....	26
3.7.1 Restriktionsenzyme.....	26
3.7.2 weitere Enzyme .....	27
3.7.3 Marker .....	27
3.8 Kommerzielle <i>Kits</i> .....	28
3.9 Primer.....	28
3.9.1 PCR-Primer.....	28

3.9.2 Sequenzierungsprimer .....	29
3.10 Organismen .....	30
3.10.1 Bakterien .....	30
3.10.2 Hefen .....	30
3.10.3 Eukaryotische Zelllinien .....	30
3.11 DNA-Genbank .....	30
3.12 Peptide .....	31
3.13 Klonierungsvektoren .....	31
<b>4 METHODEN .....</b>	<b>33</b>
4.1 Kultivierung und Stammhaltung von Organismen .....	33
4.1.1 Bakterien und Hefen .....	33
4.1.2 Eukaryotische Zellen .....	34
4.2 Arbeiten mit DNA .....	36
4.2.1 Plasmidisolierung .....	36
4.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	37
4.2.3 PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> ) .....	37
4.2.4 Restriktion .....	39
4.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA .....	39
4.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	40
4.2.7 Ligation .....	40
4.2.8 Herstellung kompetenter Bakterien .....	41
4.2.9 Transformation von Bakterien .....	42
4.2.10 Überprüfung einer Klonierung .....	42
4.2.11 Sequenzierung .....	42
4.3 Das <i>yeast two-hybrid</i> System .....	43
4.3.1 Herstellung kompetenter Hefen .....	45
4.3.2 Kotransformation von Hefen .....	46
4.3.3 X- $\alpha$ -Galaktosidase-Test .....	46
4.4 Analyse exprimierter Proteine .....	46
4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	46
4.4.2 Coomassie-Färbung .....	47
4.4.3 Western Blot .....	48
4.5 Proteinexpression in eukaryotischen Zellen .....	49
4.5.1 Transiente Transfektion .....	49
4.5.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten .....	51
4.5.3 Zytosol-Membran-Fraktionierung .....	51
4.6 Proteinbindungsanalyse – <i>pull down</i> .....	52
4.6.1 GST- <i>pull down</i> .....	52
4.6.2 <i>Pull down</i> mit Magnetobeads .....	55

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>56</b>
5.1	Ermittlung möglicher Interaktionspartner der N-terminalen Domäne von gp41 mittels <i>yeast two-hybrid</i> Analyse.....	56
5.1.1	Klonierung von rgp und CHR in pGBKT7 zur Weiterverwendung in <i>yeast two-hybrid</i> Analysen .....	58
5.1.2	Aufarbeitung der <i>prey</i> -Plasmide .....	59
5.1.3	Detektion putativer Interaktionspartner mittels <i>yeast two-hybrid</i> Analyse .....	60
5.2	Herstellung von GST-Fusionsproteinen von verschiedenen Deletionsmutanten der Ektodomäne von gp41.....	69
5.2.1	Klonierung von Konstrukten der gp41 Ektodomäne in pGex-KG.....	70
5.2.2	Bestimmung der Induktionsbedingungen der Deletionskonstrukte .....	73
5.3	TREM-1 ein putativer Interaktionspartner.....	74
5.3.1	Klonierung von TREM-1.....	74
5.3.2	Detektion von TREM-1 in Zytosol-Membran-Fractionen, transfizierten Zellen und verschiedenen Gesamtzelllysaten .....	77
5.4	<i>Pull down</i> Experimente zur Verifizierung der Interaktion zwischen TREM-1 und der gp41 Ektodomäne .....	80
5.4.1	GST- <i>pull down</i> Analyse mit Glutathion Sepharose beads 4B.....	80
5.4.2	<i>Pull down</i> Analyse mit Dynabeads® Streptavidin M-280 .....	82
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>83</b>
6.1	Detektion putativer Interaktionspartner.....	83
6.2	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells</i> (TREM) .....	87
6.3	Klonierung und Expression von Deletionsmutanten der gp41 Ektodomäne .....	94
6.4	Detektion und Überexpression von TREM-1 in verschiedenen Zellen .....	96
6.5	Verifizierung der Interaktionsstudien .....	97
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>99</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>100</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>113</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1 Morphologie des Viruspartikels (a) und des proviralen Genoms (b) von HIV-1. ....	8
Abbildung 1.2 Replikationszyklus von HIV-1 innerhalb einer CD4 <sup>+</sup> T-Zelle. ....	10
Abbildung 1.3 Schematische Darstellung von gp160 (a) und der Ektodomäne von gp41 (b). ....	13
Abbildung 1.4 Fusionsprozess von HIV mit der Wirtszelle. ....	15
Abbildung 3.1 Verwendete Marker. ....	27
Abbildung 3.2 Ausschnitt aus der MCS von pSSTA. ....	32
Abbildung 4.1 Das allgemeine Prinzip des <i>yeast two-hybrid</i> Systems. ....	44
Abbildung 4.2 Ansatz für die Bestimmung der Induktionsbedingungen. ....	53
Abbildung 5.1 Schematische Darstellung der eingesetzten bzw. zu generierenden <i>bait</i> -Vektoren. ....	56
Abbildung 5.2 Schematisierter Ablauf des <i>screens</i> mittels <i>yeast two-hybrid</i> Analyse. ....	57
Abbildung 5.3 Klonierung von <i>rgp</i> und <i>CHR</i> ind den Vektor pGBKT7. ....	59
Abbildung 5.4 Gelelektrophorese der PCR-Produkte der <i>prey</i> -Plasmide. ....	60
Abbildung 5.5 Basenabfolge (a) und Aminosäuresequenz (b) der gp41 Ektodomäne. ....	69
Abbildung 5.6 Schematische Darstellung der gp41 Ektodomäne und den daraus abgeleiteten Deletionsmutanten. ....	70
Abbildung 5.7 Klonierung der Deletionskonstrukte der gp41 Ektodomäne in pGex-KG. ....	72
Abbildung 5.8 SDS-Gel der induzierten Deletionskonstrukte der Ektodomäne von gp41. ....	74
Abbildung 5.9 Klonierung von TREM-1 in pEGFP-IJ. ....	75
Abbildung 5.10 Translatiertes <i>forward</i> -Sequenzierungsergebnis von pEGFP-TREM-1. ....	76
Abbildung 5.11 Immunfluoreszenzaufnahmen der HeLa-Zellen 30 h nach Transfektion. ....	78
Abbildung 5.12 WB der transfizierten HeLa-Zellen mit der CaCl <sub>2</sub> -Methode (a) und mittels Lipofectamine® (b). ....	79
Abbildung 5.13 Western Blot zum Nachweis der Funktion der Primären Antikörper. ....	80
Abbildung 5.14 Western Blot Ergebnisse der <i>pull down</i> Analysen. ....	81
Abbildung 6.1 Schematische Darstellung des TREM-Gen-Clusters. ....	88
Abbildung 6.2 Lokalisation von TREM-1. ....	89
Abbildung 6.3 Sequenzvergleich zwischen Klon 95, TREM-1 und sTREM-1. ....	90
Abbildung 6.4 Vorläuferpeptid von GP1 und GP2 des Ebola-Viruses. ....	91

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1 Aktuelle Zahlen zur HIV-Epidemie. ....	4
Tabelle 4.1 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für ca. drei 1,5 mm dicke Gele. ....	47
Tabelle 5.1 Überprüfung der Interaktion der <i>prey</i> - und <i>bait</i> -Plasmide mittels <i>yeast two- hybrid</i> Analyse. ....	62
Tabelle 5.2 Primerpaarung mit entsprechenden Restriktionsenzymen. ....	71
Tabelle 5.3 Optimale Induktionsparameter für die Expression der gp41 Deletionskonstrukte. ....	74

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### A

ab	<i>antibody</i>
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ARV	AIDS-assoziiertes Retrovirus
AS	Aminosäure

### B

bp	Basenpaare
BIV	bovines Immundefizienzvirus
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

### C

ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAEV	Caprine Arthritis-Enzephalitis Virus
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHR	<i>C-terminal heptad repeat</i>
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpz	<i>chimpanzee</i>
CRF	<i>circulating recombinant forms</i>
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten

### D

DAP12	DNAX <i>activation protein of 12 kDa</i>
DC	dendritische Zellen
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DOC	Natriumdeoxycholat
dsDNA/RNA	Doppelstrang-DNA/RNA
DTT	Dithiothreitol

**E**

ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
EIAV	Virus der equinen infektiösen Anämie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERV	endogene Retroviren
EST	<i>expressed sequence tag</i>
env	<i>envelope</i>

**F**

FelV	felines Leukosevirus
FIV	felines Immundefizienzvirus
FKS	fetales Kälberserum

**G**

gag	<i>group specific antigen</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GRID	<i>Gay Related Immune Deficiency</i>
GST	Gluthathione-S Transferase

**H**

h	Stunde
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Treatment</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEPS	<i>Highly Exposed Persistently Seronegative</i>
HERV	humane endogene Retroviren
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HTLV	humanes T-Zell-Leukämie-Virus
H <sub>2</sub> O	Wasser

**I**

ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ISU	immunsuppressiv
ITAM	immunoreceptortyrosine based activation motif

**K**

Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid

**L**

l	Liter
LAV	Lymphadenopathie-assoziiertes Virus
LI	Linkerprotein

LPS	Lipopolysaccharid
LTNP	<i>Long Term Non-Progressors</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
<b>M</b>	
M	Molar
mA	Milliampere
MCP	<i>monocyte chemoattractant proteine</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
β-ME	β-Mercaptoethanol
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
mind.	mindestens
mM	Millimolar
MMP	Metalloprotease
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MuLV	murines Leukämievirus
MVV	Maedi-Visna Virus
<b>N</b>	
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NC	Nukleocapsidprotein
nef	<i>negative factor</i>
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
ng	Nanogramm
NHR	<i>N-terminal heptad repeat</i>
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
<b>O</b>	
OD	Optische Dichte
<b>P</b>	
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
Pen / Strep	Penicillin / Streptomycin
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PERV	porzine endogene Retroviren
PKC	Proteinkinase C
PMM1	Phosphomannomutase 1
PNS	<i>post nuclear supernatant</i>
pol	<i>polymerase</i>
PR	Protease
PVDF	Polyvinylidendifluorid

**R**

rev	<i>Regulator of Virion protein expression</i>
RP	<i>Rapid Progressors</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase

**S**

SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
sm	<i>sooty mangabey</i>
ssDNA/RNA	Einzelstrang-DNA/RNA
sTREM-1	lösliches/ <i>soluble</i> TREM-1
SU	<i>surface</i>

**T**

tat	<i>Trans-Activator of Transcription</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TM	<i>transmembrane</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TREM	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

**U**

UAS	<i>upstream activating sequences</i>
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett

**V**

V	Volt
v.a.	vor allem
vif	<i>virion infectivity factor</i>
vpr	<i>viral protein R</i>
vpu	<i>viral protein U</i>

**W**

WB	Western Blot
WHO	<i>World Health Organisation</i>

**X**

X- $\alpha$ -Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-alpha-D-Galactopyranosid
------------------	---

**Z**

z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

**WEITERE**

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
1'	1 Minute

**EINBUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN**

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

# 1 EINLEITUNG

Mehr als 25 Jahre sind seit dem Beginn der AIDS-Epidemie vergangen. In dieser Zeit sind seither etwa 25 Millionen Menschen an den Folgen des erworbenen Immundefizienz Syndrom (engl. *Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS*) gestorben (UNAIDS/WHO, 2007).

Seit der Erstbeschreibung des Humanen Immundefizienz Virus 1 (engl. *Human Immunodeficiency Virus, HIV*) im Jahr 1983 (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983, Gallo *et al.*, 1983) und HIV-2 im Jahr 1986 (Clavel *et al.*, 1986) sind diese beiden Viren als Auslöser für die erworbene Immunschwäche AIDS identifiziert.

Die Krankheit ist charakterisiert durch eine bislang nicht reversible, tödlich verlaufende Störung der Immunabwehr, die mit opportunistischen Infektionen und häufig mit schwer behandelbaren Tumorerkrankungen assoziiert ist.

Trotz großer therapeutischer Fortschritte sind weder eine Eradikation des Virus noch prophylaktische Vakzine in Aussicht. Daher muss ein besseres Verständnis für die Pathogenese der HIV-Infektion geschaffen werden, um effektivere therapeutische und prophylaktische Strategien zu entwickeln.

## 1.1 HIV und AIDS

### 1.1.1 Ursprung

Im Jahre 1981 erschienen erste Berichte über eine Häufung von seltenen und tödlich verlaufenden Erkrankungen bei zuvor gesunden homosexuellen Männern (Center for Disease Control [CDC] 1981a, 1981b, 1981c). Innerhalb kurzer Zeit wurde eine Immunschwäche als Ursache vermutet (CDC 1982), diese sexuell übertragbare Krankheit wurde als *Gay Related Immune Deficiency* (GRID) bezeichnet. Weitere epidemiologische Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Krankheit auch unter Hämophilen, Empfängern von Blut und heterosexuellen Drogenabhängigen auftrat, was eine parenterale Übertragung vermuten lies. Aus diesem Grund erhielt die Erkrankung ab August 1982 die neue Bezeichnung AIDS (Marx, 1982).

Im Jahre 1983 beschrieb eine französische Arbeitsgruppe um Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris, dass diese Immunschwäche von einem Retrovirus verursacht werden

könnte. Sie isolierten aus den Lymphknoten von AIDS-Patienten ein Virus, in dem eine Reverse Transkriptase nachgewiesen werden konnte (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Chermann *et al.*, 1983). Nur wenig später wird die kausale Beziehung zwischen dem neuen Virus und AIDS aufgedeckt (Broder und Gallo, 1984, Gallo *et al.*, 1984). In den folgenden Jahren entschlüsselten mehrere voneinander unabhängige Arbeitsgruppen das Genom des AIDS-Virus (Wain-Hobson *et al.*, 1985; Sanchez-Pescador *et al.*, 1985).

Frühere verschiedene Bezeichnungen für ein und dasselbe Virus, wie Lymphadenopathie-assoziiertes Virus (LAV, Barré-Sinoussi *et al.*, 1983), humanes T-Zell-Leukämie-Virus III (HTLV-III, Popovic *et al.*, 1984) oder AIDS-assoziiertes Retrovirus (ARV), wurden 1986 durch die Empfehlung des *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* durch eine einheitliche Bezeichnung in Humanes Immundefizienz-Virus ersetzt (Coffin *et al.*, 1986).

Heute gilt es als gesichert, dass HIV als Zoonose, d.h. durch die Transmission von nichtmenschlichen Primaten, in die menschliche Population eingeführt wurde (Hahn *et al.*, 2000). Ein Forscherteam konnte den Nachweis erbringen, dass HIV-1 eine große Ähnlichkeit mit einem Subtyp des Simianen Immundefizienz-Virus (engl. *Simian Immunodeficiency Virus, SIV*) aufweist, der bei einer Schimpansen-Unterart (*Pan troglodytes troglodytes*) vorkommt (Keele *et al.*, 2006). Dies legt die Vermutung nahe, dass das Virus durch Jagd auf Schimpansen und Verarbeitung von Affenfleisch auf den Menschen übertragen wurde (Gao *et al.*, 1999). SIVcpz ist eine Rekombinante von zwei SIVs aus kleineren Affenarten, die von Schimpansen gejagt und gefressen werden (Bailes *et al.*, 2003). Das SI-Virus der Rauchgrauen Mangabe (*Cercocebus atys*, SIVsm) wurde als Quelle für HIV-2 identifiziert (Silvestri, 2005). Die natürlichen Wirte von SIV zeigen trotz einer hohen Viruslast keine Symptome einer Immundefizienz. Der älteste gesicherte Nachweis einer HIV-Infektion erfolgte aus einer 1959 entnommenen Plasmaprobe eines Mannes im Kongo (Zhu *et al.*, 1998, Goudsmit und Lukashov, 1999; Sharp *et al.*, 2000; Korber *et al.*, 2000).

### 1.1.2 Taxonomische Einteilung

Die taxonomische Einteilung der Familie *Retroviridae* basiert auf Unterschieden in der Morphologie, den antigenen Eigenschaften, der Wirtsspezifität, der Genomsequenz und der Pathogenese. Retroviren sind behüllte Einzel-(+)-Strang-RNA-Viren (ss(+)RNA) und dessen charakteristisches Merkmal ist die Reverse Transkriptase. Dieses Enzym schreibt das einzelsträngige RNA-Genom des Virus in doppelsträngige DNA (dsDNA) um (Temin und Mizutani, 1970a; Baltimore, 1970) und ermöglicht Retroviren damit eine Umkehrung des konventionellen genetischen Informationsfluss von DNA über RNA zu Protein. Die in DNA umgeschriebene RNA kann so in das Wirtsgenom integriert und mit diesem repliziert

werden. Die Familie der *Retroviridae* wird aufgrund der Genomorganisation und der Translation von akzessorischen Proteinen in einfache und komplexe Retroviren unterteilt. Neben den infektiösen exogenen Retroviren existieren auch endogene Retroviren (ERV), die Bestandteil des Genoms und vertikal über die Keimbahn weitergegeben werden, wie humane endogene Retroviren (HERV) oder porcine endogene Retroviren (PERV). Zu den exogenen Retroviren gehören Viren wie das humane Immundefizienzvirus (HIV) oder das menschliche T-Zell-Leukämievirus (HTLV). Derzeit unterscheidet man sieben Genera in der Familie der Retroviren: *Alpharetroviren*, *Betaretroviren*, *Gammaretroviren*, *Deltaretroviren*, *Lentiviren*, *Epsilonretroviren* und *Spumaviren* (ICTV 2006).

Das humane Immundefizienzvirus gehört zur Gattung der Lentiviren. Desweiteren gehören das bovine Immundefizienzvirus (BIV), das feline Immundefizienzvirus (FIV), das simiane Immundefizienzvirus (SIV), das Virus der equinen infektiösen Anämie (EIAV), das Caprine Arthritis-Enzephalitis Virus (CAEV) und das Maedi-Visna Virus (MVV) in diese Gattung. Diese rufen charakteristischerweise eine langsam verlaufende, chronisch degenerative Krankheit hervor. Sie sind sehr Spezies-spezifisch und wurden bisher nur in verschiedenen Säugetierarten gefunden. Neben dem Menschen in Rindern, Katzen, Affen, Pferden, Ziegen und Schafen. Lentiviren persistieren lebenslang im Wirt, da sie den Abwehrmechanismus des Wirtes umgehen können.

Bei Primaten sind das humane Immundefizienz-Syndrom, mit den beiden Arten HIV-1 und HIV-2, und das simiane Immundefizienz-Syndrom, bei verschiedenen Affenarten, bekannt. HIV-1 und HIV-2 unterscheiden sich aufgrund unterschiedlicher phylogenetischer und biologischer Eigenschaften. Sie besitzen lediglich eine Sequenzhomologie von 55 % in ihrer RNA (Guyader *et al.*, 1987), weisen jedoch elektronenmikroskopisch die gleiche Morphologie auf. Beide Virustypen lösen letale Immundefizienzen aus. HIV-1 ist weltweit verbreitet (Markowitz *et al.*, 1993; Coffin *et al.*, 1995a; Ho *et al.*, 1995a), dagegen beschränken sich HIV-2 Infektionen vorwiegend auf Westafrika (Kanki *et al.*, 1987; De Cock *et al.*, 1993).

HIV-1 wird aufgrund phylogenetischer Analysen in drei Hauptgruppen – Gruppe M (*major*), Gruppe O (*outlier*) und Gruppe N (*new*) – eingeteilt, wobei die Gruppe N erst vor kurzem entdeckt worden ist (Robertson *et al.*, 2000; Leitner *et al.*, 1995; Triques *et al.*, 1999; Triques *et al.*, 2000; Gurtler *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1998). In M werden Virusstämme eingeordnet, welche die globale Epidemie dominieren und wird derzeit in 9 Subtypen (A-D, F-H, J und K) untergliedert. Bei einer Koinfektion von mindestens zwei unterschiedlichen Subtypen kann es zu einer Rekombination von Gensegmenten kommen (McCutchan *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 1995a), wodurch neue Viren, so genannte Mosaikviren entstehen. Diese werden als *circulating recombinant forms* (CRFs) bezeichnet. Subtyp B ist vor allem in Amerika, Europa, Australien und Japan verbreitet. Subtyp C ist vorherrschend in Süd- und Ostafrika, Indien

und Nepal und macht ungefähr die Hälfte der weltweiten HIV-Infektionen aus. HIV-2 wird in die acht Subtypen A-G unterteilt (Chen *et al.*, 1997; Damond *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 2000).

### 1.1.3 Epidemiologie

Momentan leben weltweit ungefähr 33,2 Millionen Menschen mit HIV/AIDS. Mit mehr als zwei Drittel (68 %) aller HIV-Positiven ist die Region südlich der Sahara in Afrika der Teil der Welt, der am stärksten von der HIV-Epidemie betroffen ist. Im Jahre 2007 stammten über drei Viertel (76 %) der AIDS-Toten aus diesem Gebiet. Die Prävalenz liegt durchschnittlich bei 5 %. Allerdings variiert diese je nach Land sehr stark. Momentan weist beispielsweise Swasiland mit 33,4 % die höchste Prävalenz weltweit auf (UNAIDS/WHO, 2007). Übertragungsweg ist hierbei meist der heterosexuelle Kontakt. In Deutschland lebten Ende 2007 rund 59 000 Menschen mit HIV, davon waren etwa 49 000 Männer, rund 10 000 Frauen und rund 350 Kinder betroffen. Den größten Teil an HIV-Positiven machen in Deutschland mit 34 500 Betroffenen homosexuelle Männer aus (RKI, 2007), welcher momentan immer noch den häufigsten Übertragungsweg in Deutschland ausmacht. Die Prävalenz in West- und Zentraleuropa liegt mit 0,3 % unter dem globalen Durchschnitt von 0,8 %. In Tabelle 1.1 sind aktuelle Zahlen der HIV-Epidemie zusammengefasst.

**Tabelle 1.1 Aktuelle Zahlen zur HIV-Epidemie.**

Werte in Klammern geben die geschätzte Ober- und Untergrenze an (UNAIDS/WHO, 2007).

---

#### **Anzahl der HIV-Positiven 2007**

Gesamt	33,2 Millionen (30,6 - 36,1)
Erwachsene	30,8 Millionen (28,2 - 33,6)
Frauen	15,4 Millionen (13,9 - 16,6)
Kinder unter 15 Jahren	2,1 Millionen (1,9 - 2,4)

#### **HIV-Neuinfektionen**

Gesamt	2,5 Millionen (1,8 - 4,1)
Erwachsene	2,1 Millionen (1,4 - 3,6)
Kinder unter 15 Jahren	420 000 (350 000 - 540 000)

#### **AIDS-Tote 2007**

Gesamt	2,1 Millionen (1,9 - 2,4)
Erwachsene	1,7 Millionen (1,6 - 2,1)
Kinder unter 15 Jahren	290 000 (270 000 - 320 000)

---

### 1.1.4 Klinischer Verlauf einer HIV-Infektion

Die Übertragung von HIV erfolgt durch infizierte Körperflüssigkeiten, wie Sperma, Vaginalsekret, Blut oder die Muttermilch. Die Infektion wird hierbei durch zellfreies Virus oder durch den Zell-Zell-Kontakt HIV-infizierter und gesunder Zellen (T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) vermittelt. Verschiedene Faktoren, wie die Menge der übertragenen HIV-infizierten Flüssigkeit und deren Virusgehalt, sowie die Kontaktzeit und die Art der Eintrittspforte sind maßgeblich für das Zustandekommen einer Infektion.

Das *Centers for Disease Control* (CDC) in den USA hat ein allgemeingültiges Klassifikationssystem aufgestellt, welches den Verlauf einer HIV-Infektion in drei klinische Stadien (A, B und C) und in drei CD4-Zellzahlbereiche (1, 2 und 3) unterteilt (CDC, 1993b).

Die Primärinfektion verläuft vorwiegend inapparent und zeigt in 40-70 % der Fälle nur vorübergehend grippeähnliche Symptome. Das so genannte akute HIV-Syndrom äußert sich am häufigsten in Fieber, Hautausschlag, orale Ulzeration und Lymphknotenadenopathie (Kahn und Walker, 1998). Aufgrund der hohen Replikationsrate des Virus in der akuten Phase sinkt die Anzahl der CD4-positiven Lymphozyten ab (Gaines *et al.*, 1990), des Weiteren kommt es zu qualitativen Einschränkungen der CD4-positiven T-Zellfunktion (Rosenberg 1997, Lichterfeld 2004). Die Viruslast kann einen Wert von  $10^7$  Kopien HIV-RNA/ml Plasma erreichen. Nach ca. 4-6 Wochen kommt es zur Bildung erster HIV-spezifischer Antikörper, die im weiteren Verlauf zu einer Senkung der Viruslast bis zu einem viralen Setpoint führen. Dieser gibt eine Prognose für die langfristige Krankheitsprogression (Mellors *et al.*, 1995). Parallel hierzu kommt es nach einiger Zeit zu einem Wiederanstieg der CD4-positiven Zellen, die aber ohne antiretrovirale Therapie nicht wieder ihre Ausgangswerte erreicht.

Im Verlauf der anschließenden klinischen Latenzphase, die bis zu zehn Jahren andauern kann, findet eine kontinuierliche Virusvermehrung statt. Dabei werden täglich ca.  $10^9$  neue infektiöse Partikel im peripheren Blut freigesetzt (Ho *et al.*, 1995a). Viren werden zunächst von dem intakten Immunsystem eliminiert und die Zerstörung CD4-positiver Zellen wird durch die Bildung neuer Zellen kompensiert. Dieses Stadium bleibt weitgehend asymptomatisch. Im Laufe der Zeit werden kontinuierlich mehr CD4-positive Zellen zerstört als nachgebildet werden können. Ohne eine antiretrovirale Therapie steigt die Viruslast langsam wieder an. Sinkt die Anzahl der CD4-positiven Zellen unter 500 pro  $\mu$ l Blut, so treten Beschwerden und Krankheiten der Kategorie B auf. Patienten weisen als *AIDS-related complex* bezeichnete Symptome wie eine Candida-Infektion des Oropharynx, bazilläre Angiomatose oder periphere Neuropathie auf.

Vom Vollbild AIDS spricht man, wenn Krankheiten des AIDS-definierenden klinischen Stadiums C diagnostiziert werden. Hierzu zählen opportunistische Infektionen durch Viren, Bakterien und Pilze oder Parasiten, aber auch maligne Lymphome, Kaposi-Sarkome oder eine chronische HIV-Enzephalopathie. Die Zahl der CD4-positiven Zellen sinkt hierbei unter 200 Zellen/ $\mu$ l Blut ab. Eine Infektion mit HIV-2 wird mit einer geringeren Viruslast assoziiert und scheint in seiner Krankheitsprogression langsamer und milder zu verlaufen im Vergleich zu HIV-1 (CDC, 1998).

Bislang sind HIV-Infektionen nicht heilbar, können jedoch mit antiretroviralen Medikamenten therapiert werden. Da Viren schnell Resistenzen gegenüber einem einzelnen Medikament aufweisen, hat sich eine Kombinationstherapie durchgesetzt, die so genannte *Highly Active Antiretroviral Treatment* (HAART). Derzeit werden hauptsächlich Wirkstoffe eingesetzt, die die virale Reverse Transkriptase und/oder Protease hemmen. Dies führt zu einer Reduktion der Virusvermehrung, wodurch die Viruslast vermindert und der Krankheitsverlauf verlangsamt werden kann. Trotzdem kommt es zur Entwicklung resistenter HIV-Varianten und infolgedessen zu einem möglichen Therapieversagen. Bislang existieren ebenfalls keine präventiven Impfstoffe und somit muss die HIV-Infektion zum heutigen und zukünftigen Zeitpunkt als tödlich verlaufende Infektion verstanden werden.

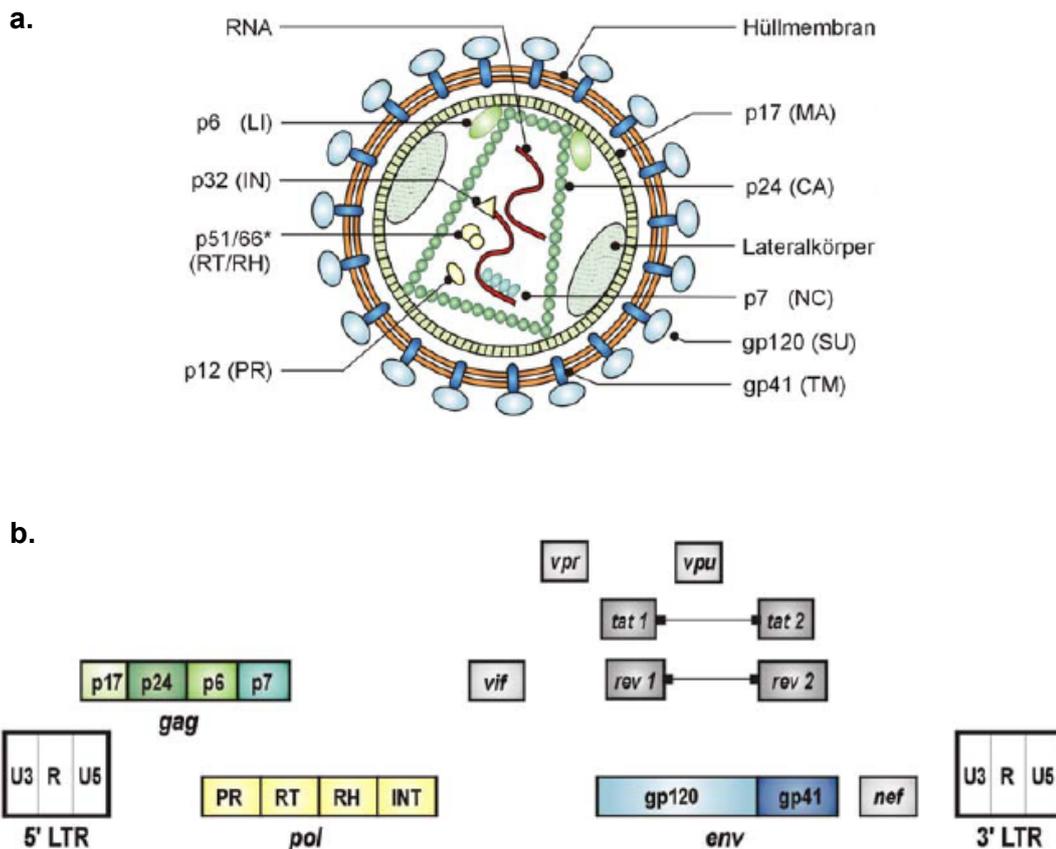
Neben der Immunantwort des Wirtes spielen auch genetische Faktoren für die Übernahmefähigkeit und Resistenz gegen die HIV-Infektion und die Geschwindigkeit der Krankheitsprogression eine wichtige Rolle. Bedeutendste Rolle spielt hier eine 32 bp lange Deletion am Gen des wichtigsten Corerezeptors für den Eintritt von HIV-1 in die CD4-positive T-Zelle, dem CCR5-Chemokin-Rezeptor (Samson *et al.*, 1996). Heterozygote Merkmalsträger zählen oft zu den *Long Term Non-Progressors* (LTNP), HIV-infizierte Langzeitüberlebende. Bei diesen Patienten scheint eine HIV-Infektion hinsichtlich des Krankheitsverlaufes für eine längere Zeit unterbrochen zu sein (Buchbinder *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1995; Easterbrook, 1994; Levy, 1993). Allerdings kann eine Progression zu AIDS auch nach 15 Jahren gleich bleibender Infektion auftreten (Harrer *et al.*, 1996). Die LTNPs bilden keine homogene Gruppe, so schließt diese auch Personen ein, die beispielsweise mit einem ineffizient replizierenden HI-Virus infiziert sein können oder die Betroffenen besitzen eine starke und umfassende Menge an HIV-spezifischen humoralen und zellvermittelten Immunantworten, welche anscheinend den Verlauf der Krankheit hinauszögern. Ein weiterer kleiner prozentualer Anteil der HIV-Infizierten besitzt einen sehr schnellen Verlauf von der Primärinfektion zu AIDS, der meist weniger als 4 Jahre umfasst. Diese Gruppe wird als *Rapid Progressors* (RP) bezeichnet (Azala *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde eine kleine Gruppe von Personen identifiziert, welche als *Highly Exposed Persistently Seronegative*

(HEPS) bezeichnet wird. Diese bleiben trotz eines permanent hohen Infektionsrisikos mit HIV seronegativ.

### 1.1.5 Morphologie und Genom von HIV-1

Lentiviren besitzen eine gemeinsame Grundstruktur (Abb. 1.1a). HIV-Partikel sind ca. 80-100 nm groß und von einer Lipidhülle umgeben, die von zellulärem Ursprung ist. In diese sind 72 etwa 10 nm große Glykoproteinkomplexe eingebettet (Chan *et al.*, 1997), wobei hiervon ca. 14 funktionell sind (Zhu *et al.*, 2006). Diese sind elektronen-mikroskopisch als sogenannte *spikes* sichtbar (Gelderblom *et al.*, 1987) und können sich anscheinend nicht frei in der Membran bewegen. Der externe Anteil wird als gp120 (SU, *surface*) und der transmembrane Teil als gp41 (TM, *transmembrane*) bezeichnet. Die Innenseite der Membran ist mit einer Schicht aus Matrixproteinen (MA) ausgekleidet. Im Inneren des Virions befindet sich das Viruskapsid bzw. *core* (CA), welches charakteristischerweise bei den Lentiviren konisch geformt ist (Gelderblom *et al.*, 1987). Darin befindet sich das virale Genom in Form von zwei einzelsträngigen RNA-Kopien mit einer Größe von ca. 9,7 kb, die ein für eukaryotische mRNA typisches 5'-Cap und 3'-poly-A-Schwanz trägt. Des Weiteren enthält das Viruskapsid wichtige Elemente wie die Reverse Transkriptase (RT), Intergrase (IN), Protease (PR) und eine kleines phosphoryliertes, basisches Nukleocapsidprotein (NC). Zusätzlich enthalten die Viruspartikel ein kleines Linkerprotein (LI), dass das Capsid mit der Membran verbindet (Gelderblom *et al.*, 1991).

Das Genom von HIV-1 (Abb. 1.1b) ist komplexer aufgebaut als das anderer Retroviren (Coffin *et al.*, 1992a). Die Genomorganisation 5'LTR-*gag-pol-vif-vpr-tat-rev-env-nef*-3'LTR, ermöglicht es HIV-1, eine Vielzahl von Proteinen in einem relativ kleinen Genom zu kodieren, da die viralen Gene überlappend angeordnet sind. Das Genom enthält, wie alle Retroviren, die drei Gene *gag* (*group specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*). Diese werden von den LTR (*long terminal repeat*)-Regionen flankiert, die bei der Integration kovalent mit der Wirts-DNA verknüpft wird. *Gag* und *env* kodieren für die inneren Strukturproteine bzw. für die Glykoproteine der Virushülle, das *pol*-Gen für die Proteine der Polymeraseaktivität. Die RNA von HIV-1 enthält zusätzlich weitere Gene, *tat* (*Trans-Activator of Transcription*) und *rev* (*Regulator of Virion protein expression*) codieren für regulatorische Proteine, die an der Regulation der RNA-Transkription, des Spleißens und am Export der viralen mRNA aus dem Nukleus beteiligt sind. Außerdem enthält es die 4 nicht essentiellen Gene *vif* (*virion infectivity factor*), *vpr* (*viral protein R*), *vpu* (*viral protein U*), *nef* (*negative factor*), welche für akzessorische Proteine codieren (Cohen *et al.*, 1996; Cullen *et al.*, 1998).



**Abbildung 1.1 Morphologie des Viruspartikels (a) und des proviralen Genoms (b) von HIV-1 (Somogyi, 2003).**

a. Schematische Darstellung eines HIV-1 Viruspartikels. Hüllmembran mit transmembranen (gp41, TM) und externen (gp120, SU) Glykoprotein. Konisches Kapsid aus Kapsidprotein (p24, CA), zwei RNA-Genomen im Komplex mit Nukleokapsidprotein (p7, NC), Matrixprotein (p17, MA), Lateralkörper, Linkerprotein (p6, LI) und die Enzyme Reverse Transkriptase / RNaseH (p51/66, RT/RH), Integrase (p32, IN) und Protease (p12, PR).

b. Genomkarte des Provirus von HIV-1. Das provirale Genom wird von zwei identischen LTR-Regionen (*long terminal repeat*) flankiert. Der ORF (*open reading frame*) beinhaltet die Strukturgene *gag* (*group specific antigen*) und *env* (*envelope*); die *pol* (*polymerase*)-Region; die akzessorischen Gene *vif* (*virion infectivity factor*), *vpr* (*viral protein R*), *nef* (*negative factor*) und *vpu* (*viral protein U*) und die regulatorischen Gene *tat* (*transactivator of transcription*) und *rev* (*regulator of expression*).

### 1.1.6 Replikation und Reifung von Viruspartikeln

Die Infektion beginnt mit dem Anheften (*attachment*) von HIV an die Zielzelle (Abb. 1.2). Hierbei erfolgt eine spezifische Bindung des viralen Oberflächenproteins SU (gp120) an das CD4-Molekül der Zielzelle, der primäre und für den Viruseintritt notwendige Rezeptor von HIV (Dalgleish *et al.*, 1984; Klatzman *et al.*, 1984). Der CD4-Rezeptor (CD = *cluster of differentiation*) ist ein 58 kDa schweres monomeres Glykoprotein, welcher sich in erster Linie

auf T-Zellen, aber auch auf Makrophagen, Monozyten, Eosinophilen, Dendritischen Zellen und Mikrogliazellen des Zentralnervensystems (ZNS) befindet (Dalglish *et al.*, 1984; Clapham *et al.*, 1991). Zusätzlich zu dem CD4-Rezeptor dienen Chemokinrezeptoren, der CC- bzw. CXC-Rezeptor-Familie, als essentielle Korezeptoren für HIV. Die beiden häufigsten sind CXCR4 (Endres *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996) und CCR5 (Alkhatib *et al.*; 1996; Deng *et al.*; 1996; Dragic *et al.* 1996; Doranz 1996). Da Makrophagen den Chemokinrezeptor CCR5, T-Helferzellen dagegen CXCR4 an der Oberfläche tragen determiniert die Korezeptorspezifität einzelner HIV-1 Isolate den HIV-Tropismus (O'Brien *et al.*, 1990; Shioda *et al.*, 1991; Tscherning *et al.*, 1998; Clapham *et al.*, 2002). Nach der Assoziation von gp120 mit dem Korezeptor wird eine Konformationsänderung in dem trimeren Komplex gp41/gp120 eingeleitet, wodurch die virale Hülle und die Zellmembran der Zielzelle fusionieren (siehe Abschnitt 1.2).

Nach dem Abstreifen der Virushülle gelangt der Nukleoproteinkomplex in das Zytoplasma der Zelle (*uncoating*). Im Zytoplasma werden die beiden identischen Positiv-Strang-RNA-Moleküle in mehreren Schritten mittels der viruseigenen Reversen Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Nach der Hydrolyse des RNA-Stranges des Heteroduplex mittels der RNaseH-Aktivität kommt zur Komplettierung des DNA-Einzelstranges zum Provirus, wobei die codierenden Sequenzen von identischen LTR-Regionen flankiert werden. Die dabei auftretenden Rekombinationen sowie der fehlerhafte Einbau von Nukleotiden bedingen, aufgrund fehlender *proofreading*-Funktion der Reversen Transkriptase, die hohe genetische Varianz von HIV (Preston *et al.*, 1988). Das Virusgenom wird anschließend im Komplex mit den Kapsid-Komponenten in den Zellkern transportiert. Dort erfolgt die kovalente Integration der doppelsträngigen, proviralen DNA mit Hilfe der Integrase in das Wirtsgenom (Allan *et al.*, 1987). Das Provirus wird bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben.

Von dem Aktivierungszustand der Zelle hängt ab, ob das Provirus transkribiert wird oder latent vorliegt (Stevenson *et al.*, 1990). Bei der T-Zell-Aktivierung kommt es zur Transkription der integrierten DNA. Zu Beginn entstehen vor allem mRNAs, die für die essentiellen regulatorischen Proteine Tat und Rev kodieren. Tat und Rev kontrollieren die Bildung von Vollängen-RNA und einfach gespleißter RNA. Nach Erreichen eines Schwellwertes der Konzentration von Rev entstehen über 30 alternativ gespleißte mRNAs, aus denen die Env-Vorläuferproteine und die akzessorischen Proteine translatiert werden (Neumann *et al.*, 1994, Pavlakis *et al.*, 1992). Die Vollängen-RNA dient entweder als genomische RNA der neuen Virionen oder als mRNA zur Translation von Gag- und Gag / Pol-Vorläuferproteinen. Die Env-Vorläuferproteine werden danach über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat, wo die Spaltung in die einzelnen, funktionellen Bestandteile gp41 und gp120

durch die virale Protease erfolgt, zur Zelloberfläche transportiert. Anschließend erfolgt die Selbstaggregation der viralen Proteine zu neuen Viruspartikeln (*assembly*). Als Erbinformation wird ungespleißte Vollängen-mRNA in den Viruspartikel verpackt und die neu gebildeten, noch unreifen Virionen knospen unter Mitnahme des zellulären Membrananteils und darin eingelagerte Proteine von der Wirtszelle ab (*budding*). Jetzt beginnt der Reifungsprozess der Virionen. Hierbei spaltet sich eine Proteasedomäne aus dem Gag / Pol-Vorläuferprotein, um die Gag- und Gag / Pol-Vorläuferproteine in die Matrix-, Nukleokapsid-, Kapsid-, Linkerproteine sowie die Reverse Transkriptase und Integrase zu prozessieren. Erst durch diese Maturationsprozesse erhalten die Virionen ihre Infektiosität (Kaplan *et al.*, 1994a).

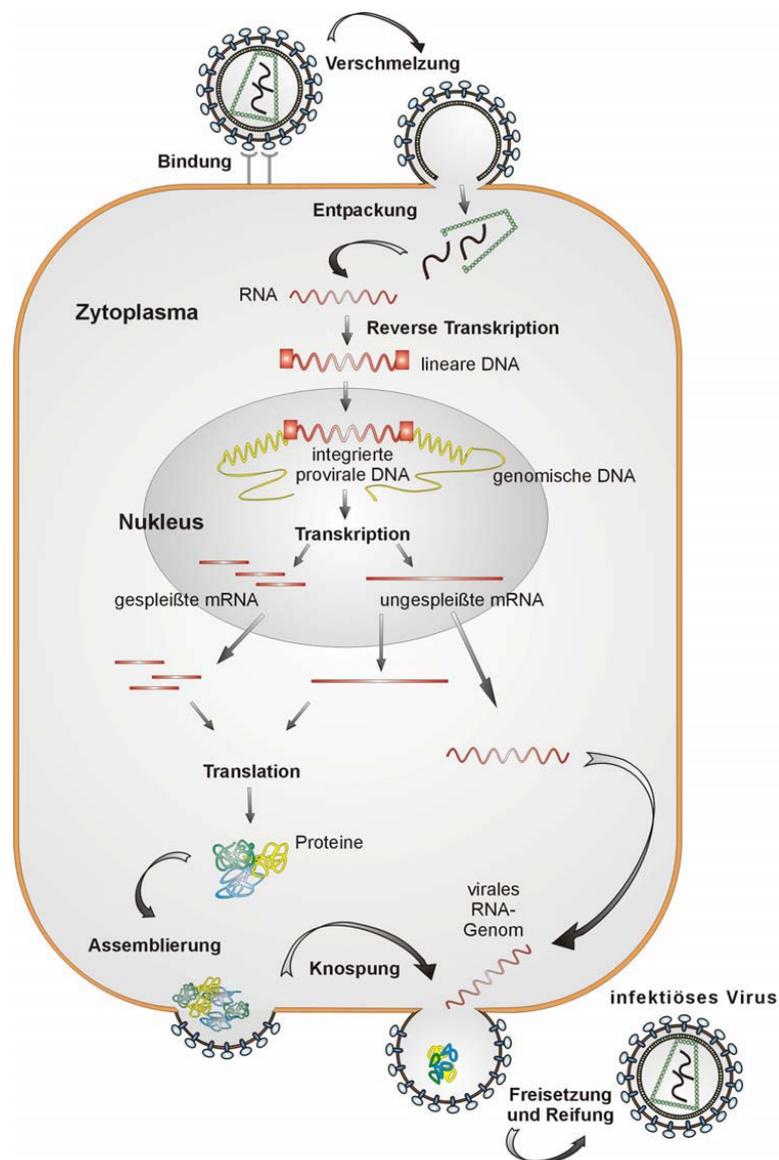


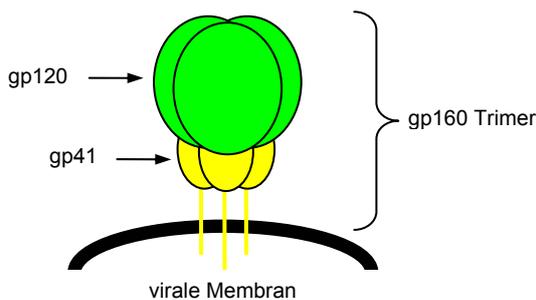
Abbildung 1.2 Replikationszyklus von HIV-1 innerhalb einer CD4<sup>+</sup> T-Zelle (Somogyi, 2003).

## 1.2 Membranglykoproteine und Membranfusion von HIV

Die Membranglykoproteine von HIV-1 sind essentiell für den Viruseintritt, d.h. für die Anheftung und das Vermitteln der Fusion der Wirts- mit der Zielzellmembran (Stein *et al.*, 1987). Darüber hinaus können sie eine Synzitiumbildung – die Verschmelzung von infizierten mit benachbarten nicht infizierten Zellen – veranlassen (Lifson *et al.*, 1986; Sodroski *et al.*, 1986).

### 1.2.1 Gp120 und gp41

HIV-1 besitzt zwei Glykoproteine, die in einem nicht kovalent verbundenen Komplex aus einem transmembranen (TM, gp41) und einem externen Protein (SU, gp120) vorliegen (Abb. 1.3). Dieses Heterodimer weist eine Größe von 160 kDa auf und bildet Oligomere. So



**Abbildung 1.3 Model des gp160 Trimers.**

sind diese als Trimere, sogenannte *spikes*, in der Virushülle verankert. Ferner wurden Tetramere im Zytoplasma beschrieben (Gelderblom *et al.*, 1987; Pinter *et al.*, 1989; Schawaller *et al.*, 1989; Earl *et al.*, 1990; Weiss *et al.*, 1990; Weissenhorn *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1997).

Beide Proteine werden als gemeinsames Env-Vorläuferprotein gp160 von einer einfach gespleißten mRNA am rauhen

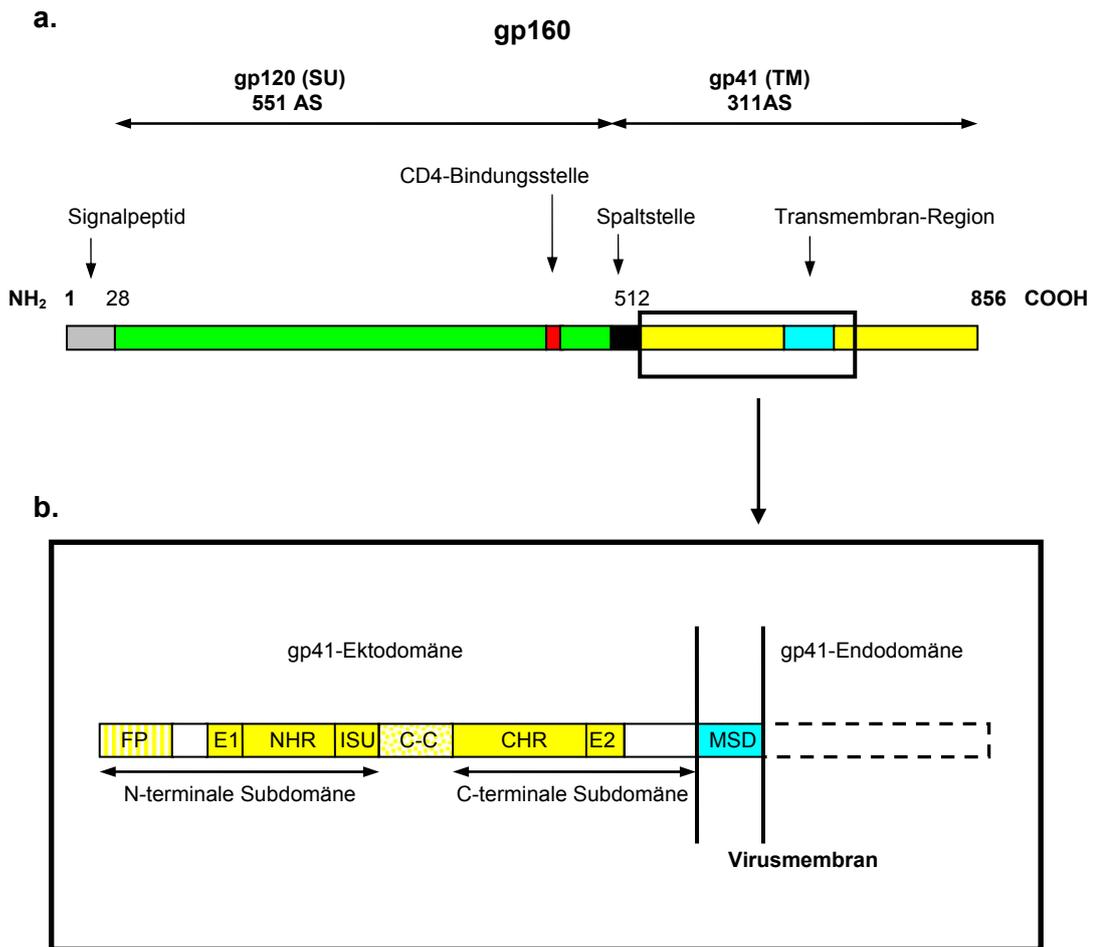
endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert (Abb. 1.4a). Mit Hilfe des N-terminal lokalisierten Signalpeptides wird gp160 in das Lumen des ERs transportiert. Nachdem das Signalpeptid durch eine zelluläre Endoprotease entfernt wurde, erfolgt an mehreren Stellen eine Glykosylierung, wobei der Hauptanteil an die variablen Domänen von gp120 entfällt. Die Oligosaccharidketten werden anschließend mit verschiedenen zellulären Enzymen modifiziert (Wyatt und Sodrowski, 1998), wodurch die Zuckerreste kaum von zelleigenen glykosylierten Proteinen zu unterscheiden sind. Für die korrekte Faltung des Proteins und für eine aktive Konformation sind die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbindungen und die Glykosylierung bedeutend (Fennie und Lasky, 1989; Fenouillet *et al.*, 1994). Anschließend wird das gp160-Protein im Golgi-Apparat durch zelluläre Proteasen wie Furin oder PC7 in die reifen Proteine gp120 (SU, *surface*) und gp41 (TM, *transmembrane*) gespalten (Hallenberger *et al.*, 1992; Kantanen *et al.*, 1995; Decroly *et al.*, 1997; Moulard *et al.*, 1999; Wouters *et al.*, 1999). Diese bilden über nicht kovalente Wechselwirkungen ein

Heterodimer (Kowalski *et al.*, 1987) und werden anschließend über gp41 in der viralen Membran verankert.

Das Hüllprotein gp120 (SU) setzt sich in der Aminosäuresequenz abwechselnd aus variablen (V1-V5) und konstanten Regionen (C1-C4) zusammen. Im gefalteten Protein sind die variablen Domänen nach außen exponiert und daher für die Induktion gp120 spezifischer Antikörper verantwortlich, von denen einige HIV-1 neutralisieren können (Modrow *et al.*, 2003). Des Weiteren ist die Bindestelle für den CD4-Rezeptor und für den Korezeptor auf gp120 lokalisiert (Lasky *et al.*, 1987).

Das Transmembranprotein gp41 untergliedert sich in einen extraviralen (Ektodomäne) und einen intraviralen Bereich (Endodomäne). Zwischen den beiden Bereichen liegt eine ca. 20 AS lange, starke hydrophobe Sequenz, die so genannte *membrane spanning domain* (MSD), welche gp41 in der Membran verankert.

Die Ektodomäne umfasst 175 Aminosäuren und lässt sich in verschiedene Teile untergliedern (Abb. 1.4b): im N-terminalen Bereich beginnend befindet sich das hydrophobe, glyzinreiche Fusionspeptid. Anschließend folgt eine  $\alpha$ -Helix, die N-terminale Heptad Region (NHR). Eine Loopstruktur, die von einer Cystein-Cystein-Brücke gebildet wird, verbindet anschließend die NHR mit der C-terminalen Heptad Region (CHR), die ebenfalls eine  $\alpha$ -Helix ist (Gallaher *et al.*, 1987, 1989; Cao *et al.*, 1993). An diese schließt sich die membranproximale externe Region (MPER) an, welche im nativen Zustand als einziger Bereich frei zugänglich ist. Am Ende der CHR und am Anfang der MPER ist die Epitopstelle E2 lokalisiert, an die die Antikörper 2F5 und 4E10 binden können. Ferner befindet sich vor dem Cystein-Loop ein hochkonservierter Bereich, welcher als immunsuppressive Domäne (ISU) bezeichnet wird (Ruegg *et al.*, 1989; Denner *et al.*, 1994). Bisher sind Interaktionspartner beschrieben, aber nicht vollständig charakterisiert worden (Qureshi *et al.*, 1990; Henderson *et al.*, 1993; Ebenbichler *et al.*, 1993, Denner *et al.*, 1993, 1995). Jedoch konnte gezeigt werden, dass an die gp41 Ektodomäne Calcium binden kann und somit putative Bindungspartner in einer Calcium-abhängigen Weise interagieren könnten (Ebenbichler *et al.*, 1996). Ferner konnten putative Interaktionspartner bei einer Größe von 37, 45, 50, 62 und 100 kDa detektiert, jedoch noch nicht identifiziert werden (Chen *et al.*, 1998). Es konnte jedoch gezeigt werden das P45 (*proteine* 45) vermutlich im N-terminalen Bereich (AS 583-599) und P62 anscheinend im C-terminalen Bereich (AS 646-674) der gp41-Ektodomäne (AS 539-684) binden können (Chen *et al.*, 1999, Xiao *et al.*, 2000). Diese Bindung konnte ebenfalls für HIV-2 bestätigt werden (Chen *et al.*, 2000). Ferner konnte eine kreuzreaktive Bindung für Antikörper an gp41-ISU und IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  gezeigt werden, sodass diess Strukturhomologien nahe legen (Chen *et al.*, 1997, 1999).



**Abbildung 1.3 Schematische Darstellung von gp160 (a) und der Ektodomäne von gp41 (b).**

Die gp41 Ektodomäne beinhaltet folgende Bereiche: FP: Fusionsprotein, E1: Epitopstelle 1, NHR: N-terminale Heptad Repeat, C-C: Cystein-Loop, CHR: C-terminale Heptad Repeat, E2: Epitopstelle 2, MPER: membranproximale externe Region und MSD: *membrane spanning domain*.

Die Endodomäne ist mit ca. 150 AS recht lang und beinhaltet drei hochkonservierte  $\alpha$ -helikale Segmente, die als *lentivirus lytic peptide 1* (LLP-1), LLP-2 und LLP-3 bezeichnet werden. Synthetische Peptide, die diese Motive enthalten, interagierten mit Membranen und induzierten zytolytische Effekte in pro- und eukaryotischen Zellen (Chernomordik *et al.*, 1994, Gawrisch *et al.*, 1993, Kliger *et al.*, 1997, Miller *et al.*, 1993, 1991; Srinivas *et al.*, 1992). Die Bindungsmöglichkeit mit Membranen führte zur Hypothese, dass ein langer Teil der Endodomäne in die Membran eingebettet ist (Kliger *et al.*, 1997). Die endogene Aktivität der reversen Transkription von HIV-1 Virionen sank durch die Deletion von LLP-1 und LLP-2 (Zhang *et al.*, 1996). Durch eine 12 AS lange Deletion im C-terminalen Bereich des zytoplasmatischen Schwanzes konnte die Infektiösität gesenkt werden (Yu *et al.*, 1993). Ferner wurde durch diese Deletion die Möglichkeit der Assoziation von LLP-1 mit

Membranen verhindert (Lee *et al.*, 2000). Des Weiteren wurden gegen den intraviralen Bereich gerichtete neutralisierende Antikörper beschrieben (Cleveland *et al.*, 2003). Weiterhin wurden Calmodulin (CaM)-bindende und -inhibitorische Eigenschaften von LLP-1 homologen synthetischen Peptiden und dem gesamten TM-Protein charakterisiert. Die CaM-vermittelte Enzym-Aktivierung wird durch die Konkurrenz von Peptid und Enzym an die CaM-Bindestelle inhibiert (Miller *et al.*, 1993, Srinivas *et al.*, 1993). Sowohl die Suppression der T-Zell-Aktivierung als auch daraus folgende Zytokinmodulation, die bei einer HIV-1 Infektion auftreten, sind CaM-abhängige Prozesse (Clipstone und Crabtree, 1992; Crabtree und Clipstone, 1994). LLP Domänen tragen daher wahrscheinlich zur HIV-1 Pathogenität bei und stören die CaM-abhängige Signaltransduktion und Regulation von metabolischen Prozessen, welche zu einer zellulären Dysfunktion, führen kann.

### 1.2.2 Gp41 vermittelte Membranfusion

Der Fusionsprozess ist noch nicht bis ins Detail bekannt, für einige wichtige Schritte fehlt bislang der experimentelle Beweis, sodass hier nur ein mögliches Modell wiedergegeben wird (Abb. 1.5). Dieses basiert vor allem auf Analogien zu ähnlichen Fusionsprozessen bei anderen Viren, wie beispielsweise der Hämagglutinin-vermittelte Fusionsprozess des Orthomyxovirus Influenza (Skehel und Wiley, 2000). Aber auch das Filovirus Ebola (Weissenhorn *et al.*, 1998), Coronaviren (Bosch *et al.*, 2003) oder das Paramyxovirus SV5 (Baker *et al.*, 1999) weisen ähnliche Fusionsprozesse und spezielle Fusionsbereiche auf.

Zu Beginn wird durch die Bindung von gp120 an den zellulären CD4-Rezeptor eine Konformationsänderung bewirkt, wodurch Domänen frei werden, die eine Bindung an den Korezeptor ermöglichen. Anschließend wird eine Änderung der räumlichen Anordnung des trimeren Komplexes gp120/gp41 eingeleitet. Dadurch wird das Fusionspeptid in eine exponierte Lage gebracht bzw. „aktiviert“, sodass es in die Wirtsmembran eindringen kann und daraufhin eine *pre-hairpin*-Struktur ausbildet. Anschließend dissoziiert gp120 ab, wobei durch eine Konformationsänderung von gp41 eine stabile *hairpin*-Struktur ausgebildet wird. Dies erfolgt durch ein Abknicken im Bereich der Cystein-Loop-Struktur. Die Konformation dieses 6-Helix-Bündels von gp41 besteht im Inneren aus drei NHR-Helices antiparallel sind dazu außen drei CHR-Helices angeordnet (Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997). Die *hairpin*-Struktur bringt so die virale Membran in die räumliche Nähe der Wirtsmembran. Schließlich kommt es zu Fusion von Wirts- und Virusmembran, wobei der genaue Fusionsprozess noch nicht aufgeklärt ist (Gallo *et al.*, 2003). Eine Möglichkeit geht von einer Ähnlichkeit mit dem Hämagglutinin-vermittelten Fusionsprozess bei Influenza aus, wobei mehrere Fusionspeptide zusammen eine Destabilisierung der Lipid-Doppelschicht bewirken

und es so zur der Ausbildung einer Fusionspore zwischen den zwei Membranen kommt (White, 1992). Einmal induziert führt die Membranfusion zur Freisetzung des viralen Core-Partikels in das Zytoplasma.

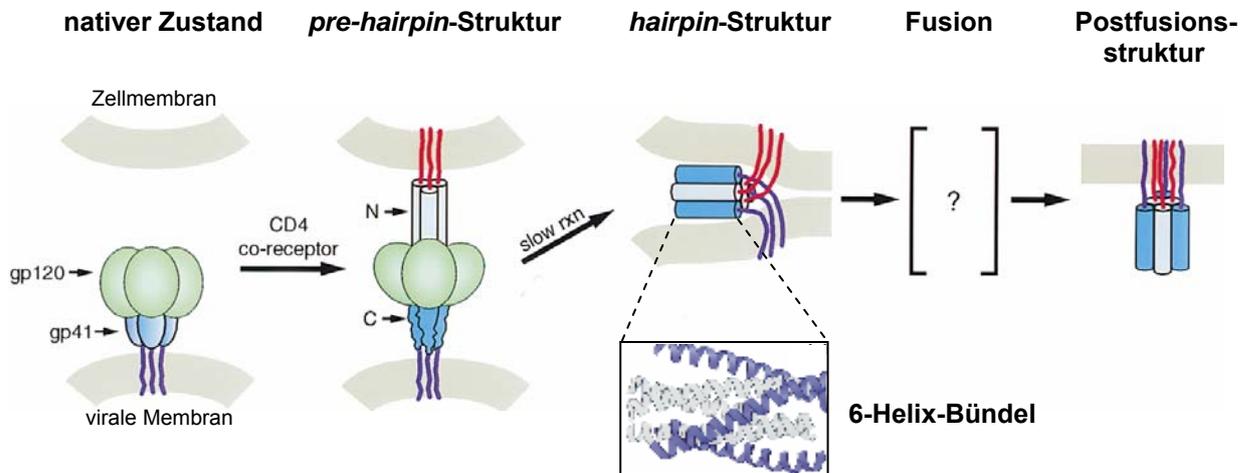


Abbildung 1.4 Fusionsprozess von HIV mit der Wirtszelle (Chan und Kim, 1998).

## 1.3 Immunsystem und Immunsuppression

### 1.3.1 Immunsystem

Das Immunsystem ist ein Abwehrsystem, welches eingedrungene Krankheitserreger, aber auch fehlerhaft gewordene körpereigene Zellen zerstört. Der Mensch besitzt zwei Systeme, die angeborene und die adaptive Immunantwort. Die unspezifische, angeborene Immunantwort stellt bei einer Infektion die erste Barriere dar und zu deren zellulären Komponenten gehören Monozyten, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und natürliche Killerzellen (NK). Des Weiteren bildet ein System von Plasmaproteinen, das Komplementsystem, einen weiteren Teil des angeborenen Immunsystems. Wird der Erreger auf diesem Weg nicht schnell genug eliminiert, beginnt die adaptive Immunabwehr gezielt jene Immunzellen zu vermehren, deren Rezeptoren spezifische Epitope auf der Oberfläche des Erregers erkennen. Die adaptive Immunabwehr besteht im Wesentlichen aus T-Helferzellen ( $T_H1$  und  $T_H2$ ) und zytotoxischen T-Zellen (CTL), als zellvermittelte Immunantwort und aus Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten als humorale Immunantwort. Beide können ein immunologisches Gedächtnis ausbilden. Beide Bestandteile der Immunabwehr, die angeborene und adaptive Immunität, lösen einander

nicht ab, sondern stehen ständig über eine Reihe von Signalstoffen, wie Zytokine und Chemokine, und die Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie B-Lymphozyten, DCs oder Makrophagen, in Verbindung.

Einige pathogene Erreger haben Wege gefunden der Immunantwort des Wirtes zu entgehen oder das Immunsystem zu unterdrücken (Immunsuppression). Besonders Viren haben Strategien entwickelt, die Kommunikation über Zytokine und Interferone zu unterdrücken oder gezielt zu manipulieren. So können manche Viren die Produktion bestimmter Zytokine steigern oder senken, sodass die Virusreplikation positiv beeinflusst wird. Das Epstein-Barr-Virus (EBV) besitzt beispielsweise ein Gen für ein virales IL-10 (Suzuki *et al.*, 1995). Herpes simplex-Viren oder Pockenviren können über lösliche Rezeptoranaloga Zytokine einfangen und eliminieren (Alcami und Efstathiou, 2000). Viren haben neben Strategien zur Umgehung und Modulation der Zytokinantwort auch weitere Vorgehensweisen für alle anderen Schritte der Immunantwort entwickelt (Alcami und Koszinowski, 2000).

### 1.3.2 Retrovirale Immunsuppression

Retrovirale Infektionen sind von einer Suppression der zellulären sowie humoralen Immunantwort begleitet, die weiterführend häufig zu schweren opportunistischen Infektionen führen. Für viele Retroviren konnte gezeigt werden, dass sie trotz Inaktivierung immunsuppressiv wirken: durch Inkubation mit inaktiviertem feline Leukosevirus (FeLV, Olson *et al.*, 1977), PERV (Tacke *et al.*, 2000), *baboon endogenous retrovirus* (BaEV, Denner *et al.*, 1980) oder *permanent human fibroblast virus* (PMFV, Denner *et al.*, 1985) wurde *in vitro* die Proliferation von humanen Lymphozyten inhibiert. Erstmals konnte für FeLV gezeigt werden, dass das aufgereinigte transmembrane Hüllprotein p15E wichtige immunologische Funktion hemmen kann (Haraguchi *et al.*, 1997; Mathes *et al.*, 1979, 1978; Hebebrand *et al.*, 1979). Für die transmembranen Hüllproteine von MuLV (murines Leukämievirus) und PMFV konnte diese hemmende Wirkung ebenfalls in den *in vitro* Modellen gezeigt werden (Denner *et al.*, 1986; Ikeda *et al.*, 1975). Bei den Untersuchungen der immunsuppressiven Eigenschaften von inaktivierten Viren und transmembranen Hüllproteinen konnte eine Interspezies-Reaktivität beobachtet werden. Zum Beispiel hemmte FeLV und das dazugehörige Hüllprotein p15E sowohl Lymphozyten in Katzen als auch im Menschen und der Maus (Orosz *et al.*, 1985a, 1985b, Copelan *et al.*, 1983).

Verschiedene Sequenz- und Strukturanalysen der transmembranen Hüllproteine von Retroviren, darunter auch HIV-1, zeigten einen 17 Aminosäuren langen hochkonservierten Bereich nahe dem Cystein-Loop auf. Für davon abgeleitete synthetische Peptide konnte in einigen *in vitro* Studien eine starke immunsuppressive Wirkung gezeigt werden (Cianciolo

*et al.*, 1985). So unterbindet es unter anderem die Mitogen- und Lymphokinabhängig Proliferation von B- und T-Lymphozyten (Cianciolo *et al.*, 1985, 1988; Ruegg *et al.*, 1989; Denner *et al.*, 1996), den *respiratory burst* von humanen Monozyten (Harrell *et al.*, 1986, Kleinerman *et al.*, 1987, Tas *et al.*, 1988), die Aktivität von NK-Zellen und murinen CTLs (Harris *et al.*, 1987; Ogasawara *et al.*, 1990). Dieser Bereich wurde als immunsuppressive Domäne (ISU) bezeichnet (Ruegg *et al.*, 1989; Denner *et al.*, 1994). HIV-1 weist ebenfalls eine solche ISU-Domäne auf, die die Aminosäuren 581-587 umfasst (Monell und Strand, 1994) und in direkter Nachbarschaft zur immundominanten Region liegt (AS 598-607). Die erwähnten Peptide (CSK-17 bzw. ISU-Peptid) wiesen nur dann eine immunsuppressive Wirkung auf, wenn sie an ein Trägermolekül, wie BSA, gekoppelt wurden (Denner *et al.*, 1994), um dadurch möglicherweise ihre aktive Form bzw. eine Multimerisierung zu erreichen, die für die Interaktion mit Zielmolekülen nötig ist.

Ferner konnte für TM-Proteine und ISU-Peptide gezeigt werden, dass diese die Zytokinproduktion von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) modulieren können. So konnte ein Anstieg der Typ 1-Zytokin-Produktion, wie IL-10, IL-6 und IFN- $\alpha$  und eine Senkung der Produktion von IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , welche zu den Typ 2-Zytokinen gehören, gezeigt werden (Barcova *et al.*, 1998; Denner, 1998; Haraguchi *et al.*, 1992; 1993, 1995; Koutsonikolis *et al.*, 1997). So konnte auch mit rekombinanten gp41 eine Induktion von IL-6 und IL-10 in einer Monozytenzelllinie hervorgerufen werden. Ein Anstieg der IL-6 Produktion konnte bei der Inkubation von PBMCs mit einem HIV-ISU-Heteropolymer und TM-Protein von HERV-K ebenfalls in einer Microarray Analyse der AG Denner detektiert werden. Das Typ 2-Zytokin IL-10 spielt eine kritische Schlüsselrolle bei der Suppression der Immunantwort (Howard *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1993, 2001). So begünstigt IL-10 die T<sub>H</sub>2-Antwort und hemmt eine T<sub>H</sub>1-Zytokinausschüttung. Des Weiteren werden die Expression von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  und die Bildung von Makrophagen bzw. DCs supprimiert. So konnte bei HIV-Positiven ein erhöhter IL-10 Wert (Clerici *et al.*, 1994; Denis *et al.*, 1994) und bei *in vitro* Versuchen ein erhöhtes IL-10 mRNA-Level in Monozyten und T-Zelllinien nach HIV-Infektion nachgewiesen werden (Borghi *et al.*, 1995; Barcellini *et al.*, 1994; Graziosi *et al.*, 1994).

Des Weiteren konnte ein inhibitorischer Effekt von ISU-Peptiden auf Proteinkinase C (PKC) und cAMP gezeigt werden. PKC und cAMP spielen eine wichtige Rolle in den Signalwegen zur Aktivierung von Immunzellen. Bei HIV-Positiven Patienten konnte ein signifikant erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel in T-Zellen nachgewiesen werden (Hofmann *et al.*, 1993). Ferner ist die Typ 1- und Typ 2-Zytokinexpression abhängig von der intrazellulären cAMP-Konzentration. So erfolgt bei einem niedrigem cAMP-Spiegel die Typ 1- und bei hoher cAMP-Konzentration die Typ 2-Expression (Haraguchi *et al.*, 1995). Hierfür spricht ebenfalls die wesentlich höhere intrazelluläre cAMP-Konzentration in T<sub>H</sub>2-Zellen im Vergleich zu T<sub>H</sub>1-

Zellen (Novak *et al.*, 1990). Der inhibierende Einfluss von HIV-ISU-Peptiden beruht daher wahrscheinlich auf der Modulation der Zytokinproduktion.

Obwohl der genaue Mechanismus der Immunsuppression durch Retroviren noch unklar ist, zeichnet es sich ab, dass diese hochkonservierten Bereiche in den transmembranen Env-Proteinen in diesen Prozess involviert sind (Denner, 2000). Momentan sind der genaue Einfluss und die immunpathogenen Eigenschaften von retroviralen transmembranen Hüllproteinen wie p15E und gp41 mit ihren ISU-Domänen noch ungeklärt. Ferner stellen die an Trägermoleküle gebundenen ISU-Peptide nur ein Model dar und es ist daher nicht sicher, ob sich diese *in vivo* ähnlich dem *in vitro* Model verhalten. Des Weiteren ist noch unklar, wie die synthetischen Peptide *in vitro* die immunsuppressiven Effekte auslösen. Allerdings lassen die bisherigen Studien darauf schließen, dass das ISU-Peptid *in vivo* einen direkten immunsuppressiven Effekt aufweist und somit zu einer Immundysfunktion in AIDS-Patienten beitragen kann.

## 2 ZIELSTELLUNG

Retroviren sind in der Lage, beim infizierten Wirt Immunsuppressionen auszulösen. Bekanntestes Beispiel ist hierbei wohl das humane Immundefizienzvirus, dem bisher weltweit mehr als 25 Millionen Menschen zum Opfer fielen. Im Moment ist noch nicht bekannt, wie HIV bei Infizierten eine Immundefizienz hervorruft. Erste experimentelle Daten lassen den Schluss zu, dass die transmembranen Hüllproteine der Retroviren bei der Infektion und der Pathogenese eine wichtige Rolle spielen. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass ein aus der hochkonservierten Domäne von gp41 abgeleitetes Peptid (ISU-Peptid) eine wichtige Rolle in der Modulation der Immunantwort einnimmt. Es wurde bereits gezeigt, dass sowohl gp41 als auch das ISU-Peptid die Proliferation humaner Immunzellen hemmen und die Expression verschiedener Zytokine modulieren.

Da bisher noch nicht aufgeklärt ist, wie gp41 bzw. das ISU-Peptid die Genexpression modulieren, war das Ziel dieser Diplomarbeit, Interaktionspartner von gp41, insbesondere der ISU-Domäne, zu identifizieren und deren Interaktion durch weitere Methoden zu verifizieren. Durch die Arbeitsgruppe wurde vorab bereits ein *yeast two-hybrid screen* mit einer Deletionsmutante der gp41-Ektodomäne, die die ISU-Domäne beinhaltet, in einer Leukozytengenbank durchgeführt. Hierbei konnten erste putative Interaktionspartner detektiert werden, mit denen im Verlauf dieser Arbeit weitere Analysen durchgeführt werden sollten.

### 3 MATERIAL

#### 3.1 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-alpha-D-Galactopyranosid (X- $\alpha$ -Gal)	BD Company, San Jose, USA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bacto™ Peptone	BD Company, San Jose, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Frankfurt a.M. Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Complete™ <sub>EDTA-frei</sub> -Tabletten	Roché, Mannheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R250	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o AA	BD Company, San Jose, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTP-Mix 10mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
EB-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Eisessig/Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glasperlen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
D-Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutathion Sepharose™ 4B	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 3 MATERIAL

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Adeninhemisulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-D(+)-Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG Berlin, Deutschland
L-Histidin HCl Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lithiumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Methionin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Threonin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Uracil	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Valin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) 25 mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	USB Cooperation, Cleveland, USA
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat (DOC)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NEB-Puffer	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, Mannheim, Deutschland
Orange-G	Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 3 MATERIAL

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
PCR-Puffer (10-fach)	Roche, Mannheim, Deutschland
Pepton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ponceau S	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sucrose/Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
T4-Puffer	Fermentas, Mannheim, Deutschland
THP-1 Cell Lysate: sc-2238	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trishydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Tween® 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasser (nukleasefrei)	Promega Cooperation, Madison, USA
Yeast Extract	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Yeast nitrogen base without aa	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
YPD-Broth	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 3.2 Puffer

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung [pro l Aqua bidest.]</b>	<b>Abschnitt</b>
Lösung I (Mini-Präp)	50 mM Glukose, 25 mM Tris.Cl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)	4.2.1, 4.2.2
Lösung II (Mini-Präp)	0,2 M NaOH, 1 % SDS	4.2.1, 4.2.2
Lösung III (Mini-Präp)	60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml H <sub>2</sub> O	4.2.1, 4.2.2
50x TAE-Puffer	2 M Tris, 1 M Acetat, 50 mM EDTA	4.2.6
Ethidiumbromidlsg.	500 µg Ethidiumbromid pro ml	4.2.6
6x Orange G	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.15% Orange G, 60% glycerol, 60 mM EDTA	4.2.6
10x <i>dropout</i>	200 mg L-Arginin HCl, 1500 mg L-Valin, 300 mg L-Isoleucin, 300 mg L-Lysin HCl, 200 mg, L-Methionin, 500 mg L-Phenylalanin, 2000 mg L-Threonin, 300 mg L-Tyrosin, 200 mg L-Uracil	4.3.3

### 3 MATERIAL

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung [pro l H<sub>2</sub>O bidest.]</b>	<b>Abschnitt</b>
100x Adenin	2 g L-Adeninhemisulfat	4.3.3
100x Histidin	2 g L-Histidin HCl Monohydrat	4.3.3
Probenpuffer	10 % Glycerin, 2 % SDS, 0,001 % Bromphenolblau 62,5 mM Tris (pH 6,8); 6 ml H <sub>2</sub> O, 5 % β-ME	4.4.1
10x Laufpuffer	30,3 g Tris, 144,7 g Glycin	4.4.1
Coomassie-Färbelsg.	2,5 g Brillant Blau R250, 10 % Eisessig, 45 % Methanol	4.4.2
Entfärber I	10 % Eisessig, 45 % Methanol	4.4.2
Entfärber II	5 % Eisessig, 5 % Ethanol	4.4.2
Blotpuffer I	0,3 M Tris, 20 % Methanol	4.4.3
Blotpuffer II	25 mM Tris, 20 % Methanol	4.4.3
Blotpuffer III	25 mM Tris, 20 % Methanol, 40 mM α-Amino-n-hexanoicacid	4.4.3
WB-Waschpuffer	10 mM Tris, 0,9 % NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,4	4.4.3
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris (pH 6,7), 100 mM β-ME, 2 % SDS	4.4.3
TBS-T	100 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20	4.4.3
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S in 5 % TCA	4.4.3
2x HBS-Puffer	280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 12 mM D-Glucose, 50 mM HEPES	4.5.1
0,1x TE-Puffer	10 mM Tris (pH 7,4), 1 mM EDTA	4.5.1
RIPA-Puffer	50 mM Tris (pH 7,4); 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 1 % DOC, Complete <sup>TM</sup> <sub>EDTA-frei</sub>	4.5.2
IPA-Puffer	10 mM Tris (pH 7,4); 150 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,2 % Triton X-100, Complete <sup>TM</sup> <sub>EDTA-frei</sub>	4.5.2
2x HKT	20 mM HEPES/KOH (pH7,4); 200 mM KCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 % Triton X-100, Complete <sup>TM</sup> <sub>EDTA-frei</sub>	4.5.5
CMF-Puffer	250 mM Sucrose, 10 mM HEPES/KOH (pH7,4); 1 mM EDTA, Complete <sup>TM</sup> <sub>EDTA-frei</sub>	4.5.5
TIF-Puffer	150 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 8,0); 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 % Nonidet P-40, 10 % Glycerol	4.6.4

### 3.3 Antibiotika

<b>Antibiotikum</b>	<b>Hersteller</b>
Ampicillin (100 µg/ml)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin (35 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (10mg/ml)	Biochrom AG Berlin, Deutschland

---

### 3.4 Stammlösungen

<b>Stammlösung</b>	<b>Konzentration</b>
CaCl <sub>2</sub>	1 M, 2 M
D-Glucose	60 mM
DTT	100 mM
EDTA	100 mM, 50 mM
HEPES/KOH (pH 7,4)	1 M
KCl	1 M
Lithiumacetat	100 mM
NaCl	5 M
MgCl <sub>2</sub>	200 mM
Sucrose	1 M
Tris (pH 5,0)	1 M
Tris (pH 7,4)	1 M
Tris (pH 8,0)	1 M
APS	10 % (w/v)
DOC	10 %
Glucose	40 %
Glyzerin	15% (v/v)
HCl	25 %
PEG	50 %
SDS	20 %
Sucrose	50 %
Ethanol	80 %
Adenin	100x
Complete <sup>TM</sup> <sub>EDTA-frei</sub>	25x
<i>dropout</i>	10x
HBS	2x
Histidin	100x
Laufpuffer	10x
Orange G	6x
PBS	10x
Probenpuffer	4x
TAE	50x
TE	0,1x

---

## 3.5 Antikörper

### 3.5.1 Primäre Antikörper

Name	eingesetzte Verdünnung	Hersteller
TREM-1 (TREM-37)	WB: 1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
TREM-1 (FL-234)	WB: 1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
TREM-1 (D-20)	WB: 1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-human TREM-1 Ab	WB: 1:500	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
TREM1 monoclonal Ab (M04), clone 2E2	WB: 1:500	Abnova, Heidelberg, Deutschland
anti humanes TREM-1 mAb	WB: 1:1000	Dr. Philipp Haselmayer, Mainz, Deutschland
HA.11 Monoclonal Ab MMS-101P	WB: 1:1000	Covance, Emeryville, USA

### 3.5.2 Sekundäre Antikörper

Name	eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin/HRP	WB: 1:2000	Dako, Hamburg, Deutschland
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulin/HRP	WB: 1:2000	Dako, Hamburg, Deutschland
Polyklonal Rabbit Anti-Goat Immunglobulin/HRP	WB: 1:2000	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-Goat-IgG (whole molecule) Peroxidase Antibody A5420	WB: 1:5000	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 3.6 Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung [pro l Aqua bidest.]	Agar	Zellen
LB	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl	15 g/l	Bakterien
2YT	16 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl	15 g/l	Bakterien
YPD	50 g YPD Broth (pH 5,8) + 2 % Glukose, AH109 zusätzlich 1,5 % 1x Adenin	20 g/l	Hefen
SD-HALT	6,7 g <i>Yeast nitrogen base without aa</i> , 2 % Glucose, 1x <i>dropout</i>	20 g/l	Hefen
SD-TL	SD-HALT + 1x Histidin, 1x Adenin		
DMEM	DMEM- Basalmedium + 2 % L-Glutamin, 1 % Pen / Strep, 1 % HEPES, 10 % FKS		HeLa-Zellen, 293 T-Zellen
RPMI-1640	RPMI1640-Basalmedium + 2 % L-Glutamin, 1 % Pen / Strep, 10 % FKS		HL-60 Zellen

### 3.7 Enzyme und Marker

#### 3.7.1 Restriktionsenzyme

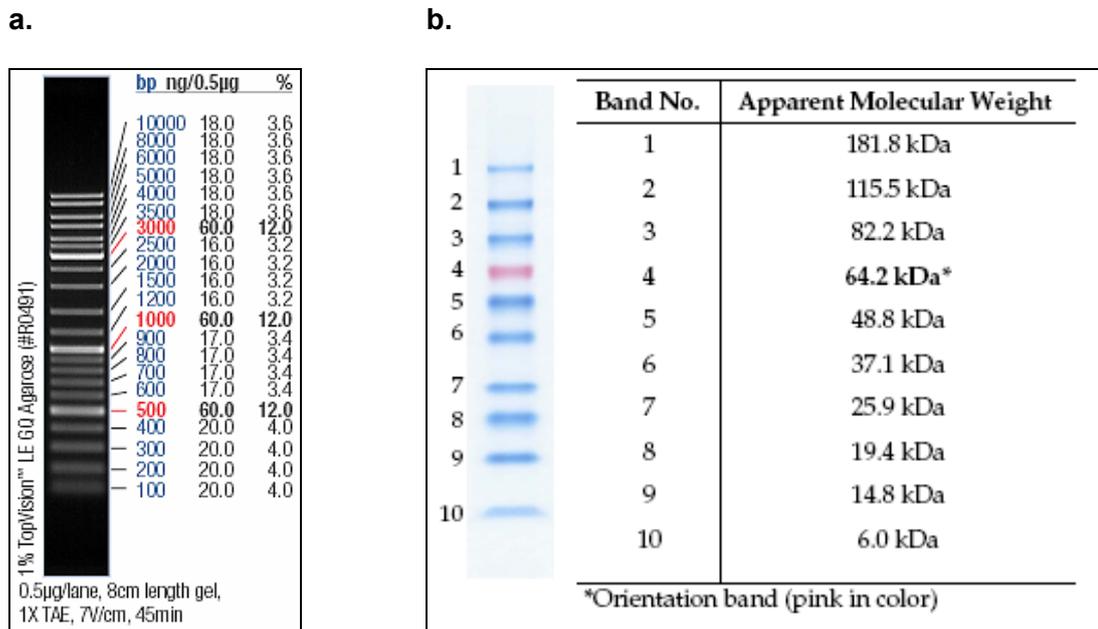
Restriktions- enzym	Aktivität [U/ $\mu$ l]	Hersteller
<i>Bam</i> H I	20	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
<i>Eco</i> RI	10	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
<i>Hind</i> III	20	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
<i>Nco</i> I	10	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
<i>Nde</i> I	20	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
<i>Sac</i> I	20	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
<i>Sal</i> I	20	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
<i>Xcm</i> I	5	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
<i>Xho</i> I	20	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland

### 3.7.2 weitere Enzyme

Enzym	Aktivität [U/ $\mu$ l]	Hersteller
T4-DNA-Ligase	5	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Taq-Polymerase	5	P13 RKI, Berlin, Deutschland
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	5	Applied Biosystems, Darmstadt Deutschland

### 3.7.3 Marker

Marker	Hersteller
O'GeneRuler™ DNA ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Bench Mark™ Prestained Protein ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland



**Abbildung 3.1** Verwendete Marker.

- a. O'GeneRuler™ DNA ladder Mix  
b. Bench Mark™ Prestained Protein ladder

### 3.8 Kommerzielle Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Abschnitt</b>
Miniprep Express Matrix™ Bio 101	Bio 101, Carlsbad, USA	4.2.1, 4.2.2
QIAprep Spin Miniprep <i>Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland	4.2.1
QIAGEN Plasmid Maxi <i>Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland	4.2.1
QIAquick Gel Extraction <i>Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland	4.2.1
MSB® Spin PCRapace	Invitek, Berlin, Deutschland	4.2.4
Rapid DNA Ligation <i>Kit</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland	4.2.8
BigDye® Terminator v3.1 <i>Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Darmstadt Deutschland	4.2.11
Amersham ECL™ <i>Western Blotting Detection System</i>	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	4.4.3

### 3.9 Primer

#### 3.9.1 PCR-Primer

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5´-3´)</b>
Bam NHR rev	TTggATCCCTAACCCCAAATCCCCAggAg
Bam rgp rev	TTggATCCCTAATACCACAgCCAATTTgTTAT
CHR Sall rev	TTgTCgACCTAATACCACAGCCAATTTg
CHR-EcoRI for	TTgAATTCTggAATgCTAgTTggAgT
DE1 (EcoRI)	TTgAATTCAACAATTTgCTgAgggCTATTgAg
gp 41 mut	TTgAATTCACgCTgACggTACAaggCCAgA
GST ΔE1 BamHI	TTGGATCCAACAATTTgCTgAgggCTATTgAg
GST CHR Eco for	TTgAATTCTATGGAATGCTAGTTGGAGT
GST NHR BamHI	TTggATCCACgCTgACggTACAaggCCAgA
GST NHR for (XhoI)	TTCTCgAgACgCTgACggTACAaggCCAgA
GST NHR rev 4K	TTAAgCTTCTATTTCTTTTTCTTACCCCAAATCCCCAggAg
GST NHR rev(HindIII)	TTAAgCTTCTAACCCCAAATCCCCAggAg
GST NHR Xho rev	TTCTCgAgCTAACCCCAAATCCCCAggAg
GST NHR4K Xho rev	TTCTCgAgCTATTTCTTTTTCTTACCCCAAATCCCCAggAg
GST plusNHR Eco for	TTgAATTCTAgCAgCAggAAgCACTATg
GST rgp4K Xho rev	TTCTCgAgCTATTTCTTTTTCTTATACCACAgCCAATTTgTTAT

### 3 MATERIAL

Name	Sequenz (5'-3')
GST rgp Eco for	TTgAATTCTAACgCTgACggTACAaggCCAgA
GST rgp Xho rev	TTCTCgAgCTAATACCACAgCCAATTTgTTAT
GST-CHR BamHI	TTggATCCTggAATgCTAgTTggAgT
GST-deltaE1 BamHI	TTCTCgAgAACAATTTgCTgAgggCTATTgAg
GST-rgp rev (HindIII)	TTAAGCTTCTAATACCACAgCCAATTTgTTAT
GST-RGP rev (Sacl)	TTgAgCTCCTAATACCACAgCCAATTTgTTAT
GST-RGP rev 4K (HindIII)	TTAAGCTTCTATTTCTTTTTCTTATACCACAgCCAATTTgTTAT
GST-RGP rev 4K (Sacl)	TTgAgCTCCTATTTCTTTTTCTTATACCACAgCCAATTTgTTAT
Trem1 for	TTCATATGAggAAgACCAggCTCTgg
Trem1 forEco	TTgAATTCATgAggAAgACCAggCTCTgg
Trem1 forNco	TTCCATggAgATgAggAAgACCAggCTCTgg
Trem1 rev	TTggATCCCTAgggTACAAATgACCT
Trem2 for	TTCATATggAgCCTCTCCggCTgCTC
Trem2 rev	TTggATCCTCACgTCTCTCAgCCC

#### 3.9.2 Sequenzierungsprimer

Name	Vektor	Sequenz (5'-3')
pGexKG for	pGex-KG	gCgACCATCCTCCAAAATC
pGexKG rev	pGex-KG	ggCATCCgCTTACAgACAAG
pGBKT7 Kolonie for	pGBKT7	gTTgACTgTATCgCCggAAT
pGBKT7 Kolonie rev	pGBKT7	CCCCAAggggTTATgCTAgT
fish for	pACT2	CTATTCgATgATgAAgATACCCCACCAAACCC
fish rev	pACT2	gTgAACTTgCggggTTTTTCAgTATCTACgAT
pEGFP-C2 for	pEGFP-C2	CgACCACTACCAgCAgAACA
pEGFP-C2 rev	pEGFP-C2	gggAggTgTgggAggTTTT
T7-Prom	pSSTA	CgAAATTAATACgACTCA
T7-Term	pSSTA	gCTAgTTATTgCTCAgCggTg

Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland hergestellt.

## 3.10 Organismen

### 3.10.1 Bakterien

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80d/lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), $\lambda$ -	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ DE3 (lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5)	Studier und Moffat, 1986

### 3.10.2 Hefen

Hefestamm	Genotyp	Referenz
<i>S. cerevisiae</i> AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2 : : GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3, GAL2 <sub>UAS</sub> -GAL2 <sub>TATA</sub> -ADE2, URA3 : : MEL1 <sub>UAS</sub> -MEL1 <sub>TATA</sub> -lacZ	James <i>et al.</i> , 1996

### 3.10.3 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Organismus
HEK 293 T-Zellen	embryonale Nierenkarzinomzellen	Mensch
HL-60 Zellen	Promyelozytenleukämiezellen	Mensch
HeLa-Zellen	epitheloide Zervixkarzinomzellen	Mensch

## 3.11 DNA-Genbank

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die *Human Leukozyte Library* des MATCHMAKER™ System 3 eingesetzt. Diese wurde von BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland bezogen. Hierbei handelt es sich um cDNA Fragmente einer Leukozytengenbank, die in den *prey* Vektor pACT2 einkloniert worden sind.

### 3.12 Peptide

Peptid	Sequenz
HIV-ISU	Bio-Ahx-Ahx-KQLQARILAVEERYLKDQQL
randomisiertes HIV-ISU	Bio-Ahx-Ahx-QQEKVAADKLRRLIQYQLLR

Die Monomere der folgenden von HIV-1 gp41 abgeleiteten Peptide wurden von der Firma Genaxxon Bioscience, Biberach, Deutschland, synthetisiert und über einen 6-Aminohexansäure (Ahx)-Linker an Biotin (Bio) gekoppelt.

### 3.13 Klonierungsvektoren<sup>3</sup>

#### pGBKT7

Dieses Plasmid dient als *bait*-Vektor in der *yeast two-hybrid* Analyse. Die Konstrukte  $\Delta$ NHR und  $\Delta$ rgp wurden durch die Arbeitsgruppe in diesen Vektor einkloniert. Des Weiteren sollen die Konstrukte rgp und CHR für weitere *yeast two-hybrid* Analysen in diesen eingebracht werden. Er kann über seine Kanamycinresistenz selektioniert werden und besitzt eine GAL4-DNA-Bindedomäne. Er wurde über Clontech, Heidelberg, Deutschland bezogen.

#### pEGFP-IJ-PMM1

Dieser Vektor ist ein Abkömmling des pEGFP-C2 Vektors. Er beinhaltet durch Umklonierungen eine HA-Epitop-kodierende Sequenz, die Schnittstellen *Nde* I und *Bam* HI, hinter der EGFP-kodierenden Region. Über diese Schnittstelle ist die Phosphomannomutase 1 einkloniert worden. Er wurde zur Transfektion von eukaryotischen Zellen eingesetzt.

#### pCAL-n rgp41

In den Vektor pCALn rgp41 ist eine verkürzte Form der gp41-Nukleotidsequenz einkloniert. Durch gezieltes Ansetzen von Primern sollen so verschiedene gp41-Konstrukte amplifiziert und in verschiedene Vektoren umkloniert werden. Er wurde von der AG P13 des RKI Berlin bereitgestellt.

---

<sup>3</sup> Die entsprechenden Vektorkarten befinden sich im Anhang.

**pGex-KG**

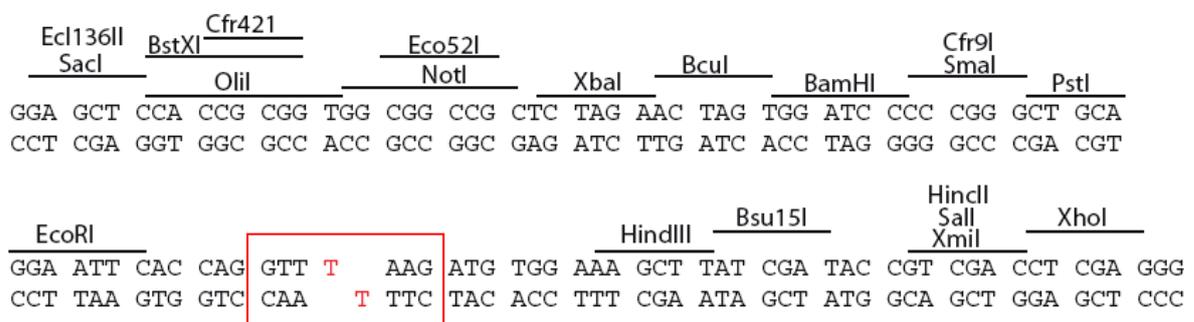
Dieser Vektor besitzt vor der MCS ein GST-Tag, das Gluthatione-S Transferase Gen aus *Schistosoma japonicum*. Dadurch entstehen durch die zusätzlich einklonierten Sequenzen GST-Fusionspeptide; die im N-terminalen Bereich, das 26 kDa schwere GST enthalten. Er kann aufgrund seiner Ampicillinresistenz selektioniert werden.

**pACT2**

Die *prey*-cDNA-Fragmente der *Human Leukozyte Library* des Matchmaker System sind in diesen Vektor einkloniert. Dieser Vektor wird über Ampicillin selektioniert und besitzt eine GAL4-Aktivierungsdomäne. Des Weiteren sollte TREM1 als Vollängenkonstrukt in diesen Vektor eingebracht werden, um eine Interaktion in einer erneuten *yeast two-hybrid* Analyse nochmals bestätigen zu können. Er wurde über Clontech, Heidelberg, Deutschland bezogen.

**pSSTA-ITLN2**

Dieser Vektor wurde als Zwischenvektor genutzt, um DNA-Fragmente in verschiedene Vektoren zu klonieren. Er besitzt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Xcm* I, welches TA-Überhänge im Vektor schafft (siehe Abb.3.2). Das Einklonieren von Konstrukten mit verschiedenen Restriktionsenden wird somit erleichtert, da die verwendete Taq-Polymerase TA-Überhänge an den PCR-Fragmenten generiert. Dieser Vektor kann über seine vorhandene Ampicillin-Resistenz selektioniert werden und wurde von Sven Stengel der Arbeitsgruppe P13 vom RKI Berlin bereitgestellt.



**Abbildung 3.2 Ausschnitt aus der MCS von pSSTA.**

Der rote Rahmen zeigt die entstandenen TA-Überhänge durch die Restriktion von pSSTA mit *Xcm* I.

## 4 METHODEN

### 4.1 Kultivierung und Stammhaltung von Organismen

#### 4.1.1 Bakterien und Hefen

##### **Bakterien**

Es werden die Stämme DH5 $\alpha$  und BL21 von *Escherichia coli* verwendet (siehe 3.10.1). Diese werden in Flüssig- und auf Festmedien, d.h. in Schüttelkulturen oder auf Agarplatten, kultiviert. Hierbei wird 3 ml 2YT-Medium (siehe 3.6) mit Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur bzw. mit einer Einzelkolonie einer bewachsenen Agarplatte beimpft und bei 37°C über Nacht auf einem Rundschtüttler bei 250 rpm und ausreichender Belüftung inkubiert. Agarplatten werden ebenfalls bei 37°C über Nacht im Brutschrank bebrütet. Die Anzucht eines transformierten Bakterienstammes in Reinkultur erfolgte durch Zugabe von Antibiotika. Es werden je nach Plasmidresistenz Ampicillin bzw. Kanamycin Medium supplimentiert (siehe 3.3).

Für eine kurzfristige Lagerung – für max. 3 Monate – werden sowohl Agarplatten als auch PP-Röhrchen mit Parafilm versiegelt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung werden Glycerinkulturen von Übernachtskulturen angelegt und bei -20°C bzw. -80°C eingelagert.

##### **Hefen**

Im Rahmen dieser Arbeit wird für das *yeast two-hybrid* System der Stamm AH109 der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) genutzt. Der Stamm wird in einem YPD-Vollmedium, komplettiert mit 2 % Glukose, aus einer Glycerinkultur, von einer Agarplatte oder aus einer Hefesuspension, die mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden kann, angezogen. Die daraus angeimpften Schüttelkulturen bzw. Agarplatten werden bei 30°C entweder bei 220 rpm auf einem Rundschtüttler oder in einem Brutschrank inkubiert.

##### **Anlegen einer Glycerinkultur**

Die Stammhaltung von Bakterien und Hefen erfolgte in Glycerinkulturen. Bei Bakterien werden zu 850  $\mu$ l einer frischen, gut bewachsenen Schüttelkultur 150  $\mu$ l 100 %-iges steriles Glycerin (Endkonzentration 15 % Glycerin) in einem Kryoröhrchen gemischt und bei -20°C

bzw.  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Hefenkulturen werden unterdessen in einem Verhältnis von 1:1 mit 100 %-igem Glycerin gemischt und ebenfalls eingefroren. Alle Schritte erfolgten auf Eis.

### Wachstumsmessung

Um das Wachstum einer Hefe- oder Bakterienkultur zu bestimmen, wird die optische Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Photometer gemessen. Hierbei wird die Eigenabsorption der Zellen genutzt und die gemessenen Extinktionswerte können für die Ermittlung der Zellzahlkonzentration herangezogen werden. Die Extinktion beruht auf der Grundlage des Lambert-Beerschen-Gesetz.

Die Schichtdicke der benutzten Küvetten betrug 10 mm. Der Zustand der Hefen konnte weiterhin mikroskopisch beurteilt werden, da die Zellen in der Wachstumsphase eine deutliche Knospung aufweisen.

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

$\Delta E$  Extinktionskoeffizient

$\epsilon_{\text{mol}}$  molarer Extinktionskoeffizient

$c$  Konzentration [Zellen/ml]

$d$  Schichtdicke der Küvette [cm]

#### 4.1.2 Eukaryotische Zellen

In dieser Arbeit werden HL-60 Zellen, 293 T-Zellen und HeLa-Zellen verwendet (siehe 3.10.3), die in Gewebekulturschalen gehalten werden. Bei HL-60 Zellen handelt es sich um eine Suspensionzelllinie, die in RPMI-1640 Medium (siehe 3.6), komplettiert mit FKS, L-Glutamin und Penicillin / Streptomycin, kultiviert wird. 293 T-Zellen und HeLa-Zellen wachsen dagegen als *monolayer* mit stetem Kontakt zum Untergrund und werden daher als adhärenente Zelllinien bezeichnet. Beide Zelllinien werden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, siehe 3.6), komplettiert mit FKS, L-Glutamin, HEPES und Penicillin / Streptomycin, kultiviert.

Die Anzucht und Kultivierung der eukaryotischen Zellen erfolgte bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ -Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank. Alle Arbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Kulturmedien und weitere Lösungen werden in einem Wasserbad auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt.

### Passagieren von Zellen

Für die Passagierung werden adhärente Zellen zunächst gründlich mit PBS (*phosphat buffered saline*) gewaschen, um abgestorbene Zellen und Mediumreste zu entfernen. Anschließend werden sie kurz mit 0,05% (w/v) Trypsin-Lösung benetzt und zur Unterstützung der enzymatischen Reaktion für 30 sek in den Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch anschließendes leichtes Klopfen an die Kulturschale können so die Zellen von dem Untergrund gelöst werden und durch Zugabe von Medium wird die Reaktion gestoppt. Um Trypsinreste zu entfernen werden die Zellen anschließend für 4 min und 1000x g bei RT abzentrifugiert und das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen. Suspensionszellen werden für 4 min und 1000x g bei RT abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in frischem Medium aufgenommen. Anschließend können die Zellen in entsprechender Verdünnung auf neue Gewebekulturschalen aufgeteilt werden.

### Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung

Zur Zellzahlbestimmung werden die Zellen pro Flasche in 10 ml Medium aufgenommen. Anschließend werden 10 µl der Zelllösung mit 10 µl Trypanblau in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Gemisch wird folgend in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und in vier geeichten Feldern werden die Zellen ausgezählt. Trypanblau bindet an Zellproteine. Tote Zellen werden tiefblau angefärbt, da der Farbstoff durch defekte Zellmembranen in das Zytosol gelangt und dort mit intrazellulären Proteinen reagiert. Dagegen erscheinen lebende Zellen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Dadurch ist eine Unterscheidung leicht möglich. Die Quersumme der Zellzahlen wird mit dem Kammerfaktor verrechnet, so dass sich die Zellkonzentration nach folgender Formel berechnen lässt: Die Zellkonzentration musste anschließend mit dem Gesamtvolumen der vorhandenen Zellsuspension multipliziert werden, um die absolute Zellzahl zu errechnen.

$$Z = N \times 2 \times 10^4$$

Z Zellen / ml

N Quersumme der Zellzahl

2 Verdünnungsfaktor Trypanblau

$10^4$  Faktor der Neubau-Zählkammer

### Lagerung von Zellen

Die Kryokonservierung ermöglicht die Lagerung von Zellen über mehrere Jahre. Hierbei werden die Zellen stark abgekühlt, wobei der Stoffwechsel fast zum Stillstand kommt. Nach dem Auftauen können die Zellen ihre normalen physiologischen Prozesse wieder aufnehmen.

Als Einfriermedium diente FKS mit 10 %-igem steril filtriertem Dimethylsulfoxid (DMSO). Eine konfluent bewachsene Gewebekulturflasche wird wie unter Passagieren der Zellen aufgearbeitet und das erhaltene Zellpellet in FKS aufgenommen. Anschließend wird das DMSO Tropfenweise zur gekühlten Zellsuspension hinzugefügt. DMSO bewirkt eine Porosität der Zellmembran und somit den Wasseraustritt aus der Zelle, um so eine Kristallbildung bei dem Einfrieren innerhalb der Zelle zu vermeiden. Im nächsten Schritt werden 1,8 ml der Suspension in ein Kryoröhrchen überführt, langsam innerhalb von etwa 24 h auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und in einen Stickstofftank eingelagert.

## 4.2 Arbeiten mit DNA

### 4.2.1 Plasmidisolierung

#### Bakterien

Das Prinzip der Plasmidisolierung basiert auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat werden die Zellwände der Bakterien aufgeschlossen. Durch die Zugabe von Natriumhydroxid werden bakterielle Proteine und DNA unter stark alkalischen Bedingungen denaturiert. Bei der anschließenden Neutralisationsreaktion mittels Kaliumacetat erfolgt eine Renaturierung der doppelsträngigen Plasmid-DNA, während die weit größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt. Durch den folgenden Zentrifugationsschritt kann nun Plasmid-DNA von chromosomaler DNA getrennt werden, da diese aufgrund ihrer Größe und Struktur gemeinsam mit den Zellresten abzentrifugiert wird, während die kleineren, freien Plasmide im Überstand bleiben. In dem nächsten Schritt wird die Plasmid-DNA an einen Träger gebunden und mehrmals gewaschen. Als letzten Schritt wird DNA in EB-Puffer aufgenommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird mit *ready-to-use Kits* gearbeitet (siehe 3.8). Entsprechend der aufzureinigenden Plasmid-DNA werden Mini- und Maxipräparationen durchgeführt. Minipräparationen werden mit dem Miniprep Express Matrix™ Bio 101 *Kit* oder mit dem

QIAprep Spin Miniprep *Kit* durchgeführt. Maxipräparationen mit dem QIAGEN Plasmid Maxi *Kit*. Alle DNA-Präparationen sind laut Herstellerangabe durchgeführt worden.

### Hefen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen erfolgte mit dem Miniprep Express Matrix™ Bio 101 *Kit*, ebenfalls nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Durch Zugabe von Glaskügelchen und folgendem zwei minütigem vortexen wird das Aufschließen der Zellen unterstützt. Des Weiteren wird wie im Protokoll des Herstellers verfahren.

### 4.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der DNA wird ein NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Als Leerwert diente der entsprechende Puffer/Wasser indem die DNA aufgenommen wird. Proteine weisen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf und Nucleinsäuren absorbieren bei 260 nm Wellenlänge. Das Verhältnis von  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt einen Wert für die Reinheit der DNA an und sollte zwischen 1,8-2,0 liegen.

### 4.2.3 PCR (*polymerase chain reaction*)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986) wird zur Amplifikation von DNA benutzt. Dies ist eine *in vitro* Technik mit der gezielt Matrizen-DNA, die von zwei bekannten Sequenzabschnitten eingerahmt ist, amplifizieren kann. Hierbei wird im ersten Schritt DNA bei 94°C denaturiert. Im anschließenden *Annealings*schritt wird die Temperatur gesenkt, sodass die im Überschuss vorliegenden zwei spezifischen Oligonukleotidprimer mit der einzelsträngigen *Template*-DNA hybridisieren. Die Temperatur wird hierbei an das Temperatur-Optimum der Primer angepasst. Im letzten Schritt wird die Temperatur wieder auf 72°C erhöht, da dies das Temperaturoptimum für die Taq-Polymerase ist. Diese verlängert nun in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die *Primer* entlang der Matrize und synthetisiert so neue DNA-Stränge. Weil die Komplementierung an beiden Strängen der *template*-DNA abläuft, hat man in einem Zyklus die *template*-DNA verdoppelt. Um eine möglichst hohe Ausbeute an DNA zu erzielen, wird dieser Zyklus mehrfach wiederholt. In dieser Arbeit wird die thermostabile Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988) genutzt.

**Kolonie-PCR**

Eine Kolonie-PCR dient zu einer schnellen Detektion einer erfolgreichen Klonierung von einem Insertfragment. Durch den Denaturierungsschritt kommt es zu der Lyse der Bakterien und der Freisetzung der Plasmid-DNA, welche als Matrize dient. Durch die Zugabe der spezifischen Primer konnte das gesuchte Fragment amplifiziert und durch Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden. Hierbei wird ein zu untersuchender Klon direkt mit einer sterilen Spitze von einer Nähragarplatte gepickt. Dieser wird in das vorgelegte Wasser übertragen und anschließend auf eine trockene Agarplatte überimpft, um einen positiven Klon neu kultivieren zu können. Danach wird der Ansatz wie folgt vervollständigt.

<b>Ansatz für eine PCR</b>		<b>Ansatz für eine Kolonie-PCR</b>	
1 µl	DNA		gepickter Klon
2 µl	10x PCR-Puffer	2 µl	10x PCR-Puffer
1,25 µl	MgCl <sub>2</sub>	1,25 µl	MgCl <sub>2</sub>
1 µl	dNTP-Mix	1 µl	dNTP-Mix
1 µl	Primer 1	1 µl	Primer 1
1 µl	Primer 2	1 µl	Primer 2
0,5 µl	Haus-Taq	0,5 µl	Haus-Taq
12,25 µl	H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)	13,25 µl	H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)
20 µl	Gesamtvolumen	20 µl	Gesamtvolumen

<b>PCR 65</b>		<b>PCR 70</b>	
10'	94°C	10'	94°C
1'	94°C	1'	94°C
1'	65°C	1'	70°C
1'	72°C	1'	72°C
5'	72°C	5'	72°C
∞	4°C	∞	4°C

} 34 Zyklen

Um Kontaminationen auszuschließen wird eine Wasserprobe als Negativkontrolle mitgeführt. Die genutzten *forward* und *reversed* Primer (siehe 3.9) wurden von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland synthetisiert.

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte entweder mittels MSB® Spin PCRapace *Kit* (siehe 3.8) oder durch Auftrennung der amplifizierten DNA durch Acrylamidgelelektrophorese (siehe 4.2.5) und anschließender Aufreinigung eines ausgeschnittenen Gelblocks durch das QIAquick Gel Extraction *Kit* (siehe 4.2.6). Die Aufreinigung unter Anwendung eines *Kits* erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### 4.2.4 Restriktion

Bei einem Restriktionsverdau kommen so genannte Restriktionsenzyme zum Einsatz. Diese gehören zu den Endonukleasen und schneiden durch Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen Doppelstrang-DNA auf. Dies geschieht an spezifischen Erkennungssequenzen, welche meist 4-8 bp lange Palindrome darstellen. Die eingesetzten Restriktionsenzyme gehören zum Typ II und erzeugen entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder klebrige Enden (*sticky ends*).

Das Zerschneiden der DNA durch Restriktionsenzyme diente sowohl als präparatives Hilfsmittel für Klonierungen als auch zu analytischen Zwecken, wie beispielsweise der Erfolgskontrolle nach Klonierungen.

Für eine optimale enzymatische Reaktion werden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer eingesetzt und der Gesamtansatz bei 37°C für 1-2 Stunden inkubiert.

<b>Ansatz für einen Restriktionsverdau</b>	
1-5 µg	Plasmid DNA
1 U/µg DNA	Restriktionsendonuklease
3,0 µl	10x Puffer
3,0 µl	BSA (optional)
x µl	H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)
<hr/>	
30 µl	Gesamtvolumen

#### 4.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Mit Hilfe der Gelelektrophorese ist es möglich, DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufzutrennen (Reisfeld *et al.*, 1962; Ornstein, 1964). Aufgrund negativ geladener Phosphatgruppen im Rückgrat der DNA kann diese in einem Gleichspannungsfeld zur Anode wandern. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit unter anderem von der

Anzahl der Basenpaare und der Konformation der DNA sowie der angelegten Spannung ab. Agarose dient hierbei als interne Matrix und bildet eine dreidimensionale vernetzte Struktur, die ebenfalls die Laufgeschwindigkeit der DNA beeinflusst. Eine Auftrennung erfolgt hierbei je nach Fragmentgröße in Gelen mit unterschiedlicher Agarosekonzentration. Für Fragmente einer Größe von 9 bis 0,5 kb erfolgte die Auftrennung mit Hilfe von 1 %-igen Gelen.

Die Agarose wird in entsprechender Menge 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst und anschließend das Gel gegossen. Um die Lauffront der Proben sichtbar zu machen wird diesen 1x Orange G (Verhältnis 1:10) zugegeben und folgend die Proben in die Geltaschen pipettiert. Im nächsten Schritt wird die DNA je nach Gelgröße bei ca. 80-120 V aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Das Sichtbarmachen der DNA erfolgte durch 20 minütiges Anfärben in einer Ethidiumbromidlösung (siehe 3.2). Diese aromatische organische Verbindung interkaliert mit dem DNA-Strang und regt man diese mit UV-Strahlung an wird Licht emittiert, sodass man DNA-Fragmente sehen kann.

Um die Größe der Fragmente abzuschätzen wird als Längenstandard der O'GeneRuler™ DNA ladder Mix (siehe 3.7) der Firma Fermentas mitgeführt, dessen Banden ein definiertes Molekulargewicht besitzen.

### 4.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von aufgetrennten DNA-Fragmenten erfolgte mittels des QIAquick Gel Extraction *Kit* der Firma Qiagen.

Hierbei werden die gewünschten Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Gelextraktion anschließend nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Grundsätzlich basiert die Aufreinigung darauf, dass die Agarose aufgeschmolzen wird und anschließend die DNA-Fragmente an eine Matrix gebunden und somit aufgereinigt werden. Folgend wird die DNA von der Matrix eluiert und in EB-Puffer aufgenommen. Sie steht nun für weitere Versuche wie die PCR oder die Ligation zur Verfügung.

### 4.2.7 Ligation

Bei einer Ligation werden DNA-Fragmente kovalent miteinander verknüpft. Hierbei katalysiert das Enzym DNA-Ligase die Bildung einer 3',5'-Phosphodiesterbindung von *sticky* oder *blunt ends* (Crouse *et al.*, 1983).

In dieser Arbeit werden zur Konstruktion neuer Plasmide Vektoren und amplifizierte PCR-Fragmente (*inserts*) zuvor mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen restringiert (siehe 4.2.4) und anschließend die entstanden kompatiblen Enden mittels DNA-Ligase verbunden. Im Zwischenvektor pSSTA werden durch Restriktion mit *Xcm*I TA-Überhänge geschaffen. Bei verwendeten *inserts* für eine Ligation in pSSTA werden durch die Taq-Polymerase bei der Amplifizierung bereits TA-Überhänge geschaffen, sodass keine vorherige Restriktion der Fragmente nötig war. Die *insert*-DNA sollte gegenüber der Vektor-DNA in einem 3-fach molaren Überschuß vorhanden sein. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C und der Ligationsansatz ist folgend aufgeführt.

<b>Ansatz für eine Ligation</b>	
x ng	Vektor-DNA
3-fach molarer Überschuß	<i>insert</i> -Fragment
3,0 µl	T4-Puffer
1,0 µl	T4-DNA-Ligase
x µl	H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)
30 µl	Gesamtvolumen

Ligationen werden zum Teil mit dem Rapid DNA Ligation *Kit* der Firma Fermentas durchgeführt. Hierbei wird nach Angaben des Herstellers verfahren.

#### 4.2.8 Herstellung kompetenter Bakterien

Die natürliche Transformationseffizienz von Bakterien kann durch Behandlung mittels chemischer oder physikalischer Methoden gesteigert werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden *E. coli* DH5α mittels Calciumchlorid-Methode kompetent gemacht.

Hierbei wird 10 ml 2YT-Medium angeimpft mit DH5α über Nacht bei 250 rpm und 37°C inkubiert. Am folgenden Tag werden 500 ml 2YT-Medium mit 1/100 der ÜN-Kultur inokkuliert und bei 250 rpm und 37°C inkubiert. Hierbei wird in regelmäßigen Abständen die Optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt (siehe 4.1.1). Bei einem OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 wird die Bakteriensuspension auf 50 ml-Falcontubes aufgeteilt und dann für ca. 10 min auf Eis gelagert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 7 min bei 4°C und 2000x g. Anschließend wird das Pellet in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für mind. 30 min. auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wird die Suspension erneut für 5 min bei 4°C und 2000x g

abzentrifugiert. Das folgend erhaltene Pellet wird in 2 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Als Gefrierschutzmittel zur längerfristigen Einlagerung wird dem Ansatz Glycerin in einer Endkonzentration von 10 % hinzugefügt. Anschließend wird die Lösung à 100 µl in Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### 4.2.9 Transformation von Bakterien

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von freier DNA in einen Wirtsorganismus, hier Bakterien. Plasmid-DNA, die auf diesem Weg eingebracht wird, repliziert sich unabhängig von der chromosomalen / genomischen DNA.

Bei der Transformation werden 1-5 ng Plasmid oder ein gesamter Ligationsansatz zu 100 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Bakterien hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C für 1 min, gefolgt von einem Kälteschock auf Eis für 5 min. Im nächsten Schritt werden 150 µl 2YT-Medium zum Ansatz pipettiert und dieser dann für 45 min bei 37°C und 250 rpm auf einem Rundschüttler inkubiert, welche die Ausbildung der Antibiotikaresistenz ermöglicht. Danach wird der Ansatz auf 2YT-Agarplatten mit entsprechender Antibiotikaresistenz des Plasmids ausplattiert und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

### 4.2.10 Überprüfung einer Klonierung

Die Effizienz einer Transformation kann ca. 12 Stunden nach Ausplattieren anhand der angewachsenen Kolonien bestimmt werden. Hierbei werden 2 ml 2YT-Medium mit entsprechender Antibiotikaresistenz jeweils mit einer Einzelkolonie inokkuliert und anschließend über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Folgend wird die Plasmid-DNA isoliert (siehe 4.2.1), restringiert (siehe 4.2.4) und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.2.5). Bei einer positiven Überprüfung wird eine Glycerinkultur angelegt.

### 4.2.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Bestimmung der Nukleotidabfolge einer bestimmten DNA-Sequenz und erfolgte mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Bei dieser Methode wird wie bei einer PCR von einem Primer ausgehend der komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Anders als bei einer PCR werden neben Desoxyribonukleotiden (dNTP) auch Didesoxyribonukleotide (ddNTP) zum Reaktionsansatz

hinzugegeben. Bei dem Einbau der ddNTPs in den wachsenden komplementären Strang kommt es zum Kettenabbruch. Grund hierfür ist, dass ihnen eine zur Verlängerung nötige Hydroxylgruppe fehlt und so eine Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verhindert wird. Der Einbau der modifizierten Nukleotide erfolgt in Abhängigkeit von deren Konzentration in einer gewissen Wahrscheinlichkeit. Entsprechend der 4 dNTPs werden auch 4 ddNTPs verwendet. Durch eine anschließende Auftrennung des Reaktionsgemisches und gleichzeitiger Detektion, kann so ermittelt werden, an welcher Position das entsprechende ddNTP eingebaut worden ist. Eine Sequenzierung beginnt mit einer initialen Denaturierung und verläuft dann zyklisch, wobei auf die Denaturierung die Primeranlagerung und Primerverlängerung folgt.

In dieser Arbeit wird das BigDye® Terminator v3.1 *Cycle Sequencing Kit* der Firma Applied Biosystems genutzt. Hierbei sind zur Detektion unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe an die ddNTPs gekoppelt. Die Analyse erfolgt mittels Kapillarelektrophorese im hauseigenen Labor des RKI Berlin. Dabei wird folgender Ansatz und Sequenzierungsprogramm verwendet.

<b>Ansatz für eine Sequenzierung</b>	
1,0 µl	DNA
0,5 µl	Primer
2,0 µl	BigDye® <i>reaction mix</i>
1,0 µl	5x ABI-Puffer
x µl	H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)
<hr/>	
10 µl	Gesamtvolumen

<b>Sequenzierungsprogramm</b>	
2'	96°C
10''	96°C
5''	50°C
4'	60°C
} 25 Zyklen	

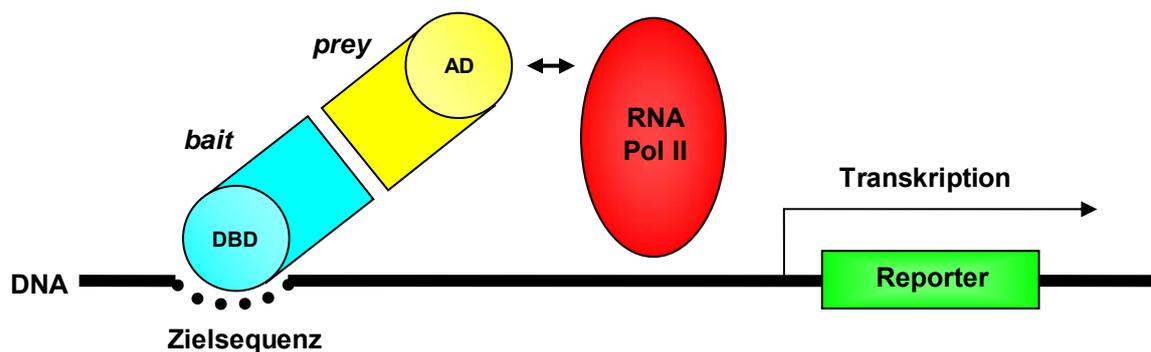
### 4.3 Das *yeast two-hybrid* System

Die *yeast two-hybrid* Analyse ist ein *in vivo* System um Protein-Protein Interaktionen nachzuweisen und wurde von Fields und Song entwickelt (Fields und Song, 1989). Sie kann zur Erforschung von Interaktionen bereits bekannter Proteine oder durch *screening* einer Bibliothek zur Identifikation bisher unbekannter Bindungspartner genutzt werden. In dem man spezifische Mutanten in der Analyse anwendet, können spezifische Domänen oder Aminosäuren, die eine kritische Rolle in der Interaktion einnehmen, charakterisiert werden (Chien *et al.*, 1991, Li und Fields, 1993).

Es basiert auf der Rekonstitution eines eukaryotischen Transkriptionsfaktors, der aus einer DNA-Bindedomäne (DBD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) besteht. Die DBD erkennt

eine spezifische DNA-Sequenz. Die AD koordiniert die Assemblierung von für die Transkription notwendige Faktoren und ermöglicht das Ablesen von *downstream* liegenden Reportergenen durch die DNA-Polymerase II. Bei dem *yeast two-hybrid* System wird nun ein bekanntes Protein X als Fusionsprotein mit der DBD (*bait*) und ein unbekanntes Protein Y als Fusionsprotein mit der AD (*prey*) exprimiert. Bei einer Interaktion von X und Y kommt es zur Expression der Reportergene. AD und DBD müssen allerdings nicht kovalent gebunden sein, denn schon die räumliche Nähe gewährleistet die Aktivierung der RNA-Polymerase und folgend die Transkription des Zielgens (Keegan *et al.*, 1986).

In dieser Arbeit wird das MATCHMAKER™ *two-hybrid* System 3 verwendet. Dieses macht sich die Funktionseinheiten des Transkriptionsfaktors von Gal4 (Gal4-DBD und Gal4-AD) aus *Saccharomyces cerevisiae* zunutze. Über die Interaktion dieses Transkriptionsfaktors mit drei UAS (*upstream activating sequences*) und Promotorelementen innerhalb des Genoms des Hefestammes AH109 wird die folgende Transkription der Reportergene *his3*, *ade2* und *mel1 / lacZ* reguliert.



**Abbildung 4.1** Das allgemeine Prinzip des *yeast two-hybrid* Systems.

Das *bait*-Fusionsprotein besitzt eine DNA-Bindedomäne (DBD) und das *prey*-Fusionsprotein eine Aktivierungsdomäne (AD). Erfolgt eine Interaktion beider Proteine miteinander kommt es zur Aktivierung der RNA-Polymerase II (RNA-Pol II), die daraufhin die Transkription der Reportergene initiiert.

Durch die Konstruktion geeigneter Plasmide, die sowohl eine Expression eines Gal4-DBD-Fusionsproteins als auch eines Gal4-AD-Fusionsproteins nach Transfektion eines geeigneten Hefestammes (AH109) erlauben, lassen sich unterschiedliche Protein-Protein Interaktionen identifizieren. Das *bait*-Plasmid, hier pGBKT7, enthält außer der DNA-Bindedomäne, ein *gene of interest*, hier  $\Delta$ NHR bzw.  $\Delta$ rgp, und als Selektionsmarker das Enzym für die Tryptophansynthese. Das *prey*-Plasmid, hier pACT2, enthält neben der Aktivierungsdomäne, ebenfalls ein *gene of interest*, hier cDNA-Sequenzen von humanen Leukozyten und als Selektionsmarker ein Enzym für die Leucinsynthese. Die

Transfektionseffizienz beider Vektoren in die Hefe kann so durch die Kultivierung in einem Tryptophan-Leucin-Mangelmedium überprüft werden.

Die Reporterogenaktivität kann ebenfalls durch die Wachstumskontrolle auf Platten, denen Histidin und Adenin als essentielle Aminosäuren fehlen. Zum anderen kann die  $\alpha$ -Galaktosidaseaktivität im Hefestamm AH109 überprüft werden. Hierbei führt die Sekretion des Enzyms zu einer Hydrolyse des chromogenen Substrates X- $\alpha$ -Gal, welches durch eine Blaufärbung der Hefekolonien erkennbar ist (Aho *et al.*, 1997).

In Abbildung 4.1 ist das allgemeine Prinzip einer *yeast two-hybrid* Analyse zu sehen.

### 4.3.1 Herstellung kompetenter Hefen

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Hefestamm AH109 verwendet. Um Protein-Protein Interaktionen in den kultivierten Hefen untersuchen zu können, ist das Einbringen von Fremd-DNA (Plasmid-DNA) Voraussetzung. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz werden die Hefen mit Hilfe von Chemikalien kompetent gemacht. In dieser Arbeit wird dabei die Hefezellwand mittels Lithiumacetat permabilisiert (Gietz *et al.*, 1997).

Bei der Herstellung der kompetenten Hefen werden zunächst 10 ml YPD-Medium, komplettiert mit 2 % Glucose, mit 1/100 des Hefestammes AH109 inokuliert und über Nacht bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Am folgenden Tag werden pro zehn benötigter kompetenter Hefeansätze 50 ml YPD-Medium, komplettiert mit 2 % Glukose, mit der Übernachtskultur angeimpft, so dass die OD<sub>600</sub> einen Wert von 0,1-0,2 betrug. Die Hefekultur wird anschließend bei 30°C und 250 rpm inkubiert bis sich die OD<sub>600</sub> mindestens zweimal verdoppelt hat. Daraufhin wird die Suspension für 5 min bei 1500x g und RT abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 10 ml Aqua bidest gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (5'/1500x g/RT) wird das Pellet in 3 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und für 15 min bei 30°C im Schüttler inkubiert, um diese für die Aufnahme der DNA vorzubereiten. Anschließend wird zu dem abzentrifugierten Pellet (5'/1500x g/RT) folgender Mix pro zehn Ansätze hinzu pipettiert und vorsichtig gemischt.

#### Mix für 10 Ansätze

1. 740 $\mu$ l	Aqua bidest.
2. 360 $\mu$ l	1 M LiAc
3. 2,4 ml	50 % PEG

### 4.3.2 Kotransformation von Hefen

Bei der Kotransformation werden zunächst 5 µl des *prey*-Plasmid und 5 µl des *bait*-Plasmid in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend werden 345 µl des Hefe-Mix hinzu gegeben und der Ansatz, zur Unterstützung der DNA-Aufnahme in die Hefezellen, folgend für jeweils 30 min bei 30°C und bei 42°C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wird die Hefesuspension für 30 sek in einer Picofuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 200 µl Aqua bidest. aufgenommen und je 100 µl auf einer SD-TL und SD-HALT Mangelmediumplatte ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgt anschließend für 3-5 Tage bei 30°C in einem Brutschrank.

### 4.3.3 X-α-Galaktosidase-Test

Die transformierten Hefen besitzen das Reporter-gen *mel1*, welches für die α-Galaktosidase kodiert und so eine indirekte Detektion einer Protein-Protein Interaktion ermöglicht. Durch die Hydrolyse von X-α-Gal durch die α-Galaktosidase, verfärben sich positive Hefekolonien blau.

Um die α-Galaktosidaseaktivität zu testen wird eine X-α-Gal Lösung hergestellt, hierbei werden 4 mg X-α-Gal in 1 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst. Anschließend werden 100 µl der Lösung auf 10 cm Agarplatten aufgebracht und kurz angetrocknet. Danach werden die angewachsenen Hefeklone der SD-HALT Platten auf diese Platten übertragen und die Blaufärbung in einem Zeitraum von 0,5-6 Stunden verfolgt. Die Intensität und das Zeitintervall der Blaufärbung erlauben subjektive Aussagen über die Stärke der Interaktion.

Zur Charakterisierung potentieller Interaktionspartner wird die eingesetzte *prey*-DNA anschließend mit dem Primer fish for sequenziert (siehe 4.2.12).

## 4.4 Analyse exprimierter Proteine

### 4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Dieses Verfahren ermöglicht die Trennung von Proteinen in einem elektrischen Feld und in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecylsulfat*, SDS) in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Laemmli, 1970). Als Träger dient Polyacrylamid, welches durch Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid entsteht. SDS überdeckt die Eigenladungen von Proteinen, sodass die Proteine eine konstante Eigenladung aufweisen und aufgrund ihrer Masse getrennt werden können. Durch eine

diskontinuierliche Elektrophorese wird die Auflösung der Proteinbanden verbessert. Hierbei kommen zwei verschiedene Gele zum Einsatz. Das Trenngel dient zur Auftrennung und wird von einem großporigem Sammelgel überschichtet. Unterschiede in pH-Wert und Konzentration der Gele führen dazu, dass die Proteine im Sammelgel in engen Banden konzentriert werden, bevor die Auftrennung erfolgt. Voraussetzung ist das Vorhandensein einer schwachen Säure, wie Glycin, im Laufpuffer.

Im Rahmen dieser Arbeit werden, je nach Proteingröße, 10 %-ige bzw. 12 %-ige Trenngele und 5 %-ige Sammelgele verwendet (siehe Tab.4.1). Zur Auspolymerisierung der Gele werden APS (Ammoniumperoxiddisulfat) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) als Reaktionsbeschleuniger eingesetzt. Zuerst wird das Sammelgel gegossen und zur Auspolymerisierung mit Isopropanol überschichtet. Anschließend das Isopropanol abgenommen und das Sammelgel gegossen. Die Proben werden mit Probenpuffer versetzt, anschließend 10 min bei 95°C abgekocht und 1 min abzentrifugiert. Der Probenpuffer enthält neben  $\beta$ -Mercaptoethanol, zur Zerstörung bestehender Disulfidbrücken, ebenso Glycerin und Bromphenolblau, welche der Beschwerung und dem Sichtbarmachen der Probe dienen. Die Auftrennung erfolgt in einer vertikalen Elektrophoresekammer bei einer konstanten Spannung von 150 V.

**Tabelle 4.1 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für ca. drei 1,5 mm dicke Gele.**

	Trenngel		Sammelgel
	10 %	12 %	5 %
H <sub>2</sub> O	3,75 ml	2,25 ml	7 ml
Rotiphorese® Gel 30	7,5 ml	9 ml	1,67 ml
1 M Tris/HCl	11,25 ml (pH 8,8)	11,25 ml (pH 8,8)	1,25 ml (pH 6,8)
20 % SDS	113 $\mu$ l	113 $\mu$ l	50 $\mu$ l
10 % APS	158 $\mu$ l	158 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	13 $\mu$ l	13 $\mu$ l	10 $\mu$ l

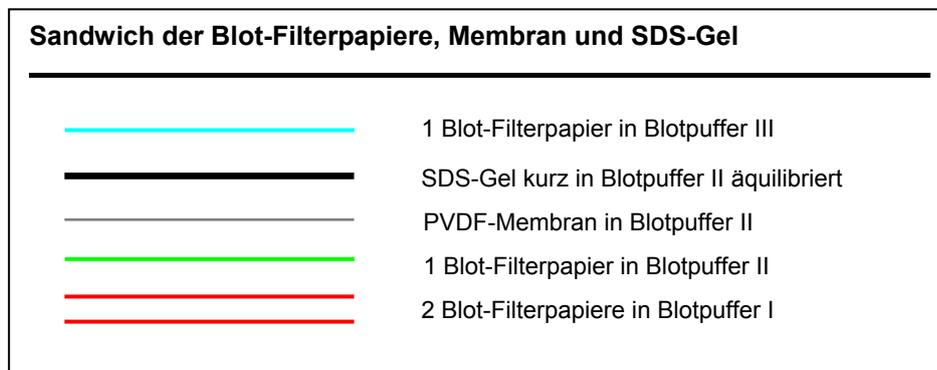
#### 4.4.2 Coomassie-Färbung

Um Proteinbanden im Gel sichtbar zu machen, werden diese mit Coomassie Brilliant Blau R250 angefärbt. Hierbei werden die Gele nach der Elektrophorese für 5-15 min in der Coomassie-Färbelösung angefärbt, wobei diese irreversibel an die Proteine bindet. Um die Färbung sichtbar zu machen, wird die Hintergrundfärbung zuerst für etwa 1 h in Entfärber I und dann für ca. ½ h in Entfärber II gegeben.

### 4.4.3 Western Blot

Das Western Blotting ist eine Methode in der Proteine aus Gelen elektrophoretisch auf eine Trägermembran transferiert werden. Eine Detektion erfolgt mittels Antikörper oder Seren.

In dieser Arbeit wird eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran eingesetzt und der Western Blot als *semi-dry* Methode durchgeführt (Towbin *et al.*, 1979, Kyshe und Anderson, 1984, Gültekin und Heermann, 1988). Hierbei wird das SDS-Polyacrylamidgel auf die Membran zwischen mehreren Blot-Filterpapieren gelegt, die jeweils auf die Größe des Gels zugeschnitten und in unterschiedlichen Puffern äquilibriert worden sind. Die PVDF-Membran wird zur Aktivierung vorher für ca. 30 sek in Methanol geschwenkt.



Dieser Stapel wird zwischen zwei mit Aqua bidest. befeuchteten Elektroden einer *semi-dry* Blotkammer (BioRad) gelegt und bei einer konstanten Stromstärke von  $1 \text{ mA/cm}^2$  für 1 h werden die Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran transferiert.

Im nächsten Schritt wird die Membran für  $\frac{1}{2}$  h bei RT in 5 % Milchpulver, gelöst in WB-Waschpuffer (siehe 3.2), inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wird die Membran sechs Mal für je 5 min in WB-Waschpuffer geschwenkt.

Zur Detektion der Proteine erfolgte die Inkubation mit spezifischen Antikörpern. Zuerst wird der Primäantikörper (siehe 3.5.1) entsprechend verdünnt in der Milchpulverlösung für 1 h bei RT inkubiert und folgend sechs Mal für jeweils 5 min mit dem WB-Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation für  $\frac{1}{2}$  h mit dem Peroxidase-markierten sekundären Antikörper (siehe 3.5.2), welcher gegen ein Epitop des primären Antikörpers gerichtet ist. Anschließend wird wieder gründlich gewaschen. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgt eingeschweißt und unter ständiger Rotation.

Die ECL-Detektion erfolgt mit dem Amersham ECL™ *Western Blotting* Detection System von GE Healthcare.

### **Anfärbung mit Ponceaurot**

Ponceaurot färbt alle Proteine mit einer hohen Sensitivität an. Die Färbung ist reversibel und stört daher nicht bei der Immunfärbung. Hierbei wird die Membran für 1-2 min bei RT in eine Ponceaulösung (0,2 % in 3 % TCA) geschwenkt. Anschließend wird die überschüssige Farbe mit Wasser abgewaschen.

### **„Strippen“**

Um den Blot mehrmals mit verschiedenen Antikörpern färben zu können wird der Blot nach der Filmentwicklung für 30 min bei 50°C mit 100 ml *stripping*-Puffer (siehe 3.2) rotierend gewaschen. Anschließend wird er zweimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und kann nun erneut mit Milchpulverlösung abgesättigt werden und mit weiteren Antikörpern getestet werden.

## **4.5 Proteinexpression in eukaryotischen Zellen**

Ein Vorteil der Expression in eukaryotischen Zellen ist, dass die meisten rekombinanten Proteine von Säugetieren korrekt gefaltet und posttranslational modifiziert werden. Die Detektion kann mittels direkt gegen diese Proteine gerichtete Antikörper erfolgen oder gegen ein *tag*, das rekombinant mit dem Protein gekoppelt ist. Hierbei erfolgt zunächst eine transiente Transfektion, wobei Fremd-DNA in die Zellen eingebracht wird. Im Gegensatz zu einer stabilen Transfektion wird diese nicht in das Genom eingebaut, sondern verbleibt im Zytoplasma und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens im Laufe der Zellteilungen wieder verloren (Scangos und Ruddle, 1981). Während dieser Zeit unterliegt diese der Regulation der Zelle und das Gen unterliegt einem starken viralen Promotor, sodass es zu einer erhöhten Expression des Proteins kommt.

### **4.5.1 Transiente Transfektion**

Es gibt unterschiedliche chemische und physikalische Methoden der Transfektion, beispielsweise die Calcium-Phosphat-Präzipitation, Lipofektion oder Elektroporation.

Im Rahmen dieser Arbeit sind 293 T-Zellen und HeLa-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation transient transfiziert worden. Des Weiteren wird das Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 der Firma Invitrogen zur Transfektion eingesetzt. Beide Methoden werden folgend erläutert.

### Calcium-Phosphat-Präzipitation

Die Calcium-Phosphat-Präzipitation wird nach Graham und Eb durchgeführt (Graham und van der Eb, 1973). Hierbei bindet die DNA an ausfallendes Calciumphosphat, welches auf die Zellen gegeben wird. Die Aufnahme der DNA in die Zelle erfolgt vermutlich über Endozytose. Die Aufnahme der DNA kann durch einen Glyzerinschock unterstützt werden, da die Zugabe von Glycerin ein aufquellen der Zellwand bewirkt.

Vor der Transfektion wird zunächst eine konfluent bewachsene Kulturflasche passagiert. Die Zellen werden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Kulturschale ( $\varnothing$  10 cm) ausgesät und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. 24h nach dem Aussähen der Zellen wird die Transfektion durchgeführt. Hierbei wird folgender Ansatz zusammen pipettiert.

<b>Ansatz für eine Kulturschale (<math>\varnothing</math> 10 cm)</b>	
250 $\mu\text{l}$	2x HBS-Puffer
20 $\mu\text{g}$	DNA
220 $\mu\text{l}$ - $\mu\text{l}$ DNA-Menge	0,1x TBS-Puffer

Anschließend erfolgt innerhalb von 3 min und unter ständigem Mischen die tropfenweise Zugabe von 31  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  zu der Lösung. Durch das kontinuierliche Mischen entsteht ein sehr feines Präzipitat aus DNA und Calciumphosphat-Kristallen. Dieser Ansatz wird für 30 min bei RT inkubiert und danach mit 7 ml Medium versetzt. Die Zellen werden mit PBS gewaschen, bevor der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben wird. Nach einer Inkubationszeit von 7 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  erfolgte ein Glyzerinschock. Hierbei wird vorsichtig das Medium entfernt und 4 ml einer 15 % Glycerinlösung für 30 sek auf die Zellen gegeben. Anschließend werden die Zellen zweimal gründlich mit PBS gewaschen und mit neuem Medium versorgt.

### Lipofectamine®

Bei dieser Methode wird als Transfektionsreagenz Lipofectamine® 2000 der Firma Invitrogen genutzt. Hierbei bildet die negativ geladene DNA an der Oberfläche von kationischen Lipidvesikeln Komplexe, die anschließend von der Zelle aufgenommen werden können. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers in 10 cm ( $\varnothing$ ) Kulturschalen.

### 4.5.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Analyse von überexprimierten oder endogenen Proteinen müssen diese aus den Zellen isoliert werden. Es werden Gesamtzellextrakte von HL-60 Zellen und humanen PBMCs als auch von transient transfizierten 293 T-Zellen und HeLa-Zellen für folgende Bindungsanalysen hergestellt. Um den Stoffwechsel herabzusetzen und einen möglichen Abbau der Proteine zu verhindern, erfolgte die Herstellung der Gesamtzellextrakte auf Eis. Hierbei werden Detergenzienhaltige Puffer eingesetzt, um die Proteine aus der Membran herauszulösen.

Zuerst wird das Medium der transfizierten Zellen (nach 24 h/30 h) bzw. der Zellen einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche, entfernt und anschließend die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin werden die Zellen mit 300 µl IPA- bzw. RIPA-Puffer (siehe 3.2) benetzt, mit einem *cell scraper* von der Oberfläche der Kulturflasche abgeschabt und in eine 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Suspensionszellen werden hierbei für 4 min bei 1000x g und RT abzentrifugiert und ebenfalls zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden sie im entsprechenden Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wird folgend für 1 h bei 16000x g und 4°C zentrifugiert, um so den Überstand mit den gelösten Proteinen von den Zellrückständen zu trennen. Der Überstand konnte anschließend bei -80°C zwischengelagert werden.

### 4.5.3 Zytosol-Membran-Fraktionierung

Die Zytosol-Membran-Fraktionierung dient der groben Lokalisation der Proteine in der Zelle. Hierbei werden durch verschiedene Zentrifugationsschritte Membranproteine von zytosolischen Proteinen getrennt. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein modifiziertes Protokoll von Linstedt angewandt (Linstedt *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit werden bereits vorher abzentrifugierte THP-Zellpellets zur Zytosol-Membran-Fraktionierung genutzt. Hierbei werden die drei Pellets einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche (150 cm<sup>2</sup>) in jeweils 1,5 ml CMF-Puffer aufgenommen. Anschließend wird die vereinigte Zellsuspension in flüssigem Stickstoff Schockgefroren, aufgetaut und zehnmal durch eine 27G-Nadel gezogen, um die Zellen aufzuschließen. Das Lysat wird danach für 2 min bei 1000x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, auch als *post nuclear supernatant* (PNS) bezeichnet, wird mit 50 %-iger Sucrose unterschichtet und für 15 min bei 14000x g und 4°C zentrifugiert. Hierbei werden große Membranen bzw. Membranteile vom Überstand getrennt.

Das Pellet wird mit 2 ml CMF-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min / 14000x g / 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 750 µl 2x HKT-Puffer und 750 µl Aqua bidest. resuspendiert. Mit Hilfe dieses Puffers können detergenzlösliche Proteine aus der Membran herausgelöst werden. Nach dem abschließenden Zentrifugationsschritt für 1 h bei 16000x g und 4°C befinden sich die Proteine der großen Membranen im Überstand (P14), der bei -80°C für weitere Analysen eingefroren wird.

Der Überstand wird zusammen mit der Sucrose in ein Polykarbonröhrchen überführt und für 1 h bei 100000x g und 4°C abzentrifugiert. Im Überstand, der als *supernatant* 100 (S100) bezeichnet wird, befinden sich alle zytosolischen Proteine. Das entstandene Pellet, welches kleine Membranen enthält, wird mit 4 ml CMF-Puffer gewaschen und für 15 min bei 100000x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 750 µl 2x HKT-Puffer und 750 µl Aqua bidest. aufgenommen und anschließend erneut für 1 h bei 16000x g und 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird als P100 bezeichnet.

Somit hat man drei verschiedene Fraktionen erhalten, welche die Proteine der großen Membranen (P14), der kleinen Membranen (P100) und die löslichen Proteine (S100) enthalten. Die Verteilung der Proteine, zwischen den kleinen und großen Membranen und dem Zytosol, kann mittels Western Blot (siehe 4.4.3) mit den entsprechenden Antikörpern analysiert werden.

### 4.6 Proteinbindungsanalyse – *pull down*

Eine weitere Methode zur Verifizierung von Protein-Protein Interaktionen ist die *pull down* Analyse. Im Gegensatz zur *yeast two-hybrid* Analyse handelt es sich um eine *in vitro* Bindungsanalyse. Hierbei werden Proteine an so genannte *beads* gekoppelt und mit einem Zellextrakt inkubiert, in dem der mögliche Interaktionspartner als überexprimiertes oder endogenes Protein enthalten ist. Eine erfolgreiche Bindung des Interaktionspartners kann in einer SDS-Gelelektrophorese und anschließender Western Blot Analyse überprüft werden.

#### 4.6.1 GST-*pull down*

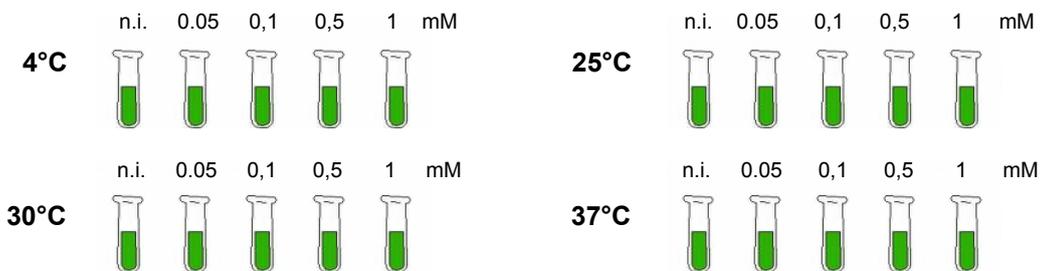
Bei einem GST-*pull down* wird einer der Interaktionspartner als bakteriell GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsprotein exprimiert (Guan und Dixon, 1991). Das Fusionsprotein besitzt eine große Affinität zu Glutathion und bindet daher an spezielle Glutathion Sepharose *beads*.

### GST-Fusionsproteine – Expression und Ermittlung der Induktionsbedingungen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen in Bakterien werden pGex-Vektoren verwendet. Diese enthalten das Glutathione-S-Transferase Gen aus *Schistosoma japonicum* vor der MCS, in die das Gen des gewünschten Proteins eingebracht werden kann. Die Expression ist unter die Kontrolle eines *tac* Promotors gestellt und kann durch Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), ein Laktose Analogon, induziert werden. In Abwesenheit von IPTG wird die Expression auf einem Basallevel gehalten, da der Vektor ebenfalls für ein Repressorprotein kodiert.

Jedes der Plasmidkonstrukte wird anschließend in den *E. coli* Bakterienstamm BL21 transformiert (siehe 4.9.2). Nach Überprüfung der Klonierung wird eine Glycerinkultur angelegt.

Zur Bestimmung der Induktionsbedingungen werden zunächst 50 ml 2YT-Amp Medium mit einer jeweiligen ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C und 250 rpm bis zu einem OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 inkubiert. Anschließend wird je 2 ml der Bakterienkultur auf Reagenzgläser verteilt (siehe Abb. 4.2). Diese werden mit vier unterschiedlichen Mengen IPTG induziert und bei vier verschiedenen Temperaturen für 3 h und 250 rpm inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wird jeweils ein Kulturröhrchen ohne IPTG, welches als nicht induziert (n.i.) bezeichnet wurde, mitgeführt.



**Abbildung 4.2 Ansatz für die Bestimmung der Induktionsbedingungen.**

Anschließend wird die Bakteriensuspension in 2 ml Reaktionsgefäße übertragen, für 3 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird anschließend in 50  $\mu$ l 1x Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 95°C abgekocht. Zur Analyse wird 1/5 der Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen und eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Im Vergleich zur Negativ-Kontrolle sollte in der Spur der induzierten Probe ein deutliches Signal auf der Höhe des errechneten Molekulargewichtes des GST-Fusionsproteins zu sehen sein, sodass sich die optimalen Induktionsbedingungen ermitteln lassen.

Nach Bestimmung der Induktionsbedingungen, wird das jeweilige Konstrukt in einem Maßstab von 100 ml exprimiert, abzentrifugiert (5 min / 14000x g / 4°C) und anschließend die Pellets bei -20°C zur Weiterverarbeitung gelagert.

### **Herstellung des Bakterienlysats**

Das tiefgefrorene Bakterienpellet einer 100 ml Bakterienkultur wird auf Eis aufgetaut und in 5 ml PBS/ Complete™ zu einer homogene Lösung resuspendiert. Zum besseren Zellaufschluss wird die Suspension in flüssigen Stickstoff schockgefrostet und wieder aufgetaut. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mittels Ultraschall, viermal für 10 sek. Im Anschluss wird der Suspension 1 % Triton X-100 zugesetzt, gut gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird für 30 min bei 16000x g und 4°C pelletiert. Anschließend wird der Überstand mit den extrahierten Proteinen à 1 ml aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### **Kopplung der GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose *beads* 4B**

In diesem Schritt wird das jeweilige GST-Fusionsprotein bzw. für die Negativ-Kontrolle das GST-Protein an Glutathion Sepharose™ 4B der Firma GE Healthcare Biosciences gebunden. Zuerst wird nach Angaben des Herstellers eine 25 %-ige *slurry* der Glutathion Sepharose *beads* angefertigt.

Für die Kopplung der GST-Fusionsproteie bzw. der Negativ-Kontrolle werden jeweils 40 µl der Glutathione Sepharose *beads* (25 % *slurry*) mit unterschiedlichen Volumina des isolierten Bakterienlysats und PBS / 1 % Triton X100 auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt. Anschließend werden die Ansätze für 1,5 h bei 4°C in einem Rotator inkubiert. Folgend werden die *beads* für 1 min bei 1000x g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die *beads* zweimal mit eiskaltem PBS / 0,1 % Triton X100 und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Zwischendurch werden die *beads* für 1 min bei 1000x g und 4°C pelletiert und der Überstand mit der Pipette vorsichtig abgenommen. Danach erfolgt die Inkubation mit Zellextrakten, die mögliche Interaktionspartner enthalten.

Um in einem *pull down* äquivalente Mengen an Fusionsprotein einsetzen zu können, müssen zuerst die Konzentration der Bakterienlysate abgeschätzt werden. Hierbei werden 25 µl, 50 µl und 100 µl je Bakterienlysate an die *beads* gekoppelt. Nach dem Waschschrift werden die *beads* in 50 µl 2x Probenpuffer aufgenommen, für 10 min bei 95°C abgekocht und 1/5 der Probe auf SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zum Vergleich werden 400 µg, 800 µg und 1600 µg BSA mitaufgetrennt. Nach anschließender Coomassie-Färbung konnte die Konzentration abgeschätzt werden.

### Inkubation mit aufgereinigtem Proteinen

Für die Interaktionsanalyse werden 10 µg des bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteins für 1,5 h bei 4°C an 10 µl *beads* (40 µl der 25 % *slurry*) gekoppelt und anschließend gründlich gewaschen. Anschließend werden die *beads* mit dem gekoppeltem Fusionsprotein mit aufgereinigtem rekombinantem Protein inkubiert, wobei eine Konzentration im 10-fachen Überschuß zur Positiv-Kontrolle gewählt wird. Hierbei wird der Ansatz vorher mit PBS bzw. TIF-Puffer auf 500 µl aufgefüllt und folgend für 4 h bzw. 1 h bei 4°C über Kopf rotierend inkubiert. Um überschüssige Proteine aus der Lösung zu entfernen, werden die *beads* viermal mit PBS bzw. TIF-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wird die Lösung 1 min bei 1000x g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen und das Pellet in 50 µl 1x Probenpuffer aufgenommen. Die Denaturierung erfolgt für 10 min bei 95°C und anschließend wird das Gemisch für 1 min bei 12000x g abzentrifugiert, sodass sich die *beads* am Boden absetzen. Der Überstand wird auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt. Die Detektion erfolgt mit Hilfe der Western Blot Analyse und spezifischen Antikörpern, die gegen den möglichen Interaktionspartner gerichtet sind.

#### 4.6.2 Pull down mit Magnetobeads

In dieser Arbeit werden Dynabeads® M-280 Streptavidin der Firma Dymal verwendet. Diese *beads* sind magnetisch, wodurch eine Separation von Puffern/Lösungen vereinfacht wird. Des Weiteren ist Streptavidin kovalent an die Oberfläche der *beads* gekoppelt, sodass eine Kopplung von biotinylierten Liganden möglich ist.

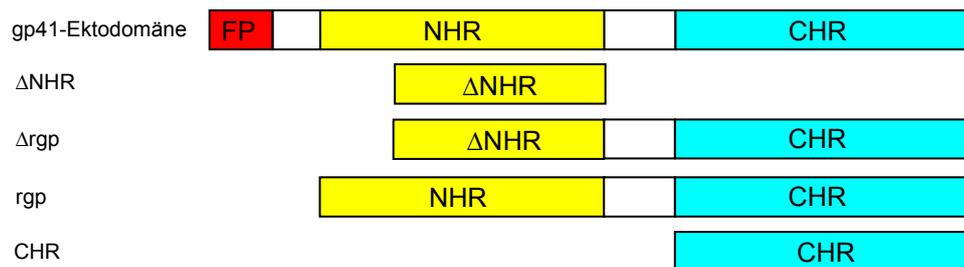
Zuerst werden 300 µl der Dynabeads-Stammlösung viermal gründlich mit PBS gewaschen. und folgend in 100 µl PBS / 1 % Triton X100 aufgenommen. Zur Kopplung werden 10 µg biotinyliertes Peptid mit 20 µl der *beads*-Lösung, aufgefüllt mit PBS / 1 % Triton X100 auf 500 µl, für 30 min bei RT über Kopf rotierend inkubiert. Anschließend werden die *beads* einmal mit PBS / 1 % Triton X100, zweimal mit PBS / 0,1 % Triton X100 und einmal mit PBS gewaschen. Die Separation der *beads* und den Puffern erfolgte mittels eines magnetischen Reaktionsgefäßständers, der die diese am Rand fixierte. Im nächsten Schritt werden die *beads* mit aufgereinigtem Protein inkubiert (siehe 4.6.1) und danach in 50 µl 1x Probenpuffer aufgenommen. Nach dem Abkochen (10 min / 95°C) der Proben, werden diese auf ein SDS-Gel aufgetragen, aufgetrennt und anschließend erfolgte eine Detektion mittel spezifischer Antikörper gegen den möglichen Interaktionspartner in einer Western Blot Analyse.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Ermittlung möglicher Interaktionspartner der N-terminalen Domäne von gp41 mittels *yeast two-hybrid* Analyse

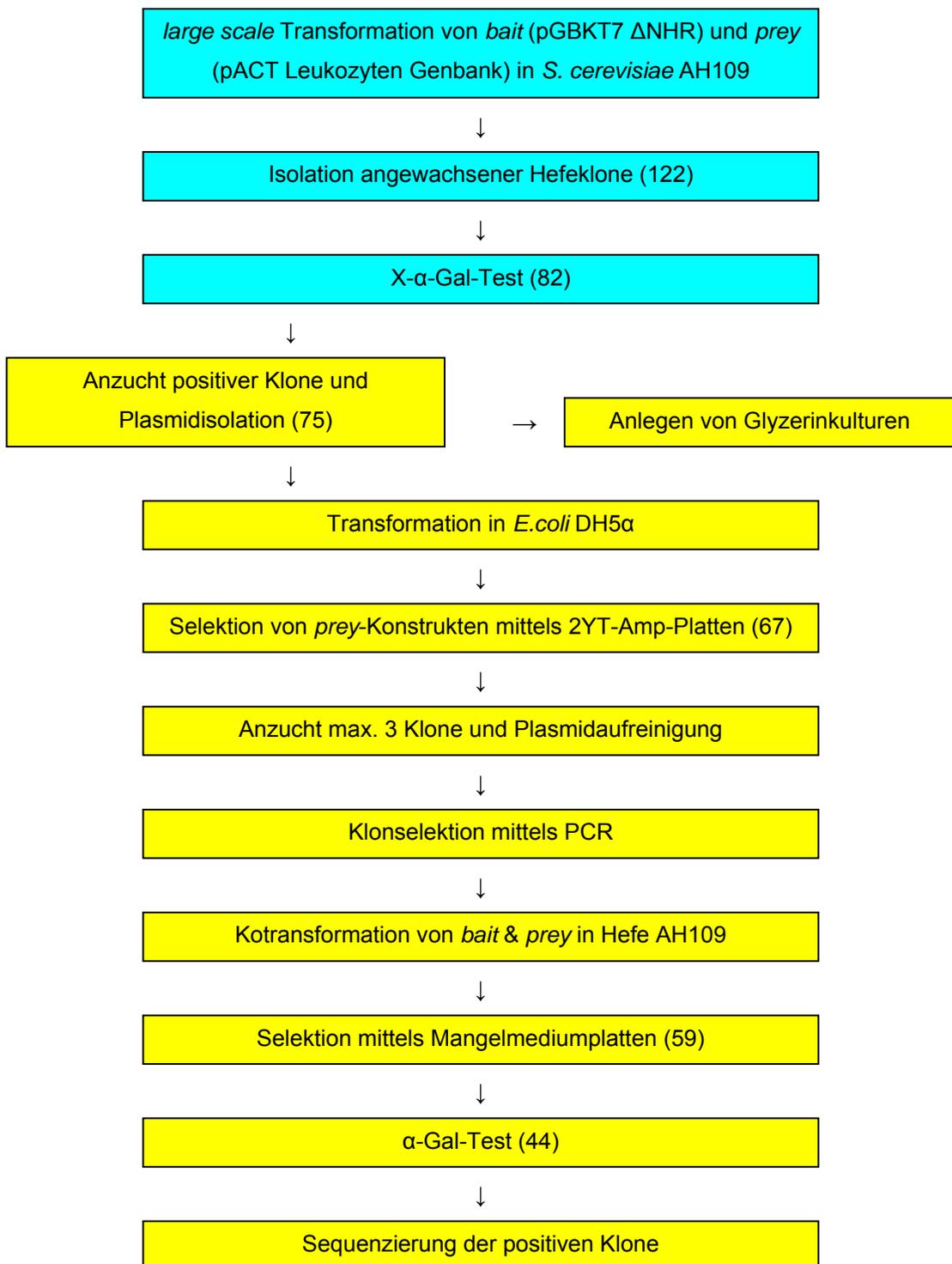
Nachdem in Vorarbeiten der AG Denner mit Hilfe einer *yeast two-hybrid* Analyse unter Verwendung einer Leukozyten Genbank erste Bindungspartner für die N-terminale Domäne von gp41 von HIV-1 identifiziert wurden (Eschricht *et al.*, in Vorbereitung), sollten hier die Interaktionen genauer untersucht werden.

Im Rahmen der Vorarbeiten wurden die Konstrukte  $\Delta$ NHR und  $\Delta$ rgp (Abb. 5.1) mittels PCR aus dem Vektor pCaln rgp41 generiert und in den *bait*-Vektor pGBKT7 inkloniert. Diese Konstrukte wurden ausgewählt, um den möglichen Interaktionsraum mit zellulären Proteinen einzugrenzen. Die eingesetzten *bait*-Vektoren wirkten nicht zytotoxisch auf die Hefezelllinie AH109, ihre Autoaktivität war negativ. Im Anschluss konnte durch weitere Versuche die Proteinexpression nachgewiesen werden. Weiterhin war ein *screening* in Form einer *large scale* Transformation durchgeführt worden, wobei der *bait*- $\Delta$ NHR-Vektor und die *prey*-pACT-Leukozytenbank in die Hefezelllinie AH109 kotransformiert und anschließend auf SD-HALT-Platten ausplattiert wurden. Im Folgenden waren 122 Klone auf Masterplates vereinzelt und einem X- $\alpha$ -Gal Test unterzogen worden, wobei sich 82 Klone blau verfärbten.



**Abbildung 5.1** Schematische Darstellung der eingesetzten bzw. zu generierenden *bait*-Vektoren.

FP: Fusionspeptid, NHR: N-terminale Heptad Region, CHR: C-terminale Heptad Region und die  $\Delta$ NHR-Region ist ohne E1.



**Abbildung 5.2 Schematisierter Ablauf des screens mittels yeast two-hybrid Analyse.**

Die Vorarbeiten der AG Denner sind blau und Experimente im Rahmen dieser Diplomarbeit sind gelb eingefärbt. Zahlen in Klammern geben die Anzahl der momentan vorhandenen Klone an.

### 5.1.1 Klonierung von *rgp* und *CHR* in *pGBKT7* zur Weiterverwendung in *yeast two-hybrid* Analysen

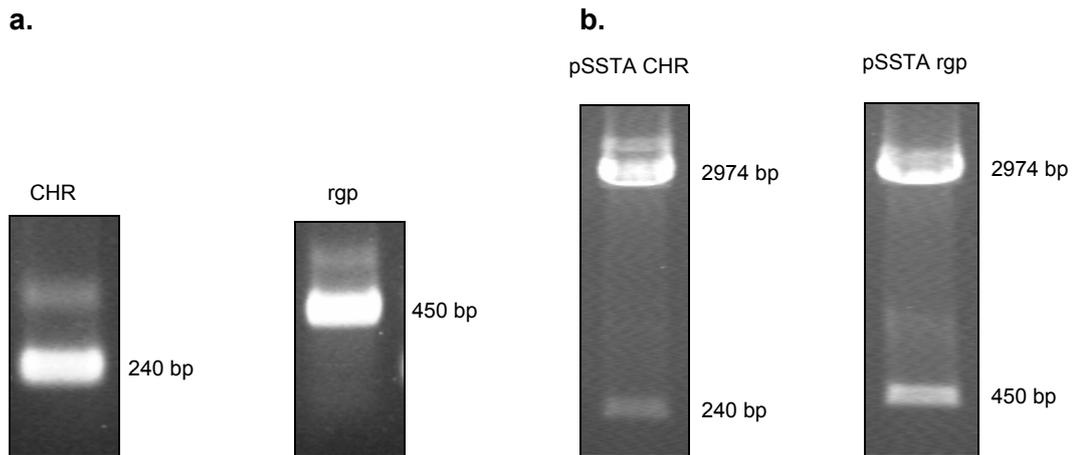
Nach den Vorarbeiten sollen weitere *bait*-Vektoren generiert werden. Hierzu wurde die Klonierung über zwei verschiedene Wege versucht. Zum einen sollten die Konstrukte *rgp* und *CHR* (Abb. 5.1) direkt in den Vektor *pGBKT7* inkloniert werden. Zum anderen sollten die Konstrukte indirekt mittels des Zwischenvektors *pSSTA* in *pGBKT7* gebracht werden, um Klone überprüfen und Interaktionsbereiche in späteren Versuchen eingrenzen zu können.

Zu Beginn wurden die Konstrukte *rgp* mit den Primern *gp 41 mut* und *Bam rgp rev* und *CHR* mit den Primern *CHR-EcoRI for* und *CHR Sall rev* mittels dem Programm *PCR 70* (siehe 4.2.3 und Tab. 5.2) aus dem Vektor *pCALn rgp41* amplifiziert. Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (siehe 4.2.5) konnten die Fragmente aufgetrennt und überprüft werden (Abb. 5.3a). Die Gelblöcke wurden anschließend mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* aufgereinigt und die DNA-Menge mit dem *NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer* bestimmt.

Bei der direkten Klonierung wurde *pGBKT7* im Falle von *rgp* mit *Eco RI* und *Bam HI* und bei *CHR* mittels *Eco RI* und *Sal I* restringiert (siehe 4.2.4). Analog wurden auch beide Konstrukte mit den jeweiligen Enzymen geschnitten. Im weiteren Schritt wurde eine Ligation (siehe 4.2.7) über Nacht angesetzt. Am nächsten Tag wurden beide Ligationsansätze in *E. coli* *DH5α* transformiert (siehe 4.2.9) und aufgrund der Kanamycinresistenz von *pGBKT7* auf *2YT-Kan* Platten ausplattiert. Auch nach mehrfacher Wiederholung des Klonierungsversuches konnte kein Klon auf den Selektionsplatten verzeichnet werden.

Bei der indirekten Klonierung wurde *pSSTA* mittels *Xcm I* restringiert und so *TA*-Überhänge im Vektor geschaffen. Die zuvor aufgereinigten PCR-Produkte konnten ohne vorherigen Verdau mit *pSSTA* ligiert werden, da die verwendete *Taq*-Polymerase *TA*-Überhänge an den Enden der PCR-Produkte generiert. Anschließend wurden sie in *DH5α* transformiert und auf *2YT-Amp* Platten ausplattiert. Folgend angewachsene Klone wurden in einer Suspensionskultur kultiviert und mittels *Miniprep Express Matrix™ Bio 101* aufgereinigt (siehe 4.2.1). Im nächsten Schritt konnten die Klone durch eine Restriktion mittels der jeweils zuvor genutzten Restriktionsenzyme (Abb. 5.3b und Tab. 5.2) und durch eine Sequenzierung (siehe 4.2.11) durch den *T7-Prom Primer* mittels des *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* auf eine korrekte Insertion von *rgp* bzw. *CHR* kontrolliert werden. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mittels der Computersoftware *Lasergene-SeqMan* (*DNASTAR Inc., USA*) und wurde mit der bekannten Sequenz der Konstrukte verglichen (Daten nicht gezeigt). Nach Aufreinigung der Fragmente aus der Kontrollrestriktion von *pSSTA CHR* und *pSSTA rgp* wurde wie bei der direkten Klonierung weiter verfahren. *CHR*

und *rgp* wurden mit dem zuvor restringierten pGBKT7 ligiert und folgend in DH5 $\alpha$  transformiert. Die Selektion fand auf 2YT-Kan-Platten statt. Danach angewachsene Klone wurden mit Hilfe der Primer pGBKT7 Kolonie for und pGBKT7 Kolonie rev durch eine Kolonie-PCR (siehe 4.2.3) kontrolliert. Jedoch war nach mehrmaligem Versuch entweder kein erfolgreiches Klonwachstum zu verzeichnen oder die Kolonie-PCR ergab keine positiven Klone. Durch eine weitere Klonierung über die Restriktionsstellen *Eco* RI / *Xho* I konnte *rgp* erfolgreich in pGBKT7 kloniert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

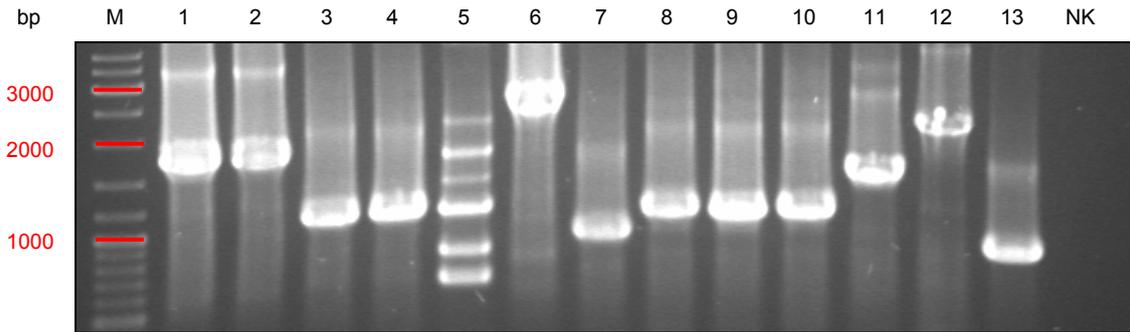


**Abbildung 5.3 Klonierung von *rgp* und CHR ind den Vektor pGBKT7.**

a. PCR-Produkte von CHR mit den Primern CHR-*Eco*RI for / CHR *Sal*l rev und von *rgp* mit den Primern *gp* 41 mut / Bam *rgp* rev.  
 b. Kontrollrestriktion von pSSTA CHR und pSSTA *rgp* mittels *Eco* RI / *Sal* I bzw. *Eco* RI / Bam HI.

### 5.1.2 Aufarbeitung der *prey*-Plasmide

Für eine erneute *yeast two-hybrid* Analyse müssen die *prey*-Plasmide zuerst vereinzelt und aufgearbeitet werden. Zu Beginn wurden die 82 positiven (blau gefärbten) Klone des *yeast two-hybrid screenings* kultiviert (siehe 4.1.1) und Glyzerinkulturen zur Sicherung angelegt. Ferner wurde DNA aufgereinigt und zur Vervielfältigung bzw. Selektion in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert (siehe 4.2.9). Aufgrund einer Plasmid-Resistenz des *prey*-Vektors pACT2 gegen Ampicillin und des *bait*-Vektors pGBKT7 gegen Kanamycin fand eine Selektion der Klone auf *prey*-Plasmide durch Ausplattieren auf 2YT-Amp-Platten statt. Da Hefen auch mehrere Plasmide aufnehmen können, wurden aus den angewachsenen Klonen max. 3 zufällig ausgewählt und über Nacht kultiviert. Die aufgereinigte DNA wurde durch PCR mittels der spezifischen Primer *fish* for und *fish* rev, die jeweils vor und nach der MCS (*multiple cloning site*) spezifisch an den pACT2-Vektor binden, amplifiziert. Mit Hilfe der Gelelektrophorese (siehe 4.2.5) wurden die PCR-Produkte aufgetrennt (Abb. 5.4).



**Abbildung 5.4 Gelelektrophorese der PCR-Produkte der *prey*-Plasmide.**

**M:** O'GeneRuler™ DNA ladder Mix; **1-2:** Klon 26(1 & 2); **3-5:** Klon 32(1-3); **6:** Klon 46; **7:** Klon 51; **8-10:** Klon 71(1-3); **11:** Klon 74; **12:** Klon 75; **13:** Klon 77; **NK:** Negativ-Kontrolle.

Durch die Auftrennung konnte nun ermittelt werden, ob in die Hefezelle nur ein oder mehrere Konstrukte aufgenommen hat. Durch Vergleich der Banden verschiedener Klone einer Probe konnte entschieden werden, welche für die folgende *yeast two-hybrid* Analyse eingesetzt werden. Besaß die amplifizierte DNA verschiedener Klone einer Probe die gleiche Höhe in der Gelelektrophorese wurde eine der Proben weiter genutzt, wie in Spur 8-10 von Probe 71 ersichtlich. Hierbei wurde beispielsweise Probe 71(3) weiter genutzt. Lief dagegen eine Bande in einer anderen Höhe wurden beide Proben weiter für eine *yeast two-hybrid* Analyse genutzt (Daten nicht gezeigt). Konnte eine Probe nicht sauber amplifiziert werden, siehe Probe 32(3) in Spur 5, so wurde eine erneute PCR durchgeführt oder wenn wie hier möglich, anhand der weiteren Proben in Spur 3 und 4 entschieden, welche dieser für die folgende *yeast two-hybrid* Analyse weiter verwendet wird, in diesem Fall wurde Probe 32(1) ausgewählt.

### 5.1.3 Detektion putativer Interaktionspartner mittels *yeast two-hybrid* Analyse

Im weiteren Schritt sollte eine erneute *yeast two-hybrid* Analyse zur Bestätigung und Identifizierung der putativen Interaktionspartner durchgeführt werden. Dazu wurden die ausgewählten Klone mit den *bait*-Plasmiden in den Hefestamm AH109 kotransformiert (siehe 4.3.2). Dabei wurden drei verschiedene *bait*-Plasmide eingesetzt. Es wurde das pGBKT7  $\Delta$ NHR-Plasmid verwendet, mit dem zu Beginn durch die Arbeitsgruppe das *screening* durchgeführt wurde. Als Kontrolle diente der pGBKT7 Leervektor (pGBKT7 leer), des Weiteren wurde der Vektor mit integriertem  $\Delta$ rgp Konstrukt (pGBKT7  $\Delta$ rgp) mitgeführt.

Für eine erfolgreich durchgeführte Kotransformation war ein gutes Hefewachstum auf SD-TL Platten Voraussetzung. Dem SD-TL Medium fehlen die Aminosäuren Tryptophan und

Leucin. Da das *prey*-Plasmid pACT2 ein Enzym für die Leucinsynthese und das *bait*-Plasmid pGBKT7 ein Enzym für die Tryptophansynthese besitzt, konnte somit nachgewiesen werden, dass beide Plasmide von der Hefezelle aufgenommen wurden.

Eine mögliche Interaktion konnte durch das Anwachsen auf SD-HALT Platten nachgewiesen werden. Diesem Mangelmedium fehlt zusätzlich neben Tryptophan und Leucin auch Adenin und Histidin. Der Hefestamm AH109 besitzt Reportergene sowohl für die Histidinsynthese als auch für die Adeninsynthese. Durch räumliche Nähe bzw. Interaktion von möglichen Bindungspartnern kommt es durch die funktionelle Wiederherstellung des GAL4 Transkriptionsfaktors zur Expression der Reportergene, sodass Kolonien auf SD-HALT Mangelmediumplatten anwachsen können.

Im nächsten Schritt werden die angewachsenen Kolonien einem X- $\alpha$ -Gal-Test (siehe 4.3.3) unterzogen, da *S. cerevisiae* AH109  $\alpha$ -Galaktosidase exprimiert und das Zeitintervall erfasst indem sich die Klone auf den Selektionsplatten blau verfärbten. Übersicht über die aufgenommenen Daten ist Tabelle 5.1 zu entnehmen.

Von insgesamt 91 Klonen des *screenings* konnten 75 Klone kultiviert werden. Davon konnten nur 67 Klone erfolgreich in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert werden (Tab. 5.1). Nach der Kotransformation in *S. cerevisiae* AH109 wuchsen acht Klone nicht auf den Kontrollplatten SD-TL an. Sodass nur für 59 Klone eine erfolgreiche Kotransformation in die Hefe zu verzeichnen war. Hiervon wurden 44 Klone im  $\alpha$ -Galaktosidase-Test blau und wurden anschließend sequenziert (siehe 4.2.11). Die Auswertung der Basenabfolge erfolgte mittels der Computersoftware Lasergene-SeqMan (DNASTAR Inc., USA) und konnte mit Hilfe des National Center for Biotechnology Information (NCBI)<sup>2</sup> mit bekannten Sequenzen verglichen und so identifiziert werden.

Nach der Identifizierung der Klone wurde entschieden, welcher mögliche Interaktionspartner aus der *yeast two-hybrid* Analyse aufgrund der Lokalisation oder bereits bekannten Funktionen relevant wäre, um über weitere Experimente, wie *pull down* Analysen, Immunopräzipitation oder Biacore-Versuche, eine weitere Verifizierung der Interaktion zu schaffen. Hierbei wurde TREM-1 gewählt, da es sich als ein geeigneter Kandidat für eine mögliche Interaktion mit dem  $\Delta$ NHR-Bereich von gp41 herauskristallisierte. Des Weiteren wurde eine hochregulierte Expression von TREM-1 bereits in einem vergangenen Microarray der Arbeitsgruppe detektiert.

---

<sup>2</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

**Tabelle 5.1 Überprüfung der Interaktion der *prey*- und *bait*-Plasmide mittels *yeast two-hybrid* Analyse.**

Das Wachstum der Kolonien nach Kotransformation wurde wie folgt bewertet: - kein Wachstum, +/- geringes Wachstum und + gutes Wachstum. Die Einstufung der  $\alpha$ -Galaktosidaseaktivität erfolgte nach der Blaufärbung in einem bestimmten Zeitintervall, wobei 1-3h als signifikant und > 3h als schwach signifikant einzustufen waren. Klone die nicht aufgezählt sind, konnten nicht kultiviert, aufgereinigt bzw. amplifiziert werden. Zahlen in Klammern geben die Probennummer des Klons bei der *prey*-Selektion an, die anschließend in der *yeast two-hybrid* Analyse verwendet wurde. \* Nur ein Klon nach der Transformation. Gelb hervorgehoben sind Klone die entweder nur mit  $\Delta$ NHR oder  $\Delta$ rgp interagierten und Grau hervorgehoben sind Klone die sowohl mit  $\Delta$ NHR als auch  $\Delta$ rgp interagierten.

Klon	SD-TL pGBKT7		SD-HALT pGBKT7		$\alpha$ -Gal- Test	Sequenzierung
1(2)	leer	+	leer	-		Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced (STAT6) NM_003153.3 108-474 hier: 1949-2314 orf: 272..2815
	$\Delta$ NHR	+	$\Delta$ NHR	+	1h	
	$\Delta$ rgp	+	$\Delta$ rgp	+	1h	
3*	leer	-	leer	-		-
	$\Delta$ NHR	-	$\Delta$ NHR	-		
	$\Delta$ rgp	-	$\Delta$ rgp	-		
4*	leer	-	leer	-		-
	$\Delta$ NHR	-	$\Delta$ NHR	-		
	$\Delta$ rgp	-	$\Delta$ rgp	-		
5*	leer	+	leer	-		Homo sapiens G protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1) NM_170699.1 114-1124 hier: 84-1074 orf: 232..1224
	$\Delta$ NHR	+	$\Delta$ NHR	-		
	$\Delta$ rgp	+	$\Delta$ rgp	+	2h	
6*	leer	-	leer	-		-
	$\Delta$ NHR	-	$\Delta$ NHR	-		
	$\Delta$ rgp	-	$\Delta$ rgp	-		
7(1)	leer	-	leer	-		-
7(2)	$\Delta$ NHR	-	$\Delta$ NHR	-		
	$\Delta$ rgp	-	$\Delta$ rgp	-		
11*	leer	+	leer	-		-
	$\Delta$ NHR	+	$\Delta$ NHR	-		
	$\Delta$ rgp	+	$\Delta$ rgp	-		
13(1)	leer	-	leer	-		-
13(2)	$\Delta$ NHR	-	$\Delta$ NHR	-		
	$\Delta$ rgp	-	$\Delta$ rgp	-		
13(3)	leer	+	leer	+	1h	Homo sapiens metallothionein 2A (MT2A) NM_005953.2 109-461 hier:20-372 orf:58-243
	$\Delta$ NHR	+	$\Delta$ NHR	+	1h	
	$\Delta$ rgp	+	$\Delta$ rgp	+	1h	
14(2)	leer	+	leer	-		Homo sapiens T-cell lymphoma invasion and metastasis 2 (TIAM2), transcript variant 2 NM_001010927.2 610-1176 hier: 611-1177 orf: 186..2066
	$\Delta$ NHR	+	$\Delta$ NHR	+/-	1h	
	$\Delta$ rgp		$\Delta$ rgp	-		

## 5 ERGEBNISSE

Klon	SD-TL pGBKT7		SD-HALT pGBKT7		$\alpha$ -Gal- Test	Sequenzierung
19(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	1h 1h	Homo sapiens rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 2 (RABEP2) XM_001127592.1 109-512 hier: 358-760 orf: 1..1218
21*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
24(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + -	1h	Homo sapiens N-myc (and STAT) interactor (NMI) NM_004688.1 108-1151 hier:228-1281 orf: 281..1204
24(2)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
26(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
27*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
29*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
30*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	2h 2h	Homo sapiens sorting nexin 6 (SNX6), transcript variant 2 NM_152233.2 11-1160 hier: 30-1195 orf: 9..1265
31(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- +/- +/-	1h 1h	Homo sapiens ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d (ATP5H), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1 NM_006356.2 108-687 hier:38-617 orf: 65..550
32(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
33(1)	leer	+	leer	-		-
33(3)	$\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ +	$\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- -		-
33(2)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-

## 5 ERGEBNISSE

Klon	SD-TL pGBKT7		SD-HALT pGBKT7		$\alpha$ -Gal- Test	Sequenzierung
34(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +/-	3h 3h	Homo sapiens pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1 (PBXIP1) NM_020524.2 110-1016 hier: 810-1768 orf: 60..2255
35(3)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
40(2)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + -	2h	Kein Sequenzierungsergebnis.
42(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+/- + +	3h 3h 3h	Homo sapiens chromosome 9 genomic contig, alternate assembly Features: similar to Dipeptidyl-peptidase 2 precursor NW_924573.1
45(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
46*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	1h 1h	Homo sapiens glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase) (GLUL), transcript variant 3 NM_001033056.1 108-732 hier: 537-1141 orf: 213..1334
47(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	2h 2h	Homo sapiens ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1) NM_002032.2 346-942 hier: 349-945 140-284 hier: 205-345 orf: 236..787
50*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
51*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +/-	2h 2h	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, alternate assembly Features: inhibitor of DNA binding 2 NW_927719.1
52*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	2h 2h	Homo sapiens 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (HIBADH) NM_152740.2 104-1133 hier: 105-1139 orf: 196..1206
54(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- +/- +/-	1h 1h	Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2, 49kDa (NADH-coenzyme Q reductase) (NDUFS2) NM_004550.3  107-1005 hier: 1146- 2041 orf: 449..1840

## 5 ERGEBNISSE

Klon	SD-TL pGBKT7		SD-HALT pGBKT7		$\alpha$ -Gal- Test	Sequenzierung
57(2)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	2h 2h	Homo sapiens elongation factor Tu GTP binding domain containing 2 (EFTUD2) NM_004247.2 125-1186 hier:2357-3323 orf: 32..2950
58(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - +	2h	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma, 40kDa (EIF3S3) NM_003756.2 122-1197 hier:30-1092 orf:27..1085
59*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + -	2h	Homo sapiens N-myc (and STAT) interactor (NMI) NM_004688.1 108-1153 hier:228-1274 orf: 281..1204
60*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	2h 3h	Homo sapiens spectrin repeat containing, nuclear envelope 1 (SYNE1), transcript variant longer NM_033071.1 320-1197 hier: 18266-18751 orf: 438..26687
61(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
62(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
66(2)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - +	8h	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma, 40kDa (EIF3S3) NM_003756.2 109-1162 hier:21-1083 orf: 27..1085
67(2)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- +/- +	3h 2h	Homo sapiens tRNA splicing endonuclease 34 homolog (S. cerevisiae) (TSEN34) NM_024075.1 486-1156 hier:355-1035 orf: 113..1285
68(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
68(2)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	2h 2h	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 86 (C1orf86) NM_182533.1 125-602 hier:88-565 orf: 27..614
71(3)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- +/- +	4h 2h	Homo sapiens polymerase (DNA- directed), delta 4 (POLD4) NM_021173.2

5 ERGEBNISSE

Klon	SD-TL pGBKT7		SD-HALT pGBKT7		$\alpha$ -Gal- Test	Sequenzierung
73(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- +/- +	4h 2h	Homo sapiens polymerase (DNA-directed), delta 4 (POLD4) NM_021173.2
74*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- +/- +	4h 2h	Homo sapiens chromosome 11 openreading frame 79 (C11orf79) NM_017841.1
75*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	3h 2h	Homo sapiens required for meiotic nuclear division 5 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> ) (RMND5B) NM_022762.3 154-804 hier:167-807 orf: 181..1362
77(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	8h 2h 2h	Homo sapiens proteasome maturation protein (POMP) NM_015932.2 12-355 hier:168-510 orf: 76..501
78*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -	-	-
79(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- +/- +	2h 2h	Homo sapiens ferritin, light polypeptide (FTL) NM_000146.3 121-809 hier:18-700 orf: 200..727
81(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	2h 2h	Homo sapiens polymerase (DNA-directed), delta 4 (POLD4) NM_021173.2 118-1018 hier:33-933 orf: 148..471
84*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	2h 2h 2h	Homo sapiens phospholipase A2, group IVB (cytosolic) (PLA2G4B) NM_005090.2 123-893 hier:2664-3369 orf: 35..3073
88(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -	-	-
90*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+/- + +	2h 2h 2h	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2 (GNAI2) NM_002070.2 611-1108 hier: 1213-1724 orf: 122..1189
91(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+/- +/- +	- 2h 2h	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2 (GNAI2) NM_002070.2 607-1121 hier:1213-1751 orf: 122..1189

## 5 ERGEBNISSE

Klon	SD-TL pGBKT7		SD-HALT pGBKT7		$\alpha$ -Gal- Test	Sequenzierung
94*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
95*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- +/- +	2h 2h	<b>Homo sapiens triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM1) NM_018643.2 105-511 hier:65-470 orf: 65..769</b>
96(1) I	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - +	2h	Homo sapiens chromosome 19 genomic contig, alternate assembly Features: adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subunit isoform 1 & adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subunit isoform 2 NW_927240.1 HsCraAADB02_630
96(1) II	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - +	2h	Homo sapiens adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subunit (AP2A1), transcript variant 2 NM_130787.2 743-834 hier:2465-2556 orf: 212..3076
97(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- +/- +	2h 2h	Homo sapiens family with sequence similarity 82, member A (FAM82A) NM_144713.1 101-702 hier:1230-1832 orf: 118..1839
98(1) 98(2)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	2h 2h	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon, 47kDa (EIF3S5) NM_003754.2 110-1195 hier: 55-1130 orf: 34..1107
99(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
100(1) 100(3)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
101*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - -		-
102(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + -	-	Homo sapiens chromosome 5 openreading frame 42 (C5orf42) NM_023073.2
103*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	2h 2h	Homo sapiens amino-terminal enhancer of split (AES), transcript variant 2 NM_001130.5 110-1095 hier:225-1237 orf: 174..767

## 5 ERGEBNISSE

Klon	SD-TL pGBKT7		SD-HALT pGBKT7		$\alpha$ -Gal- Test	Sequenzierung
106*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - +/-	2h	Homo sapiens chromosome 15 genomic contig, alternate assembly Features: phosphatidylinositol glycan, class B NW_925884.1 HsCraAADB02_508
107(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - +	2h	Homo sapiens MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 ( <i>S. cerevisiae</i> ) associated protein (MCM3AP) NM_003906.3 185-764 hier:5534-6113 orf: 37..5979
108(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- - +	2h	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, alternate assembly Features: MAX dimerization protein 1 NW_927719.1 HsCraAADB02_69
111*	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	2h 2h	Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3, p65 (avian) (RELA) NM_021975.2 109-1178 hier: 711-1758 orf: 73..1728
112(1)	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	+ + +	leer $\Delta$ NHR $\Delta$ rgp	- + +	2h 2h	Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9, 22kDa (NDUFB9) NM_005005.1 108-742 hier: 106-729 orf: 80..619

## 5.2 Herstellung von GST-Fusionsproteinen von verschiedenen Deletionsmutanten der Ektodomäne von gp41

In diesem Teil der Arbeit sollten verschiedene Deletionsmutanten der Ektodomäne von gp41 geschaffen werden. Diese sollten im weiteren Verlauf dazu genutzt werden, den interagierenden Bereich einzugrenzen und die mögliche Interaktion zwischen  $\Delta$ NHR und TREM1 in *pull down* Experimenten zu detektieren. Bei diesem Experiment wurden mehrere Primerpaarungen genutzt und die Konstrukte zu generieren. Einige der Deletionsmutanten sollen noch bei weiteren Versuchen, beispielsweise für Immunisierungsstudien, der AG Denner zur Verfügung stehen.

In Abbildung 5.5 ist sowohl die Basenabfolge als auch die Aminosäuresequenz der Ektodomäne von gp41 dargestellt. Weiterhin ist das Fusionspeptid, der NHR-Bereich, mit  $\Delta$ E1 und ISU und der CHR-Bereich mit  $\Delta$ E2 unterschiedlich farbig hervorgehoben. In Abbildung 5.6 sind die gp41 Ektodomäne und ihre Deletionsmutanten schematisch als Übersicht dargestellt. Um die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen wurde je Konstrukt auch eines mit zusätzlich vier Lysinen hergestellt.

a.

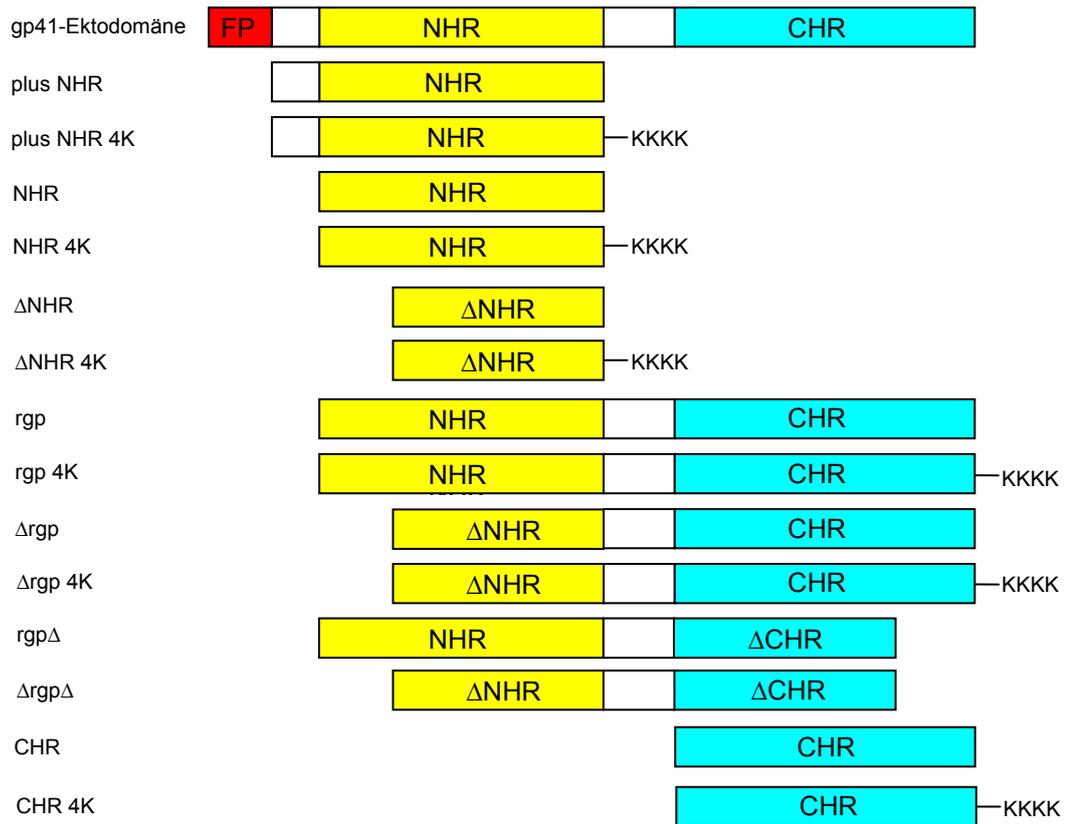
```
GCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGA
AGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAA
TTATTGTCTGATATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTG
AGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAACAGCT
CCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCT
CCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAACTCATTTGCACCACTGCTGTG
CCTTGGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATAA
CATGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTA
ATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACA
AGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAAACA
TAACAAATTGGCTGTGGTAT
```

b.

```
AVGIGALFLGFLGAAGS TMGAASMT LTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQ
QHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGC SGKLICTTAVP WNA
SWSNKSLEQIWNNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLE
LDKWASLWNWFNITNWLWYI
```

### Abbildung 5.5 Basenabfolge (a) und Aminosäuresequenz (b) der gp41 Ektodomäne.

Gp41 Ektodomäne umfasst insgesamt 510 bp, was 170 AS entspricht. Rot unterlegt ist das Fusionspeptid, gelb unterlegt die N-terminale Heptat Region (NHR) und blau unterlegt ist die C-terminale Heptat Region (CHR). Unterstrichen sind in der NHR das Epitop 1 (E1) und in der CHR die Epitopstelle 2 (E2). Fett hervorgehoben ist die Immunsuppressive Domäne (ISU), welche am C-terminalen Bereich der NHR lokalisiert ist.



**Abbildung 5.6** Schematische Darstellung der gp41 Ektodomäne und den daraus abgeleiteten Deletionsmutanten.

Rot unterlegt ist das Fusionspeptid, gelb die NHR und blau die CHR. Die Deletionsmutanten mit einem  $\Delta$ NHR-Konstrukt besitzen keine Epitopstelle 1 (E1) und  $\Delta$ CHR-Konstrukte keine Epitopstelle 2 (E2). Zu allen Deletionsmutanten (außer  $rgp\Delta$  und  $\Delta rgp\Delta$ ) wurden ebenfalls Konstrukte mit vier zusätzlichen Lysinen hergestellt, um die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen.

### 5.2.1 Klonierung von Konstrukten der gp41 Ektodomäne in pGex-KG

Die Klonierung der Verkürzungsmutanten, abgeleitet von der gp41-Ektodomäne, erfolgte über den Zwischenvektor pSSTA. Zu Beginn wurden Primer mit spezifischen Schnittstellen konstruiert, die zur Amplifikation von verschiedenen Deletionskonstrukten der Ektodomäne von gp41 genutzt werden können. Nach der Synthese wurde je ein Doppelansatz von den verschiedenen Konstrukten mittels PCR mit dem Programm PCR 65 amplifiziert (Tab. 5.2). Im nächsten Schritt wurde DNA-Material des Zwischenvektors pSSTA mit dem Enzym *Xcm* I restringiert und so TA-Überhänge geschaffen. Beide Proben wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und so auf ihre Richtigkeit überprüft (Abb. 5.7a & b). Nach der Aufreinigung der Gelblöcke wurde über Nacht eine Ligation angesetzt. Am folgenden Tag wurde diese in DH5 $\alpha$  transformiert und mittels 2YT-Amp Platten selektioniert. Die

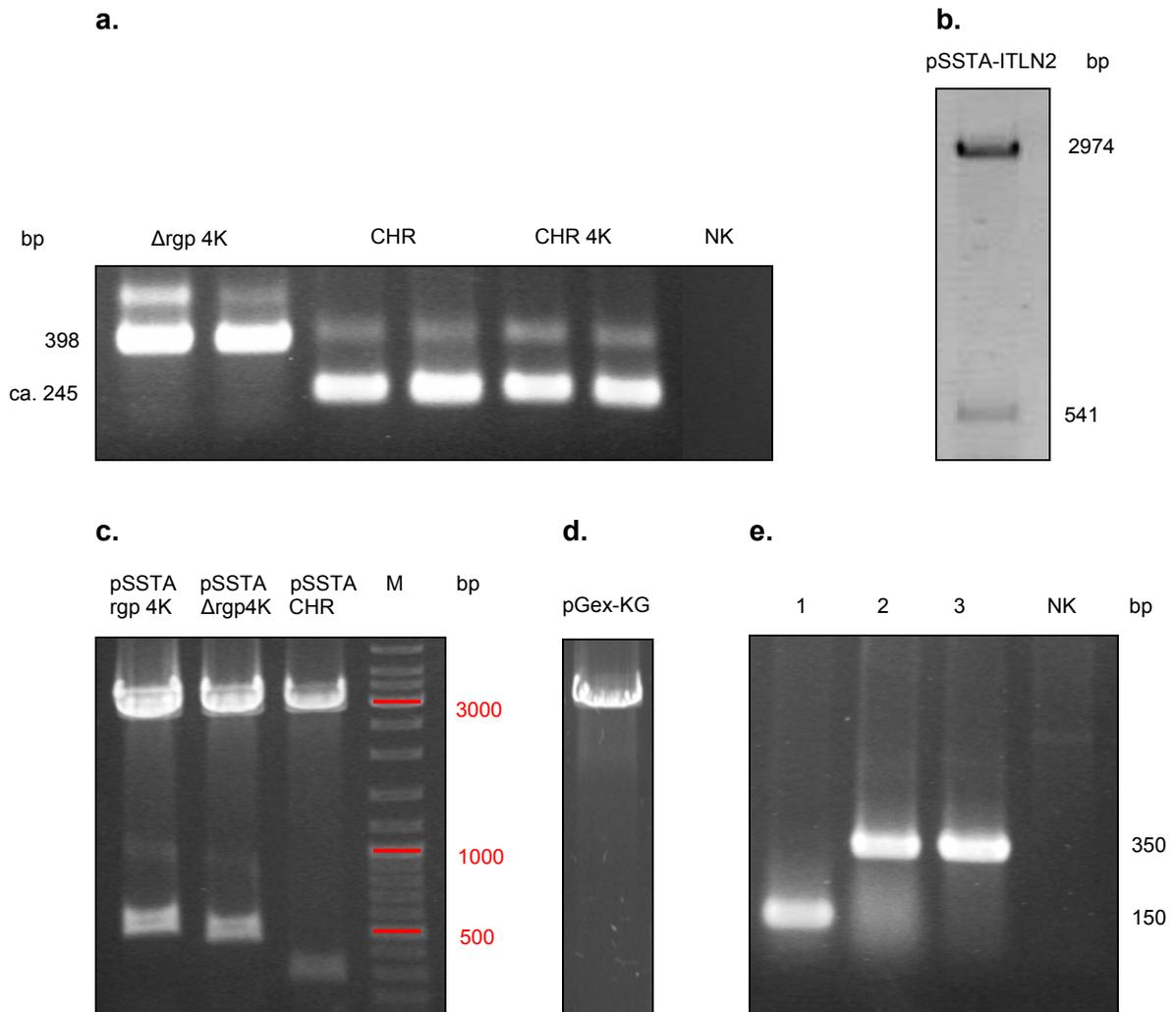
angewachsenen Klone wurden in 2YT-Amp Medium kultiviert und die DNA aufgereinigt. Durch einen Kontrollverdau (Abb. 5.7c) mittels der jeweiligen Restriktionsenzyme und deren anschließende Sequenzierung mit Hilfe der Primer T7-Prom und T7-Term konnte eine korrekte Insertion nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

**Tabelle 5.2 Primerpaarung mit entsprechenden Restriktionsenzymen.**

**Schwarz:** Klonierung der verschiedenen Konstrukte in pGex-KG (siehe 5.2.1). **Rot:** Klonierung von  $\Delta$ NHR bzw.  $\Delta$ rgp in pGBKT7 (siehe 5.1.1). **Blau:** Klonierung von rgp und CHR in den Vektor pGBKT7 (siehe 5.1.2).

Konstrukt	PCR-Primer <i>forward / reversed</i>	Restriktionsenzyme
plus NHR	GST plusNHR Eco for / GST NHR Xho rev	<i>Eco RI/Xho I</i>
plus NHR 4K	GST plusNHR Eco for / GST NHR4K Xho rev	<i>Eco RI/Xho I</i>
NHR	GST NHR for (XhoI) / GST NHR rev(Hind III)	<i>Xho I/Hind III</i>
NHR 4K	GST NHR for (XhoI) / GST NHR rev 4K	<i>Xho I/Hind III</i>
$\Delta$ NHR	GST $\Delta$ E1 BamHI / GST NHR rev(Hind III)	<i>Bam HI/Hind III</i>
	<b>DE1 (EcoRI) / Bam NHR rev</b>	<b><i>Eco RI/Bam HI</i></b>
$\Delta$ NHR 4K	GST $\Delta$ E1 BamHI / GST NHR rev 4K	<i>Bam HI/Hind III</i>
rgp	GST NHR BamHI / GST-RGP rev (SacI)	<i>Bam HI/Sac I</i>
	GST rgp Eco for / GST rgp Xho rev	<i>Eco RI/Xho I</i>
	GST rgp Eco for / GST-rgp rev (HindIII)	<i>Eco RI/Hind III</i>
	<b>gp 41 mut / Bam rgp rev</b>	<b><i>Eco RI/Bam HI</i></b>
rgp 4K	GST NHR BamHI / GST RGP rev 4K (SacI)	<i>Bam HI/Sac I</i>
	GST rgp Eco for / GST rgp4K Xho rev	<i>Eco RI/Xho</i>
	GST rgp Eco for / GST-RGP4K rev (HindIII)	<i>Eco RI/Hind III</i>
$\Delta$ rgp	GST-deltaE1 BamHI / GST RGP rev (SacI)	<i>Bam HI/Sac I</i>
	<b>DE1 (EcoRI) / Bam rgp rev</b>	<b><i>Eco RI/Bam HI</i></b>
$\Delta$ rgp 4K	GST-deltaE1 BamHI / GST RGP rev 4K (SacI)	<i>Bam HI/Sac I</i>
rgp $\Delta$	GST NHR BamHI / GST-RGP rev (SacI)	<i>Bam HI/Sac I</i>
$\Delta$ rgp $\Delta$	GST-deltaE1 BamHI / GST RGP rev (SacI)	<i>Bam HI/Sac I</i>
CHR	GST-CHR BamHI / GST RGP rev (SacI)	<i>Bam HI/Sac I</i>
	GST CHR Eco for / GST rgp Xho rev	<i>Eco RI/Xho I</i>
	<b>CHR-EcoRI for / CHR SalI rev</b>	<b><i>Eco RI/Sal I</i></b>
CHR 4K	GST-CHR BamHI / GST RGP rev 4K (SacI)	<i>Bam HI/Sac I</i>
	GST CHR Eco for / GST rgp4K Xho rev	<i>Eco RI/Xho I</i>

Im nächsten Schritt wurde der Leervektor pGex-KG mittels dem entsprechenden Restriktionsenzympaar (Tab. 5.2), je nach Schnittstelle des jeweiligen Deletionskonstruktes, restringiert (Abb. 5.7d). Anschließend wurden sie mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt. Nach der Ligation, die über Nacht erfolgte, wurden die Plasmide in DH5 $\alpha$  transformiert und auf 2YT-Amp Platten ausplattiert.



**Abbildung 5.7 Klonierung der Deletionskonstrukte der gp41 Ektodomäne in pGex-KG.**

**a.** PCR-Produkte von  $\Delta$ rgp 4k, CHR und CHR 4k, je im Doppelansatz. Die Amplifikation erfolgte mittels spezifischer Primer, die Tabelle 5.2 zu entnehmen sind. Als Negativ-Kontrolle (NK) wurde Wasser mitgeführt.

**b.** Restriktion von pSSTA-ITLN2 mit *Xcm* I.

**c.** Kontrollverdau von pSSTA rgp 4K, pSSTA  $\Delta$ rgp 4K und pSSTA CHR mittels der Restriktionsenzyme *Bam* HI und *Sal* I.

**d.** Restriktion von pGEX-KG mit den jeweiligen Primerpaaren.

**e.** Ausschnitt einer Kolonie-PCR der pGex-CHR 4K. 1 negativer Klon, 2/3 positiver Klon und NK Negativ-Kontrolle.

Die daraufhin angewachsenen Klone wurden mittels Kolonie-PCR durch Nutzung der Primer pGexKG for und pGexKG rev auf die Insertion des Konstruktes getestet (Abb. 5.7e). Die Primer wurden so gesetzt, dass zur Überprüfung der PCR auch bei einem negativen Klon ein Amplifikat entsteht. Positive Klone wurden über Nacht in 2YT-Amp Flüssigmedium kultiviert und mittels Miniprep Express Matrix™ Bio 101 aufgereinigt. Das erhaltende Material wurde anschließend mit den Primern pGexKG for und pGexKG rev sequenziert. Die Auswertung erfolgte durch die Software Lasergene-SeqMan (DNASTAR Inc., USA) und wurde dann mit der bekannten Sequenz der Konstrukte verglichen (Ergebnisse nicht gezeigt). In allen Proben konnte eine korrekte Insertion festgestellt werden.

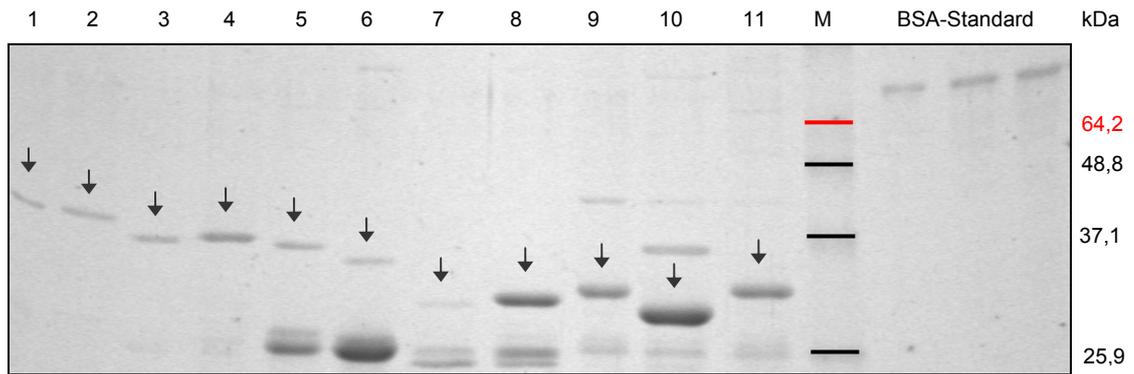
### 5.2.2 Bestimmung der Induktionsbedingungen der Deletionskonstrukte

Das erhaltende und überprüfte DNA-Material der verschiedenen Deletionskonstrukte wurde nun in *E. coli* BL21 transformiert und auf 2YT-Amp Platten ausplattiert. Die erhaltenen Klone wurden in 2YT-Amp Flüssigmedium kultiviert und Glycerinkulturen angelegt.

Zur Bestimmung der Induktionsbedingungen wurden zu Beginn Vorversuche in einem kleineren kleinen Maßstab durchgeführt (siehe 4.6.1). So konnte die IPTG-Menge und Temperatur genau ermittelt und die Induktionszeit bestimmt werden.

Daraufhin wurden je GST-Fusionsprotein zwei Bedingungskombinationen ausgewählt und die Fusionsproteine in einem größeren Maßstab exprimiert (siehe 4.6.1). Aus dem so gewonnenen Zellpellet wurde ein Bakterienlysate hergestellt (siehe 4.6.1). Die Trennung der Fusionsproteine erfolgte anschließend durch die Kopplung an Glutathione-Sepharose *beads* (siehe 4.6.1). Die Proben wurden anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese (siehe 4.4.1) aufgetrennt und mit Coomassie-Blau (siehe 4.4.2) angefärbt. Dadurch konnten die günstigsten Induktionsbedingungen abgelesen werden, welche in Tabelle 7.3 zusammengefasst sind. Bei den Konstrukten GST-plus NHR, GST-NHR und GST- $\Delta$ NHR war nach erfolgter Induktion nur Abbau zu verzeichnen. Sie sind daher nicht in der Auflistung enthalten. In Abbildung 5.7 sind alle Deletionskonstrukte unter ihren optimalen Bedingungen auf dem angefärbten SDS-Gel dargestellt.

Bei GST-rgp $\Delta$  und GST- $\Delta$ rgp $\Delta$  (Abb. 5.8) konnte neben einer Induktion der Fusionsproteine ebenfalls ein starker Abbau beobachtet werden, da in der Höhe von ca. 26 kDa eine starke Bande zu verzeichnen war. Diese steht für GST allein ohne Protein. Des Weiteren konnte GST-CHR nur sehr schwach induziert werden. Die Menge an Peptid im Bakterienlysate konnte anhand des aufgetragenen BSA-Standards abgeschätzt werden.



**Abbildung 5.8 SDS-Gel der induzierten Deletionskonstrukte der Ektodomäne von gp41.**

**1:** GST-rgp (43,8 kDa), **2:** GST-rgp 4K (44,3 kDa), **3:** GST- $\Delta$ rgp (41,6 kDa), **4:** GST- $\Delta$ rgp 4K (42,1 kDa), **5:** GST-rgp $\Delta$  (38,1 kDa), **6:** GST- $\Delta$ rgp $\Delta$  (36,3 kDa), **7:** GST-CHR (35,3 kDa), **8:** GST-CHR 4K (35,7 kDa), **9:** GST-NHR 4K (33,6 kDa), **10:** GST- $\Delta$ NHR 4K (31,8 kDa), **11:** GST-plus NHR 4K (35,8 kDa), **M:** Marker, **BSA-Standard:** 400 ng, 800 ng und 1600 ng (66,4 kDa).

**Tabelle 5.3 Optimale Induktionsparameter für die Expression der gp41 Deletionskonstrukte.**

Konstrukt	Zeit [h]	Temperatur [°C]	IPTG-Menge [mM]
GST-plus NHR 4K	1	37	0,5
GST-NHR 4K	3	37	0,5
GST- $\Delta$ NHR 4K	3	25	1
GST-rgp	3	4	0,1
GST-rgp 4K	3	4	0,1
GST- $\Delta$ rgp	3	4	0,1
GST- $\Delta$ rgp 4K	3	4	0,1
GST-rgp $\Delta$	ÜN	15	1
GST- $\Delta$ rgp $\Delta$	ÜN	15	1
GST-CHR	6	30	0,1
GST-CHR 4K	6	30	0,1

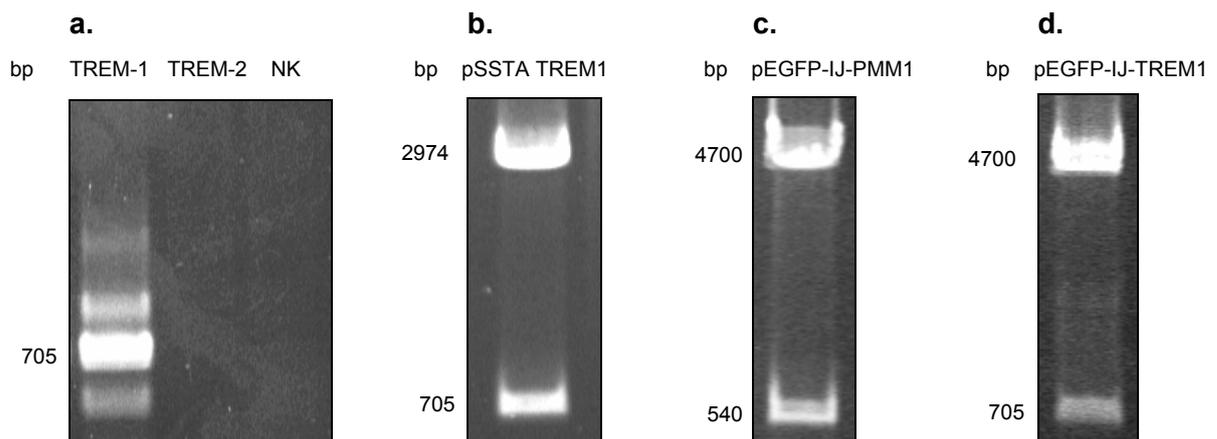
## 5.3 TREM-1 ein putativer Interaktionspartner der ISU-Domäne

### 5.3.1 Klonierung von TREM-1

In diesem Teil der Arbeit sollte TREM-1 in verschiedene Vektoren einkloniert werden, um diese in weiteren Versuchen zu nutzen. Zum einen sollte TREM-1 in pACT2 über die

Enzyme *Nco* I / *Bam* HI bzw. *Nde* I / *Bam* HI kloniert werden, damit erneute *yeast two-hybrid* Analysen mit dem Vollängenkonstrukt durchgeführt werden können. Zum anderen sollte TREM-1 in pEGFP-IJ über *Nde* I / *Bam* HI bzw. in pEGFP-C2 über *Eco* RI / *Bam* HI kloniert werden, um Zellen zu transfizieren, damit diese TREM-1 überexprimieren.

Zu Beginn sollten TREM-1 sowie TREM-2 mittels PCR aus der vorhandenen pACT-Leukozytengenbank amplifiziert werden. Hierbei wurden sowohl für pEGFP-IJ als auch für pACT2 die Primer Trem1 for und Trem1 rev, für pEGFP-C2 die Primer Trem1 forEco und Trem1 rev und für den Vektor pGex-KG die Primer Trem1 forNco und Trem1 rev für die Amplifizierung von TREM-1 genutzt. Gleichzeitig wurde ebenfalls eine Amplifizierung für TREM-2 mit den Primern Trem2 for und Trem2 rev durchgeführt und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 5.9a). TREM-2 konnte auch nach mehrmaliger Wiederholung der PCR nicht amplifiziert werden, woraus zu schließen ist, dass TREM-2 nicht in der pACT Leukozytengenbank enthalten ist. TREM-1 dagegen ließ sich problemlos aus der pACT-Leukozytengenbank amplifizieren.



**Abbildung 5.9 Klonierung von TREM-1 in pEGFP-IJ.**

- a. PCR von TREM-1 aus der pACT-Leukozytengenbank. NK = Negativ-Kontrolle.
- b. Kontrollverdau pSSTA TREM-1 mittels *Nde* I und *Bam* HI.
- c. Restringiertes pEGFP-IJ-PMM1.
- d. Kontrollrestringtion von pEGFP-IJ-TREM-1.

Bei der Klonierung wurde wieder die Strategie einer indirekten Klonierung über den Zwischenvektor pSSTA verfolgt. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit *Xcm* I geschnittenes pSSTA, welches bereits schon in vorhergehenden Klonierungen hergestellt wurde, eine Ligation über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde die Ligation in DH5 $\alpha$  transformiert und auf 2YT-Amp Platten ausplattiert.

Auch nach mehrmaliger Wiederholung und dem Versuch der Optimierung der Ligation konnten Klone auf Platten verzeichnet werden. Die erhaltenen Klone wurden über Nacht in 2YT-Amp Flüssigmedium kultiviert und am folgenden Tag mittels Plasmidisolierung aufgereinigt. Die vorhandene DNA wurde zur Bestimmung der richtigen Basenabfolge mit den Primern T7-Prom und T7-Term sequenziert und zur Kontrolle mit den Enzymen *Nde*I und *Bam*HI restringiert (Abb. 5.9b). Aus der Auswertung der Sequenzierung (Daten nicht gezeigt) mittels der Computersoftware Lasergene-SeqMan (DNASTAR Inc., USA) und dem Kontrollverdau wurde der korrekte Einbau von TREM-1 nachgewiesen.

Im weiteren Verlauf wurde nun pACT2 und pEGFP-IJ-PMM1 mittels *Nde*I und *Bam*HI restringiert und mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 5.9c). Sowohl das TREM1-Fragment als auch die Vektoren-Fragmente wurden nun mittels QIAquick Gel Extraction *Kit* aufgereinigt. Folgend wurde eine Ligation je Vektor durchgeführt und auf 2YT-Kan Platten (pEGFP-IJ) bzw. auf 2YT-Amp Platten (pACT2) ausplattiert. Angewachsene Klone wurden über Nacht kultiviert und am folgenden Tag aufgereinigt. Anschließend wurde mittels eines Kontrollverdaus (Abb. 5.9d) die korrekte Insertion nachgewiesen. Bei pACT2 TREM-1 Klonen konnte keine Insertion nachgewiesen werden. Nachfolgend wurden die positiven Klone von pEGFP-IJ-TREM-1 mit Hilfe der Primer pEGFP-C2 for und pEGFP-C2 rev sequenziert. Mittels Lasergene-SeqMan konnten die Sequenzen aufgearbeitet und mit Hilfe eines Internetprogramms translatiert<sup>3</sup> (Abb. 5.10) und anschließend und mit der bekannten Sequenz verglichen werden. Hier konnte eine Übereinstimmung nachgewiesen sowohl in der *forward* als auch in der *reversed* Sequenzierung festgestellt werden.

```
G Met RCCCRHHYLSTQSALS KDPNEKRDH Met VLLEFVTAAGITLG Met
DELYKSGRTQIS Met AYPYDVPDYASLGGH Met RKTRLWGLLW Met LF
VSELRAATKLTEEKYELKEGQTL DVKCDYTL EKFASSQKAWQIIRD
GE Met PKTLACTERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLLRVR Met VNLQ
VEDSGLYQCVIYQPPKEPH Met LFDRI RLVT KGFSGTPGSNENSTQ
NVYKIPPTTTKALCPLYTSPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINLTNVT
DIIRVPVFNIVILLAGGFLSKSLVFSVLFVAVTLRSFVP Stop GSEFELE
RSTGSR Stop LIIISHTTFCRGFTCFKKPPHTSPLNLKHK Met NAIVCLL
TCFLQLIYGYQIKA Stop HHKFH
```

**Abbildung 5.10** Translatiertes *forward*-Sequenzierungsergebnis von pEGFP-TREM-1.

Gelb unterlegt ist Aminosäuresequenz von TREM-1.

<sup>3</sup> <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>

### 5.3.2 Detektion von TREM-1 in Zytosol-Membran-Fractionen, transfizierten Zellen und verschiedenen Gesamtzelllysaten

Um im weiteren Versuchsverlauf eine Interaktion zwischen TREM-1 und der Ektodomäne von gp41 weiter zu verifizieren, sollen *pull down* Experimente durchgeführt werden. Hierbei werden Lysate benötigt die TREM-1 enthalten und so für die Bindungsanalyse genutzt werden können. Zur Gewinnung dieser Lysate wurden unterschiedliche Strategien verfolgt.

TREM-1 ist in der Zellmembran von Monozyten und Neutrophilen lokalisiert, daher wurde zu Beginn eine Zytosol-Membran-Fraktionierung (siehe 4.5.3) von THP-Zellen, eine humane monozytische Leukämiezelllinie, durchgeführt. Hierbei wurden die drei verschiedenen Zellfraktionen P14, P100 und S100 gewonnen, wodurch Proteine der großen und kleinen Membranen sowie lösliche Proteine getrennt werden konnten. Zum anderen wurden 293 T-Zellen mittels der  $\text{CaCl}_2$ -Methode transfiziert (siehe 4.5.1) und durch die Aufnahme in verschiedene Puffer die drei Zelllysate 293T-IPA, 293T-RIPA und 293T-PP (siehe 4.5.2) hergestellt. Des Weiteren wurde ein Gesamtzelllysat aus HL-60 Zellen in RIPA-Puffer (HL-60-RIPA) hergestellt, welche als Positiv-Kontrolle dienen sollte. Dieses Lysat wurde von der Firma Abnova zum Nachweis von humanen TREM-1 mittels des primären Antikörpers TREM1 monoclonal Ab (M04), clone 2E2 verwendet. Außerdem wurde ein Gesamtzelllysat von humanen PBMCs hergestellt.

Die so gewonnen Lysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese (siehe 4.4.1) aufgetrennt und anschließend eine Western Blot Analyse (siehe 4.4.3) durchgeführt, um TREM-1 zu detektieren. Zur Detektion wurden die drei verschiedenen Antikörper (siehe 3.5.1) der Firma Santa Cruz Biotechnology als auch mit dem R&D Antikörper mit jeweils angegebener Konzentration verwendet.

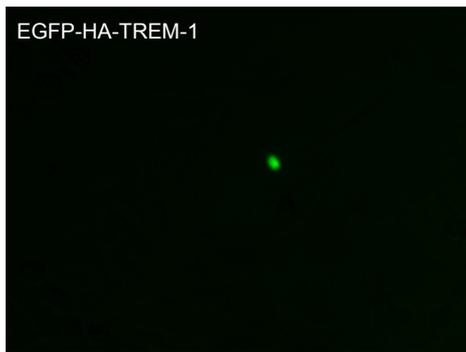
Alle Detektionsversuche blieben jedoch auch nach mehrfacher Wiederholung und Versuchsoptimierung erfolglos. Es konnte ebenfalls kein TREM-1 in den eingesetzten Positiv-Kontrollen (THP1 Cell Lysate: sc-2238 und HL-60 Gesamtzelllysate) detektiert werden. Die Funktion der Sekundären Antikörper wurde mit bereits früher erfolgreich getesteten Proben nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Eingesetzte Puffer und Lösungen wurden ebenfalls überprüft bzw. neu hergestellt. Allerdings konnte hierbei keine falsche Zusammensetzung festgestellt werden.

Daraufhin wurden HeLa-Zellen mit der  $\text{CaCl}_2$ -Methode und mittels Lipofectamine® transfiziert. PMM1 diene als Kontrollprotein. Über EGFP konnte die Transfektionsrate der lebenden HeLa-Zellen 24 h und 30 h nach der Transfektion mittels Immunfluoreszenzaufnahmen überprüft werden (Abb. 5.11). Nach 24 h und 30 h wurden die Zellen in RIPA-Puffer aufgenommen und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion erfolgte

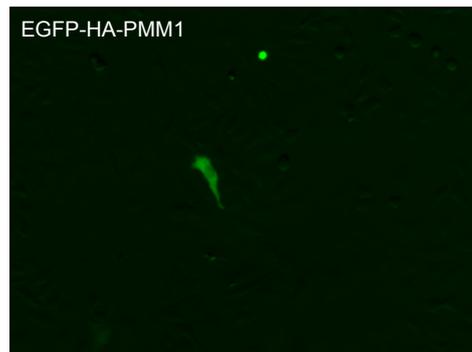
mit Hilfe des Western Blots. Hierbei wurde zum einen der TREM1 monoclonal Ab (M04), clone 2E2 der Firma Abnova verwendet. In einem zweiten identischen Blot wurde mittels HA.11 Monoclonal Ab MMS-101P der Firma Covance detektiert, da pEGFP-IJ ebenfalls einen HA-Tag aufweist (Abb. 5.12).

### CaCl<sub>2</sub>-Methode

a.

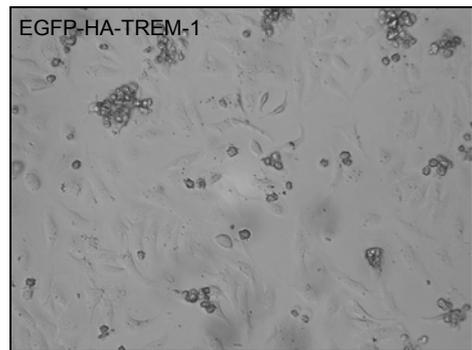
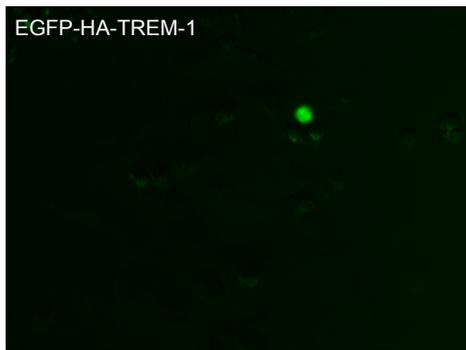


b.

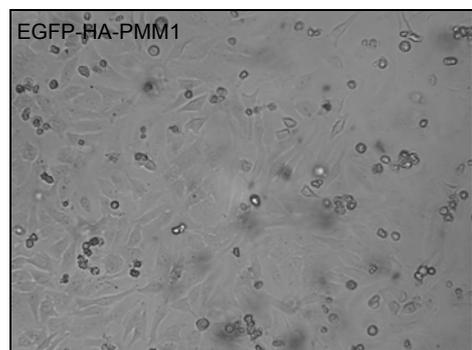
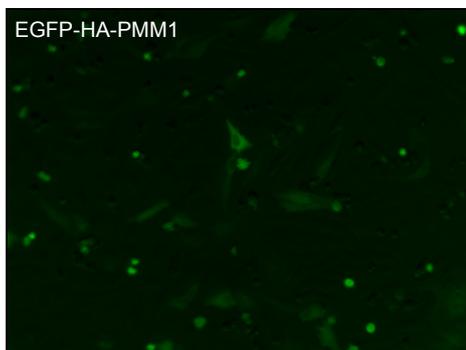


### Lipofectamine®

c.

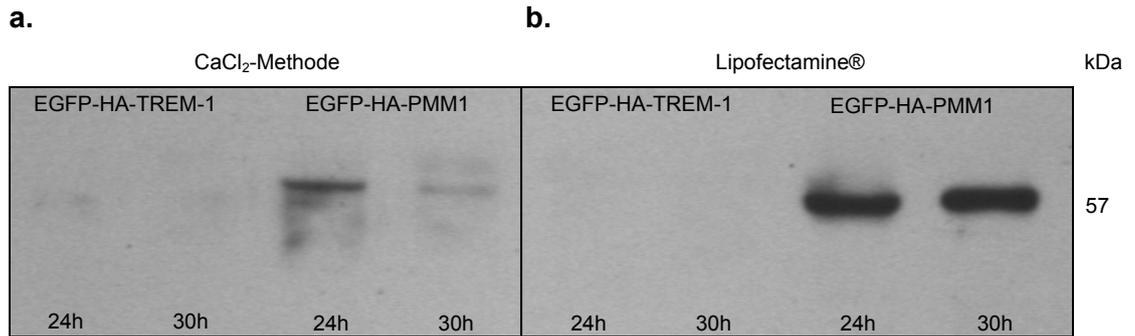


d.



**Abbildung 5.11 Immunfluoreszenzaufnahmen der HeLa-Zellen 30 h nach Transfektion.**

- a. Transfektion mit pEGFP-IJ-TREM1 mittels CaCl<sub>2</sub>-Methode.
- b. Transfektion mit pEGFP-IJ-PMM1 mittels CaCl<sub>2</sub>-Methode.
- c. Transfektion mit pEGFP-IJ-TREM1 mittels Lipofectamine®.
- d. Transfektion mit pEGFP-IJ-PMM1 mittels Lipofectamine®.

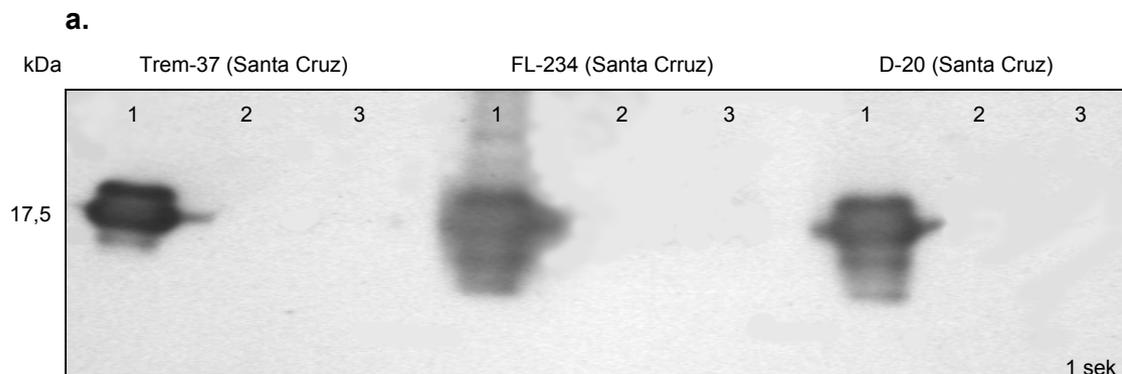


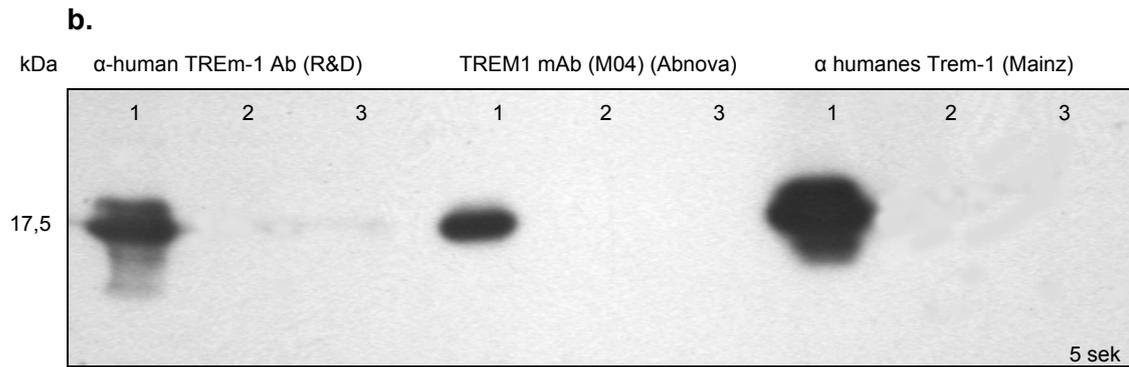
**Abbildung 5.12 WB der transfizierten HeLa-Zellen mit der CaCl<sub>2</sub>-Methode (a) und mittels Lipofectamine® (b).**

Die Detektion erfolgte mittels HA.11 Monoclonal Ab MMS-101P der Firma Convance. Die Entwicklungszeit betrug 1 min.

Es konnte festgestellt werden, dass eine Transfektion mittels Lipofectamine® effizienter als die CaCl<sub>2</sub>-Methode war. Des Weiteren war eine sehr niedrige Transfektionsrate mit EGFP-HA-TREM-1 im Vergleich der Kontrollprotein EGFP-HA-PMM1 zu erkennen.

Daraufhin wurden die vorhandenen primären TREM-1 Antikörper mit Hilfe von rekombinanten löslichen TREM-1 (rsTREM-1) und einem bereits getesteten Antikörper, welche freundlicherweise durch Dr. Philipp Haselmeyer, Institut für Immunologie, Mainz bereitgestellt wurde, auf ihre Funktion überprüft (Abb. 5.13). Durch das Auftragen von rsTREM-1, die Positiv-Kontrolle THP-1 Cell Lysate: sc-2238 (Santa Cruz Biotechnology) und die von Abnova® Corporation angegebene Positiv-Kontrolle HL-60 Gesamtzelllysat in modifiziertem RIPA-Puffer, konnten alle angegebenen Primären TREM-1 Antikörper getestet werden. Alle getesteten Antikörper konnten rsTREM-1 detektieren. Jedoch waren beide Positiv-Kontrollen mit keinem der eingesetzten Primären Antikörper nachweisbar.





**Abbildung 5.13 Western Blot zum Nachweis der Funktion der Primären Antikörper.**

Zum Test der Funktion der primären Antikörper wurden pro Antikörper jeweils drei Proben aufgetragen: Spur 1 rsTrem-1, Spur 2 THP-1 Cell Lysate: sc-2238 und Spur 3 HL-60 Gesamtzelllysat. a. Antikörper vertrieben durch Santa Cruz. b. Antikörper von R&D, Abnova und aus Mainz. Die genaue Bezeichnung der Antikörper ist Abschnitt 3.5.1 zu entnehmen.

#### 5.4 *Pull down* Experimente zur Verifizierung der Interaktion zwischen TREM-1 und der gp41 Ektodomäne

Um die Interaktion zwischen TREM-1 und der gp41 Ektodomäne weiter zu verifizieren, sollen *pull down* Analysen durchgeführt werden.

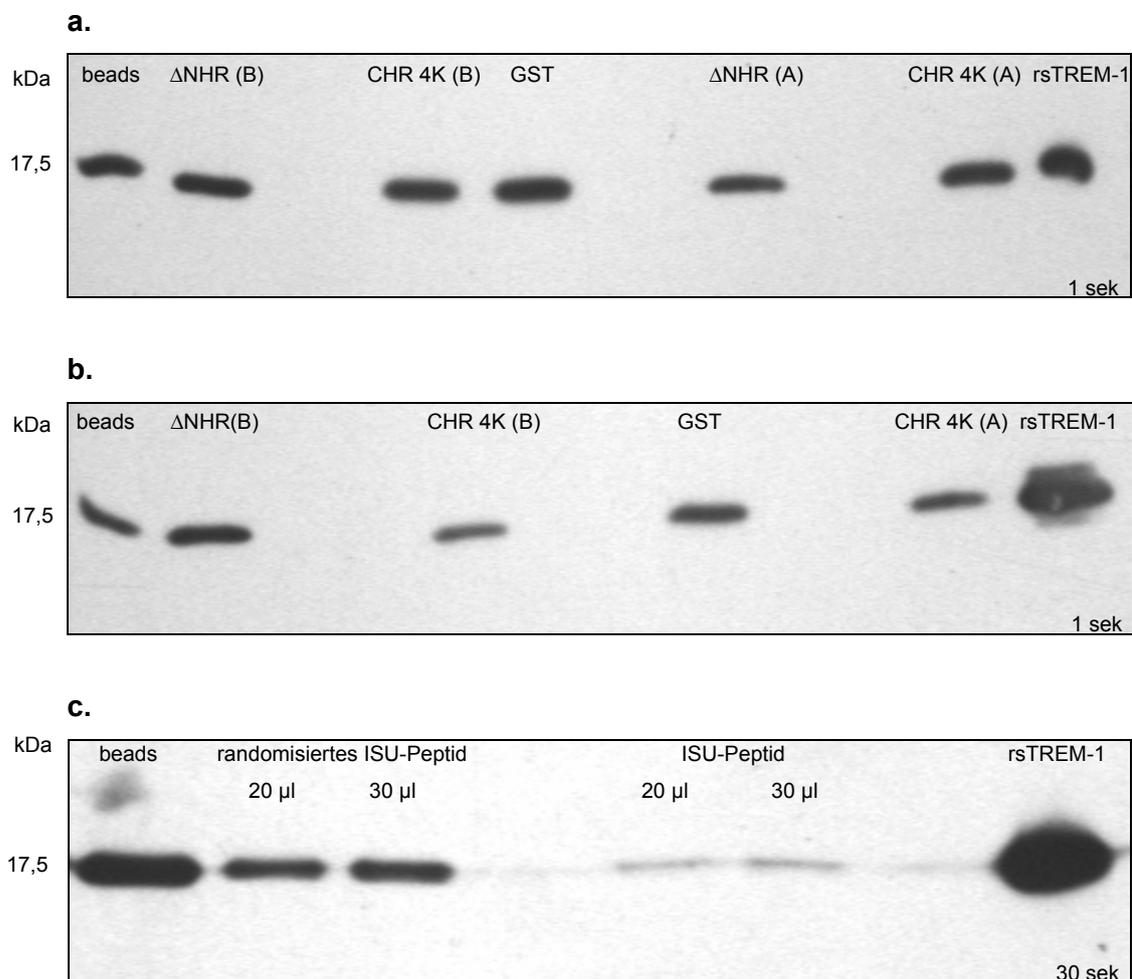
Da durch die vorangegangenen Experimente kein TREM-1 in Zelllysaten oder transfizierten Zellen detektiert werden konnte, wurden folgende Versuche mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Philipp Haselmayer, Institut für Immunologie der Universität Mainz durch die Leihgabe von rekombinanten löslichen TREM-1 (rsTREM-1) und einem monoklonalen anti-humanen TREM-1 Antikörper durchgeführt.

##### 5.4.1 *GST-pull down* Analyse mit Glutathion Sepharose beads 4B

Zu Beginn des Versuches wurde eine 25 %-ige *slurry* der Glutathion Sepharose™ 4B *beads* laut Angaben des Herstellers hergestellt. Im nächsten Schritt wurden 10 µg GST-Fusionsproteine GST-ΔNHR und GST-CHR in Form eines Bakterienlysates als auch aufgereinigt vorliegend, an die *beads* gekoppelt (siehe 4.6.5) und anschließend mit einer rsTREM-1-Proteinlösung inkubiert (siehe 4.6.7). Als Kontrolle wurde GST ohne Fusionsprotein als auch die *beads* allein mitgeführt. Danach erfolgte eine Auftrennung der Proben mittels SDS-Gelelektrophorese und die Detektion mit Hilfe einer Western Blot-Analyse. Hierbei wurde der von Dr. Philipp Haselmayer zur Verfügung gestellte anti-human

TREM-1 mAb zu Detektion genutzt. Als Sekundärer Antikörper wurde Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin/HRP der Firma Dako 1:2000 eingesetzt.

In Abbildung 5.14a ist die Western Blot-Analyse dargestellt. Es ist ersichtlich, dass TREM-1 bei allen Proben unspezifisch gebunden wurde, sodass eine erneute *pull down* Analyse durchgeführt wurde. Bei dieser wurde durch Nutzung des TIF-Puffers bei der Kopplung von rsTREM-1 die Stringenz erhöht und die Kopplungsdauer von vier Stunden auf eine Stunde herab gesetzt, um so eine spezifischere Bindung nachweisen zu können (siehe Abbildung 5.14b). Aufgrund der begrenzten Zeit war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich weitere Faktoren bei der Kopplung zu optimieren und somit eine spezifische Interaktion zu verifizieren.



**Abbildung 5.14 Western Blot Ergebnisse der *pull down* Analysen.**

**a.** GST-*pull down*: Kopplung mit rsTREM-1 für 4h mit PBS.

**b.** GST-*pull down*: Kopplung mit rsTREM-1 für 1h mit TIF-Puffer.

**c.** *Pull down* mit Dynabeads® Streptavidin M-280: Die Kopplung von rsTREM-1 erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Es wurden zum einen 20 µl und zum anderen 30µl der *beads-slurry* eingesetzt.

#### **5.4.2 Pull down Analyse mit Dynabeads® Streptavidin M-280**

Zu Beginn wurden die Dynabeads entsprechend Abschnitt 4.6.2 aufgearbeitet und eine *slurry* hergestellt. Anschließend wurden zwei unterschiedliche Mengen von *beads* eingesetzt, um randomisiertes ISU-Peptid und ISU-Peptid an diese zu koppeln (siehe 4.6.2). Folgend wurden die Proben mit aufgereinigtem rsTREM-1 inkubiert. Als Kontrolle wurden die *beads* allein mitgeführt. Im folgenden Schritt wurden die Proben aufgetrennt (siehe 4.4.1) und mittels Western Blot analysiert.

Als primärer Antikörper wurde ebenfalls der anti-human TREM-1 mAb und als sekundärer Antikörper Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin/HRP der Firma Dako (1:2000) eingesetzt. In Abbildung 5.14c ist die Western Blot Analyse dargestellt. Hierbei ist erkennbar, dass rsTREM-1 ebenfalls wieder unspezifisch mit den *beads* interagiert. Des Weiteren ist ein stärkeres Signal bei Kopplung von randomisierten ISU-Peptid im Vergleich zu ISU-Peptid zu erkennen.

## 6 DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden Interaktionsstudien mit einem Deletionskonstrukt der gp41 Ektodomäne von HIV-1 durchgeführt. Mittels der *yeast two-hybrid* Analyse wurden neue putative Interaktionspartner identifiziert. Anschließend sollte mit weiteren Methoden eine mögliche Interaktion zwischen der gp41-Ektodomäne und dem putativen Partner verifiziert werden, wobei der Schwerpunkt auf Proteine / Rezeptoren gelegt wurde, die in der Plasmamembran lokalisiert sind. Hierfür wurden zuerst unterschiedliche Deletionsmutanten der gp41 Ektodomäne hergestellt und diese folgend in *pull-down* Analysen eingesetzt, um eine mögliche Interaktion bestätigen zu können.

### 6.1 Detektion putativer Interaktionspartner

Werden Proteinsequenzen einer ganzen Bibliothek von cDNA-Fragmenten an eine Aktivierungsdomäne fusioniert, kann mittels der *yeast two-hybrid* Methode ein *screening* nach putativen Interaktionspartnern durchgeführt werden (Chien *et al.*, 1991). Dieses System wurde bereits bei einem weiten Spektrum von Proteinen angewendet, einschließlich derer die sich normalerweise im Zellkern, Zytoplasma oder den Mitochondrien befinden, aber auch Proteine, die peripher an der Membran oder extrazellulär lokalisiert sind (Fields und Sternglanz, 1994).

Das *yeast two-hybrid* System bietet einige Vorteile, die es sehr nützlich für Protein-Protein Interaktionen machen. Da es eine sehr sensitive Methode ist, erlaubt es so auch eine Detektion von sehr schwachen Interaktionen, die mit anderen Methoden nicht möglich sind (Li und Fields, 1993; van Elst *et al.*, 1993). Auf der Grundlage der Bindung verschiedener Proteine an das Retinoblastom-Protein, ein Tumor-Suppressor-Protein, schätzten Durfee *et al.* die minimale Bindungsmenge auf ca. 1  $\mu\text{M}$ , die für eine Detektion einer Interaktion in ihrem *yeast two-hybrid* System nötig ist (Durfee *et al.*, 1996). Dies deutet darauf hin, dass das System für eine große Auswahl von Protein-Interaktionen einsetzbar ist, jedoch ist die minimal-detektierbare Interaktion von mehreren Variablen abhängig und variiert daher im speziellen Fall.

Die Bäckerhefe ist ein sehr kostengünstiger und robuster Organismus, wodurch sehr leicht große *screening* Ansätze in kurzer Zeit durchführbar sind, um ein möglichst breites Spektrum an putativen Interaktionspartnern, welche transient oder stark interagieren, abzudecken. Ein weiterer Vorteil des *screenings* ist, dass das klonierte Gen von einem aus einer Bibliothek

„gefischten“ interagierenden Protein sofort verfügbar ist (Chien *et al.*, 1991; Phizicky und Fields, 1995). Weiterhin bietet die Hefe in vivo-ähnliche Verhältnisse, die ein Zellmilieu schaffen, was beispielsweise posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierung oder Palmytilierung, oder die Faltung durch Chaperone möglich macht. Außerdem kann bei dieser Methode auf eine biochemische Aufreinigung von Proteinen verzichtet werden.

Die Einschränkungen des Systems liegen darin, dass die veränderten Bedingungen im Zellkern nicht für jede Protein-Protein-Interaktionen, wie membranständige oder extrazelluläre Proteine, aber auch für Proteinkomplexe, geeignet sind. Durch eine unvollständige oder fehlerhafte Ausbildung einer funktionalen Sekundär- bzw. Tertiärstruktur kann beispielsweise ein Interaktionsbereich von einer Transkriptionsfaktordomäne verdeckt werden und der putative Interaktionspartner daher nicht mehr binden. Ferner führt *S. cerevisiae* andere Modifikationen durch, die sich von denen anderer eukaryotischer Systeme, in denen das Protein natürlicherweise vorkommt, unterscheidet.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden durch die Arbeitsgruppe zwei *yeast two-hybrid screenings* mit einer humanen Leukozytengenbank durchgeführt. Leukozyten stellen eine inhomoge Gruppe von Blutzellen dar, die unter anderem T-Helferzellen beinhaltet, die eine tragende Rolle bei der Infektion mit HIV einnehmen (Hazenberg *et al.*, 2000). Um speziell nach putativen Interaktionspartnern der ISU-Domäne zu suchen wurde zum einen pGBKT7  $\Delta$ NHR als *bait* eingesetzt. Dieses Konstrukt umfasst nur den  $\Delta$ NHR-Bereich mit der ISU-Domäne. In einem weiteren *screen* kam das pGBKT7  $\Delta$ rgp-Konstrukt als *bait* zum Einsatz. Es umfasst die Bereiche  $\Delta$ NHR mit ISU-Domäne, den Cys-Loop und den CHR-Bereich, da nicht bekannt war wie sich die Proteine in der Hefe verhalten würden und eine möglichst richtige Faltung zu gewährleisten (Abb. 5.5). Aufgrund der Charakterisierung der ISU-Domäne fehlte bei beiden Konstrukten das Fusionspeptid (FP), das Epitop 1 (E1), der Transmembranbereich (TM) und der cytoplasmatische Bereich, da diese vermutlich keine tragende Rolle bei der Immunsuppression spielen (Denner *et al.*, 1994). Viele, vor allem saure Proteine können, wenn sie an die DNA-Bindungsdomäne fusioniert sind, bereits von sich aus die Transkription der Reportergene aktivieren (Ma und Ptashne, 1987), was zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Dies konnte bereits durch einen Autoreaktivitätstest vor dem *yeast two-hybrid screening* ausgeschlossen werden. Im  $\Delta$ NHR-*screen* wurden 122 Klone vereinzelt und anschließend einem X- $\alpha$ -Gal-Test unterzogen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde anschließend mit den 82 X- $\alpha$ -Gal-positiv getesteten Klonen aus diesem *screen* weitergearbeitet, da diese als putative Interaktionspartner der ISU-Domäne in Betracht kamen.

Von diesen konnten 75 in der Hefe kultiviert werden. Nach anschließender Aufreinigung der DNA schloss sich eine Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  an. Eine Selektion auf prey-Plasmide

erfolgte aufgrund der Ampicillin-Resistenz des Vektors pACT2, in den die putativen Interaktionspartner, in diesem Fall eine humane Leukozytengenbank, inkloniert wurde. Da Hefen auch mehrere Plasmide und Bakterien nur ein Plasmid aufnehmen können wurden von den angewachsenen Klonen max. 3 gepickt und mittels PCR auf ihre Übereinstimmung untereinander kontrolliert. Bei Unterschieden wurden mehrere Proben weitergeführt. Anschließend erfolgte eine Kotransformation in *S. cerevisiae* AH109. Hierbei wurden die Konstrukte pGBKT7  $\Delta$ NHR, pGBKT7  $\Delta$ rgp und als Kontrolle pGBKT7 leer als bait eingesetzt. Insgesamt wuchsen Hefekolonien von 59 Klonen auf den Selektiv-Platten an, wovon sich 44 in einem X- $\alpha$ -Gal-Test blau verfärbten und anschließend sequenziert wurden (Tab. 5.1).

Da das Konstrukt  $\Delta$ rgp das Konstrukt  $\Delta$ NHR vom Grundaufbau beinhaltet, war zu erwarten, dass bei einer Interaktion mit  $\Delta$ NHR auch eine Interaktion mit  $\Delta$ rgp bestände. Bei insgesamt 26 der Proben erfolgte eine Interaktion mit beiden Konstrukten. Jedoch wiesen acht Proben nur eine Interaktion mit  $\Delta$ rgp auf, obwohl das *screening* zu Beginn der Arbeit mit dem  $\Delta$ NHR-Konstrukt erfolgte. Wodurch beispielsweise Probe 58(1), der eukaryotische Initiationsfaktor 3 (UE3) oder Probe 108(1), das MAX Dimerisationsprotein 1 ausgeschlossen werden konnten. Des Weiteren interagierten fünf Proben nur mit  $\Delta$ NHR und nicht mit  $\Delta$ rgp, wobei Probe 102 (1), ein offenes Leseraster auf Chromosom 5 oder Probe 40(2), die zu keinem Sequenzierungsergebnis führte, ausgeschlossen werden konnten. Bei einer Analyse mittels der *yeast two-hybrid* Methode kann es zu einer Interaktion zwischen Proteinen kommen, die aufgrund des Zellzyklus, der Zellorganelle oder des Zelltyps nicht zum gleichen Zeitpunkt auftreten und somit keine Interaktionspartner sein können. Weiterhin können durch Konformationsänderungen des Konstruktes während der *yeast two-hybrid* Analyse Bindungsstellen frei, verdeckt oder gebildet werden, die so eine falsch positive Bindung ermöglichen. Unter den Ergebnissen befanden sich auch sechs Proben, bei denen ebenfalls eine Interaktion mit dem Leervektor pGBKT7 erfolgte, wie Metallothionein 2A (Probe 13(3)), proteasome maturation protein (Probe 77(1)) oder Phospholipase A2 (Probe 84\*). Des Weiteren konnten nach der Transformation bei einigen Proben nur wenige bis sehr wenige Hefekolonien beobachtet werden, wie bei den Proben 14(2), 73(1) oder 74\*, was dafür spricht, dass wahrscheinlich keine Interaktion zwischen diesen Proteinen stattfindet. Proben, wie 66(2), 71(3) oder 74\*, des x- $\alpha$ -Gal-Tests, die nach einem Zeitraum größer drei Stunden eine Blaufärbung zeigten waren als schwach signifikant einzustufen.

Durch die folgende Sequenzierung wurde weiterhin nach sinnvollen putativen Interaktionspartnern selektiert. Diese wiesen eine Interaktion mit  $\Delta$ NHR und  $\Delta$ rgp auf und zeigten eine signifikante Blaufärbung im x- $\alpha$ -Gal-Test. Da vorrangig nach einem transmembranen Protein gesucht wurde, entfielen bei der Auswahl für weitere verifizierende Interaktionsanalysen, ebenfalls Enzyme, Untereinheiten (UE) oder Faktoren die bei der

Transkription eine Rolle spielen, oder Proteine, die für andere zelluläre Vorgänge dienen. Diese Faktoren werden häufig durch die Kernlokalisierung der *yeast two-hybrid* Analyse detektiert. In diesem Zusammenhang wurde anschließend aus den putativen Interaktionspartnern des *screenings* mit  $\Delta$ NHR der triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) für weitere Verifizierungsanalysen ausgewählt. Zum einen ist TREM-1 ein Oberflächenrezeptor, der vor allem auf Neutrophilen und Monocyten exprimiert wird und daher eine Rolle in der Immunantwort spielt. Neben der Lokalisation wurde TREM-1 bereits in einer Microarray-Analyse der AG Denner detektiert. Hierbei wurde unter anderem ein Heteropolymer aus HIV-ISU und MULV-ISU sowie ein rekombinantes TM-Protein von HERV-K mit humanen PBMCs inkubiert. Mittels Microarray Analyse erfolgte die Messung der Expression von insgesamt 29 098 Genen. Neben mehreren Zytokinen, wie IL-6, IL-8 und IL-1 $\beta$ , und der Metalloproteinase 1 (MMP-1) wurde unter anderem auch die Expression von TREM-1 im Vergleich mit ein Inkubation mit Medium hochreguliert, was auf eine mögliche Interaktion zwischen TREM-1 und dem ISU-Peptid deuten könnte. Ferner konnte eine Regulierung der TREM-2 Expression detektiert werden. Im folgenden Abschnitt (siehe 6.2) wird ausführlich auf TREM-1 eingegangen und diskutiert.

Neben TREM-1 wurden noch weitere putative Interaktionspartner identifiziert, mit denen jedoch keine weiteren Versuche im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführt wurden. Zum einen wurden STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6, Probe 1(2)) und RABEP2 (rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 2, Probe 19(1)) sowohl in dem  $\Delta$ NHR-*screening* als auch in dem  $\Delta$ rgp-*screening* detektiert. STAT6 ist im Zytosol der Zelle lokalisiert und spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von IL-4 vermittelten Prozessen (Takeda *et al.*, 1996). Es erhöht die Expression von BCL2L1, welches für den anti-apoptotischen Effekt von IL-4 verantwortlich ist. Ferner deuteten Studien in knock-out Mäusen an, dass STAT6 eine Rolle bei der Differenzierung von TH2-Zellen (Takatori *et al.*, 2005), der Expression von Oberflächenmarkern und beim Klassenwechsel von Immunglobulinen spielt. Da noch unklar ist, wie der genaue Fusionsmechanismus abläuft, könnte es bei einer Aufnahme des ganzen Virus somit zu einer Interaktion kommen. Durch eine Beeinflussung des STAT6-Signalweges kann es zu einem Ungleichgewicht der TH1- und TH2- Zytokinproduktion kommen. Es wird davon ausgegangen, dass dieses Ungleichgewicht mit der Progression von vielen Infektionskrankheiten korreliert (Faxvaag *et al.*, 1995; Clerici *et al.*, 1994, 1997). RABEP2 ist ein Effektor der Rab GTPasen, welche eine Rolle für die spezifische Fusion von Membranen, für die Vesikelbildung und den gerichteten Vesikeltransport spielen. Durch eine Interaktion von gp41 und RABEP2 können die Transportfunktionen innerhalb der Wirtszelle der regulatorischen Rab-GTPasen beeinflusst werden. In dem *screening* mit  $\Delta$ rgp konnte HLA-C (human leukocyte antigene C)

und Lamp-1 (lysosome-associated membrane glycoprotein 1) detektiert werden. HLA-C ist der MHC-Klasse I zugehörig und nahe TREM-1 auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert.<sup>4</sup> Es wird annähernd auf fast allen Zellen expremiert und dient zur Bindung und Präsentation von intrazellulären Antigenen auf der Zelloberfläche an CTLs (Sidney *et al.*, 2008). Durch Bindung an gp41 könnten Viren sich den Rezeptor-ähnlichen Funktionen der MHC-Klasse Molekülen annehmen, um so Zellen zu infizieren. Des Weiteren könnte durch eine Interaktion verhindert werden, dass HLA-C durch CTLs erkannt wird und die weitere Immunreaktion unterbunden wird. Ferner könnte HLA-C gp41 als körpereigenes Antigen präsentieren, sodass befallene Zellen vom Immunsystem toleriert werden. Diese putative Interaktion wird zurzeit intensiv in der AG Denner untersucht. Lamp-1 ist ein lysosomales Markerprotein, das auf Lymphozyten expremiert wird und dessen Funktion bisher noch unbekannt ist (Sarafian und Marinova, 2006).

Weniger etablierte Alternativen zum *yeast two-hybrid* System sind das Split-Ubiquitin System (Johnsson und Varshavsky, 1994) und das Ras recruitment System (Broder *et al.*, 1998). Beide können in modifizierter Form auch für das *Screening* von Membranprotein-Interaktionen eingesetzt werden (Stagljar *et al.*, 1998; Hubsman *et al.*, 2001; Stagljar und Fields, 2002).

Parallel zur Analyse wurde versucht, die Konstrukte CHR und rgp in den Vektor pGBKT7 zu klonieren, um diese in folgenden *yeast two-hybrid* Analysen als bait einzusetzen. Das CHR-Konstrukt beinhaltet hierbei nur den C-terminalen heptad repeat mit E2 und das rgp-Konstrukt weist die Bereiche E1 – NHR – Cys-Loop – CHR – E2 auf. Nach mehrmaliger Versuchsoptimierung blieb der Klonierungsversuch für CHR erfolglos, jedoch konnte durch einen Austausch der Primer und der Restriktionsschnittstellen eine erfolgreiche Klonierung von rgp in pGBKT7 erreicht werden.

## 6.2 *Triggering receptor expressed on myeloid cells* (TREM)

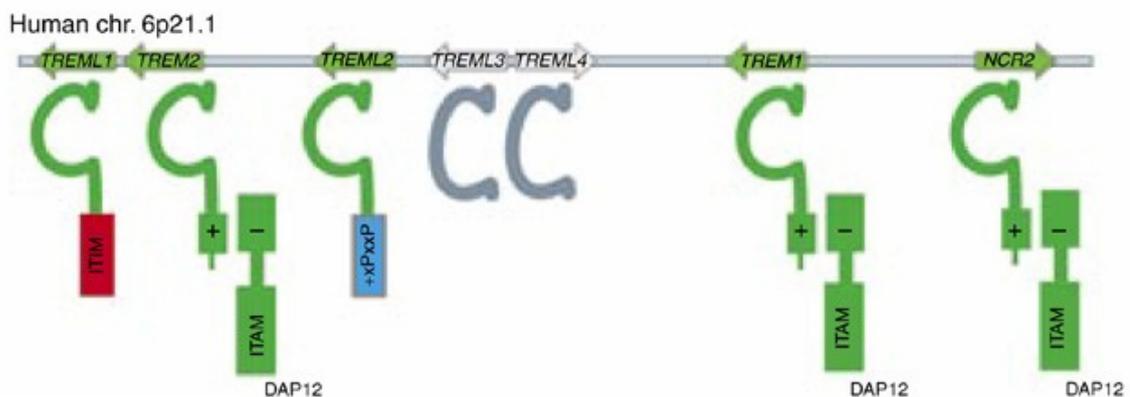
TREM-Proteine sind Zelloberflächenrezeptoren und werden auf Granulocyten, Monocyten (Bouchon *et al.*, 2000), Makrophagen (Daws *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002; Gordon und Taylor, 2005), Mikroglia (Schmid *et al.*, 2002; Sessa *et al.*, 2004), Dendritischen Zellen (Bouchon *et al.*, 2001), Osteoklasten (Paloneva *et al.*, 2002) und Blutplättchen (Washington *et al.*, 2002) expremiert. Die zur Immunglobulin-Superfamilie gehörigen TREMs besitzen

---

<sup>4</sup> [http://www.genenames.org/data/hgnc\\_data.php?match=HLA-C](http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?match=HLA-C)

sowohl aktivierende als auch inhibitorische Formen, die bei der Regulation der Aktivierung und Differenzierung von myeloiden Zellen wirken (Allock *et al.*, 2003).

Der nächste Verwandte von TREM ist NKp44 (*activating receptor expressed on natural killer cells*), ein Aktivator für natürliche Killerzellen (Cantoni *et al.*, 1999). Auf der Suche nach Homologen von NKp44 in einer EST (*expressed sequence tag*)-Datenbank wurden cDNA-Fragmente, die Mitglieder der TREM-Familie kodieren, entdeckt (Bouchon *et al.*, 2000). Die für TREMs kodierenden Gene sind zusammen mit NKp44 (kodiert durch NCR2) auf Chromosom 6p21.1 in einem Cluster organisiert und eng mit dem MHC (*major histocompatibility complex*) gekoppelt (Allock *et al.*, 2003; Abb. 6.1). In dem humanen Cluster befinden sich die Gene für TREM-1 und TREM-2 und für vier *trem-like transcripts* (TLT-1-4), wobei TLT-3 und TLT-4 sogenannte Pseudogene ohne Proteinexpression sind (*reviewed in* Klesney-Tait *et al.*, 2006). Alle Proteine besitzen strukturelle Ähnlichkeiten, weisen jedoch eine geringe Homologie bezüglich ihrer Aminosäuresequenz auf (Bouchon *et al.*, 2001). Orthologe von TREM wurden auch in Mäusen auf Chromosom 17C3 sowie in Hühnern, Rochen, Schweinen und Rindern gefunden (Viertlboeck *et al.*, 2006; Ramanathan *et al.*, 2004; Cannon *et al.*, 2006). Dies deutet auf eine starke Konservierung in der Evolution hin.

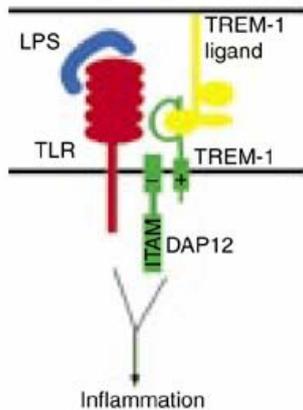


**Abbildung 6.1 Schematische Darstellung des TREM-Gen-Clusters (Klesney-Tait *et al.*, 2006).**

Mitglieder der TREM-Familie sind in einem Gen-Cluster auf dem menschlichen Chromosom 6p21.1 lokalisiert. Neben TREM-1 und TREM-2, gibt es vier *trem-like transcripts*, wobei TLT-3 und TLT-4 Pseudogene ohne eine Proteinexpression sind. Nahe des Gen-Clusters ist das Gen NCR2, welches für NKp44 kodiert lokalisiert. Die Signalweiterleitung bei TREM-1 und TREM-2 erfolgt über DAP12, welches ein ITAM-Motiv aufweist.

TREM-1 ist vor allem auf Neutrophilen und Monozyten (Gewebemakrophagen) lokalisiert und löst die Sekretion von proinflammatorischen Chemo- und Zytokinen aus und verstärkt die inflammatorische Antwort auf Bakterientoxine (Bouchon *et al.*, 2000, 2001; Bleharski *et al.*, 2003). Das 234 Aminosäuren lange TREM-1 beginnt mit einer Ektodomäne, die dem

Immunglobulin V-Typ gleicht und drei potentielle Glycosylierungsstellen besitzt. An diese schließt sich ein Transmembranbereich an, der einen geladenen Lysinrest aufweist und ein zytoplasmatischer Schwanz ohne jegliche Signalfunktion (Bouchon *et al.*, 2000; Abb. 6.2).



**Abbildung 6.2 Lokalisation von TREM-1 (Klesney-Tait *et al.*, 2006).**

Struktur- und Sequenzvergleiche zeigten einen hochkonservierten Bereich in den TREM-Strukturen im Immunglobulinbereich auf, der vermutlich als Ligand-Bindestelle dient (Gattis *et al.*, 2006). TREM-1 ist ein 30 kDa großes Glykoprotein, dessen Größe durch Deglykolysierung auf 26 kDa reduziert wird (Bouchon *et al.*, 2000). TREM-1 ist ein wichtiges direktes Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität (Bleharski *et al.*, 2003). Bouchon *et al.* demonstrierten, dass bei einer Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) und anderen mikrobiellen Produkten die TREM-1 Expression hochreguliert wird (Bouchon *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte veranschaulicht werden, dass TREM-1 bei einer LPS-Stimulation synergistisch mit PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), wie TLR (*Toll-like receptors*) oder *Nod-like receptors* zusammenarbeitet, was zu einer effektiveren und verstärkten Immunantwort führt (Bouchon *et al.*, 2001; Netea *et al.*, 2006). Die Bindung von TREM-1 führt zu einer gesteigerten Produktion der Myeloperoxidase (MPO), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und des *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) (Bouchon *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 2007).

Darüber hinaus zeigten Studien mit Mäusemodellen des Septischen Schocks, dass die Zytokinproduktion und die Lethalität der Mäuse durch Gabe eines löslichen TREM-1-Ig Fusionsprotein (Bouchon *et al.*, 2001) oder ein synthetisches antagonistisches Peptid (Gibot *et al.*, 2004) vermindert werden konnte. Infolge dessen wurde TREM-1 als ein Mediator des Septischen Schocks einbezogen, welcher durch eine erhöhte inflammatorische Reaktion verursacht wird (Cohen *et al.*, 2001; Nathan und Ding, 2001). Ferner induziert eine bakterielle Sepsis die Abgabe einer löslichen Form von TREM-1 (sTREM-1, *soluble* TREM-1) in Menschen und Mäusemodellen. Das Serumlevel korreliert hierbei positiv mit dem Überleben (Gibot *et al.*, 2005; Gibot, 2005), was daraufhin deutet, dass sTREM-1 einen antagonistischen Effekt besitzt.

Zur Entstehung sTREM-1 gibt es zwei verschiedene Hypothesen. Zum einen könnte es durch die Transkription einer weiteren Splice-Variante entstehen. Zum anderen durch *shedding* von der Oberfläche. Zum Beleg der ersten Hypothese wurde bereits eine zweite

TREM-1 mRNA Splice-Variante in humanen Monozyten detektiert (Gingras *et al.*, 2002), dessen exprimiertes Protein etwa eine Größe von 17,5 kDa aufweist und keinen Transmembranbereich und zytoplasmatischen Schwanz besitzt (Abb. 6.3). Des Weiteren konnten mögliche Transkripte von löslichen Formen anderer TREM-Mitglieder identifiziert werden (Schmid *et al.*, 2002; Gattis *et al.*, 2006). Andererseits konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition von Metalloproteasen, die Stabilität von TREM-1 auf der Zelloberfläche erhöht wird und es zu einer Reduktion der sTREM-1 Form in Monozyten und Neutrophilen führt, die zuvor mit LPS stimuliert wurden (Gómez-Piña *et al.*, 2007). Des Weiteren wurden in einer Microarray Analyse Gene untersucht die bei einer Stimulation in Kombination mit LPS und TREM-1 hochreguliert wurden. Dabei standen MMP-1 und MMP-10 an 3. bzw. 10. Stelle (Dower *et al.*, 2008). Dies deutet daraufhin, das sTREM-1 durch *shedding* durch eine Matrixmetalloprotease (MMP) von der Oberfläche gebildet wird. Außerdem zeigten Immunoblot-Analysen von LPS-stimulierten Monozyt-Überständen, das sTREM-1 ein Molekulargewicht von 27 kDa (Gibot *et al.*, 2004) aufweist, welches wesentlich höher liegt, als die 17,5 kDa des Transkripts der Splice-Variante. TREM-1 und sTREM-1 besitzen 437 bp langen identischen Bereich, der unter anderem die Rezeptorbindestelle aufweist. Der detektierte Bereich von Klon 95 in der *yeast two-hybrid* Analyse umfasste ebenfalls diesen Bereich, sodass eine Interaktion zwischen TREM-1 und der gp41 Ektodomäne möglich wäre. Allerdings besitzen beide Formen einen unterschiedlichen Rest, der bei sTREM-1 13 bp und bei 268 bp beträgt (Abb. 6.3). Dieser Rest lässt sich jedoch schlecht durch einfaches *shedding* von der Zelloberfläche oder durch eine alternative mRNA Splice-Variante erklären.

#### Klon 95 (198 bp)

MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLQDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRGEMPKTL  
 ACTERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLL

#### TREM-1 (705 bp, 26,4 kDa)

MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLQDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRGEMPKTL  
 ACTERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTK  
 GFSGTPGSNENSTQNVYKIPPTTTKALCPLYTSRPTVTQAPPKSTADVSTPDSEINLTNVTDIIRVPVF  
 NIVILLAGGFLSKSLVFSVLFVTLRSFVP

#### sTREM-1 (450 bp, 17,5 kDa)

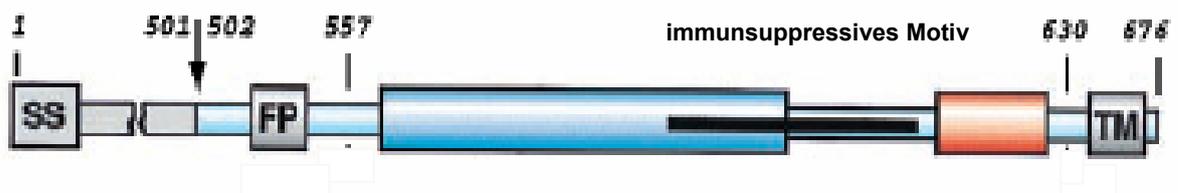
MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLQDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRGEMPKTL  
 ACTERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTK  
 GFRCSLTSFSLVDS

#### Abbildung 6.3 Sequenzvergleich zwischen Klon 95, TREM-1 und sTREM-1.

Gelb unterlegt ist die identische Sequenz von Klon 95, TREM-1 und sTREM-1. Blau bzw. Rot unterlegt sind die unterschiedlichen Reste von TREM-1 und sTREM-1.

Bei der Signalweiterleitung bildet TREM-1 über den geladenen Rest im Transmembranbereich einen Komplex mit DAP12 (DNAX *activation protein of 12 kDa*; Bouchon *et al.*, 2000, 2001), dessen zytoplasmatischer Teil aus einem ITAM-Motiv (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) besteht. Dieses wird anschließend phosphoryliert wodurch die Bindung der Tyrosinkinase Syk ermöglicht wird und es so zu einer Aktivierung der weiteren Signalkaskade kommt (Tessarz und Cerwenka; 2008). Die TREM-1 Expression in Makrophagen wird auf dem Transkriptionslevel durch *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) und PU.1, ein Transkriptionsfaktor, reguliert (Zeng *et al.*, 2007). Eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfolgt durch LPS, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . PU.1 dient zur Regulierung der Gene, die in bei einer Makrophagenantwort auf LPS involviert sind.

Die Natur von TREM-1 Liganden ist bisher noch nicht geklärt. Es wurde postuliert das TREM-1 lösliche Proteine oder Oberflächenproteine erkennt, die als ein Ergebnis der Inflammation und/oder Gewebeschädigung hochreguliert werden (Colonna *et al.*, 2003). Vor kurzem konnte durch Haselmayer *et al.* ein TREM-1 Ligand auf der Zelloberfläche von ruhenden Blutplättchen detektiert werden. In dieser Studie konnten *respiratory burst* und IL-8 Produktion von Neutrophilen, die in Anwesenheit von mikrobiellen Produkten durch Blutplättchen induziert wurden, durch eine Blockierung von TREM-1 inhibiert werden (Haselmayer *et al.*, 2007). Abseits von Liganden, die an der Zelloberfläche exprimiert werden, konnte auch für Pathogene eine Aktivierung des TREM-1 vermittelten Signalwegs gezeigt werden. In diesem Zusammenhang konnte eine Aktivierung von TREM-1 auf Neutrophilen bei einer Filovirus Exposition beobachtet werden. Des Weiteren konnte die Zytokinproduktion, die durch das Marburg- und Ebola-Virus ausgelöst wurden, durch die Blockade von TREM-1 inhibiert werden (Mohamadzadeh *et al.*, 2006). Das Marburg und Ebola-Virus sind Mitglieder der *Filoviridae* und können in Primaten hämorrhagisches Fieber auslösen. Eine Virus vermittelte disregulierte angeborene Immunität scheint der Mechanismus für den Krankheitsverlauf zu sein. Das Ebola-Virus besitzt, ähnlich wie HIV ein Oberflächenglykoprotein, dass ein immunsuppressives Motiv aufweist (siehe Abbildung 6.4).



**Abbildung 6.4 Vorläuferpeptid von GP1 und GP2 des Ebola-Viruses (Malashkevich *et al.*, 1999).**

Die Glykoproteine GP1 und GP2 in Ebola werden aus einem gemeinsamen Vorläuferpeptid gespalten. FP = Fusionspeptid, TM = Transmembranbereich. Schwarz hervorgehoben ist das Immunsuppressive Motiv in GP2.

Während TREM-1 hauptsächlich eine Rolle in der Granulozyten- und Monozytenantwort einnimmt, kontrolliert TREM-2 die Funktion von weiteren myeloiden Zellen wie von DCs, Osteoklasten und Mikrogliazellen (reviewed in Klesney-Tait *et al.*, 2006). Humanes TREM-2 wird an der Oberfläche von unreifen dendritischen Zellen und Makrophagen expremiert, wohingegen die TREM-2 Expression in aktivierten dendritischen Zellen herunterreguliert wird (Bouchon *et al.*, 2001). Ferner konnte gezeigt werden das TREM-2 bei einer LPS Stimulation im Gegensatz zu TREM-1 herunterreguliert wird (Bouchon *et al.*, 2001; Turnbull *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die TREM-2 mRNA nach LPS Stimulation ansteigt und die TREM-2 Regulierung daher auf dem Protein oder mRNA Level erfolgt (Schmid *et al.*, 2002; Begum *et al.*, 2004). Diese scheinbar entgegengesetzte Expression von TREM-1 und TREM-2 konnte auch in der Microarray Analyse der Arbeitsgruppe gezeigt werden. Hierbei wurde humane PBMCs mit einem ISU-Heteropolymer von HIV-1 und MULV bzw. dem TM-Protein von HERV-K inkubiert und es konnte eine Hochregulierung der TREM-1 und eine Senkung der TREM-2 Expression gezeigt werden.

TREM-1 ist ein erst seit kurzem bekanntes Protein, seither ist nur wenig Grundlagenforschung betrieben wurden. Viele Studien beschäftigen sich vor allem mit den Auswirkungen von TREM-1 und werden auf der mRNA Ebene durchgeführt. Bisher konnten weder für die Ektodomäne von gp41 noch für TREM-1 Interaktionspartner identifiziert werden. Durch mikrobielle Produkte wird eine TREM-1 Expression erhöht und so eine Ausschüttung von Zytokinen wie IL1 $\beta$ , IL-8, IL-6 und TNF- $\alpha$  angeregt, die zu einer Verstärkung der proinflammatorischen Immunantwort führen. Durch eine Bindung der gp41 Ektodomäne mit TREM-1 könnte es zu einer Multimerisierung von TREM-1 an der Bindestelle kommen und damit der TREM-1 Signalweg unterbunden werden bzw. auf einem konstanten Level gehalten werden. So könnte eine proinflammatorische Reaktion vermindert, reguliert oder gestoppt werden. Das Virus könnte durch eine Abmilderung der Entzündungsreaktion leichter und effektiver neue Zellen infizieren und sich damit im Körper ausbreiten. Weitere Versuche der Arbeitsgruppe unterstützen diese Hypothese. So konnte in *one step RT real time* PCR Analysen gezeigt werden, dass bei einer Inkubation von humanen PBMCs mit einem ISU-Homopolymer von HIV-1 TREM-1 nicht herunterreguliert wurde. Vielmehr wurde die TREM-1 Expression auf einem gleichmäßigen Level gehalten. Hingegen konnte bei einer Inkubation mit Medium und randomisierten ISU-Peptid eine kontinuierliche Senkung von TREM-1 verzeichnet werden. Dies könnte darauf deuten, dass die ISU-Domäne von gp41 durch eine Bindung an TREM-1 für eine stetige und normale Expression sorgt, sodass es zu keiner verstärkten Entzündungsreaktion kommt und damit keine Virusverbreitung erleichtert wird.

Ein ganz anderer Verlauf verfolgt die Möglichkeit, dass eine Bindung von TREM-1 und die verstärkte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen die Entstehung einer Immunsuppression unterstützt. So induzieren vor allem proinflammatorische Zytokine eine IL-10 Produktion, durch eine stete Aufrechterhaltung der TREM-1 Expression auf einem konstanten Level durch die Bindung an die ISU-Domäne von gp41, könnte es so kontinuierlich zu einem Anstieg der IL-10 Konzentration kommen. IL-10 spielt eine kritische Schlüsselrolle bei der Suppression der Immunität (Howard *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1993, 2001). Ferner konnten bei HIV-positiven Patienten erhöhte IL-10 Werte nachgewiesen werden. IL-10 begünstigt die T<sub>H</sub>2-Antwort und hemmt eine T<sub>H</sub>1-Zytokinausschüttung, des Weiteren werden die Expression von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  und die Bildung von Makrophagen bzw. DCs supprimiert. In weiteren *one step RT real time* PCR Analysen der Arbeitsgruppe wurde ebenfalls die IL-10 und MMP-1 Expression untersucht. Hierbei konnte bei der Inkubation von PBMCs mit einem HIV-ISU-Homopolymer nach kurzer Zeit ein deutlicher Anstieg der IL-10 Expression verzeichnet werden. Ferner wurde Zeit versetzt ein Anstieg der MMP-1 Expression detektiert, was auf eine mögliche Korrelation zwischen IL-10 und MMP-1 deuten könnte. Sodass IL-10 neben der Immunsuppression aktivierend auf MMPs wirkt. MMPs werden dafür verantwortlich gemacht TREM-1 von der Oberfläche zu *shedden*, sodass eine lösliche Form von TREM-1 entsteht.

In durchgeführten ELISAs (*enzyme linked immunosorbent assay*) der Arbeitsgruppe konnte ebenfalls ein geringer Anstieg von sTREM-1 im Überstand der inkubierten PBMCs detektiert werden. Durch die kontinuierliche TREM-1 Expression könnte sich sTREM-1 aufgrund des *shedding* langsam im Überstand ansammeln. Der Expressionsanstieg von MMP-1 konnte ebenfalls in weiteren ELISAs gezeigt werden und so die Ergebnisse aus vorangegeanegen *real time* Analysen und Microarrays bestätigen. Verschiedene Studien in Mausmodellen in Bezug auf sTREM-1 legten den Verdacht nahe, dass TREM-1 mit chronischen infektiösen inflammatorischen Prozessen verlinkt ist (Gibot *et al.*, 2004; Nochi *et al.*, 2003).

Durch die Bindung von gp41 und TREM-1 könnte eine kontinuierlich konstante TREM-1 Expression entstehen. Die damit verbundene stetige Zytokinausschüttung könnte zu einer Dysregulierung der Zytokinproduktion führen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das CSK-17 Peptid und vermutlich auch das ISU-Peptid von HIV-1 einen bedeutenden Einfluss auf die Dysregulierung der Zytokinproduktion besitzt (Naito *et al.*, 2003; Kedzierska *et al.*, 2001, 2003). Ferner korreliert ein Ungleichgewicht bei der Produktion von Typ 1- und Typ 2-Zytokinen mit der Progression vieler Infektionskrankheiten (Faxvaag *et al.*, 1995; Clerici *et al.*, 1994, 1997).

In dieser Arbeit wurden mittels der *yeast two-hybrid* Analyse nur die ersten 198 bp als TREM-1 Ligand detektiert. Da allerdings TREM-1 und sTREM-1 dahingehend eine identische Sequenz aufweisen, kann nicht eindeutig festgestellt werden, mit welchem Protein gp41 eine putative Interaktion eingeht. Jedoch konnte mittels PCR festgestellt werden (Abb. 5.9a), dass sich TREM-1 in der eingesetzten Leukozytenbank befand. Das Vorhandensein von sTREM-1 wurde jedoch nicht ausgeschlossen. Von sTREM-1 abgeleitete Peptide eines kurzen hochkonservierten Bereiches bewahrte Mäuse mit Sepsis vor dem Tod. Dies deutet auf eine Abmilderung der Zytokinproduktion hin, die durch eine Bindung von gp41 mit sTREM-1 ebenfalls hervorgerufen werden könnte.

### 6.3 Klonierung und Expression von Deletionsmutanten der gp41 Ektodomäne

Um die Interaktion zwischen der gp41 Ektodomäne und TREM-1 weiter verifizieren zu können, sollten im weiteren Verlauf *GST-pull down* Analysen durchgeführt werden. Hierbei wurden zunächst acht verschiedene gp41-Deletionsmutanten mittels PCR aus einem vorliegenden Konstrukt, welches annähernd die komplette gp41 Ektodomäne enthielt, amplifiziert, um den möglichen Interaktionsraum gut eingrenzen zu können. Die hydrophoben Bereiche der gp41 Ektodomäne sind nur schwer löslich, daher wurde pro Deletionsmutante, außer  $\Delta$ rgp $\Delta$  und rgp $\Delta$ , jeweils ein identisches Konstrukt mit vier zusätzlichen Lysinen hergestellt. Kato *et al.* konnten zeigen, dass das Anhängen eines kurzen Peptid-Tags beispielsweise aus Lysinen zu einer Erhöhung der Löslichkeit des jeweiligen Proteins führt (Kato *et al.*, 2006). Um dabei eine Konformationsänderung der Deletionsmutante auszuschließen, wurde das Originalkonstrukt ebenfalls mitgeführt (Abb. 5.1).

Die amplifizierten Konstrukte wurden über verschiedene Kombinationen von Restriktionsenzymen in den Vektor pGexKG inkloniert. Dieser Vektor enthält vor der MCS einen 26 kDa großen Glutathion S-Transferase-Tag (GST-Tag), der an Glutathion binden kann, und besitzt anschließend eine Thrombinschnittstelle, um das Tag von gewonnenen Protein abzutrennen. Folgend wurden die Konstrukte in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert.

Es gibt eine große Anzahl verschiedener Expressionssysteme, die nach dem Wirt unterschieden werden. So können beispielsweise Bakterien, Hefen, Insekten- oder Säugerzellen als Wirt dienen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem bakteriellen Expressionssystem gearbeitet. Bakterien sind unter anderem einfach kultivierbar, wachsen schnell und besitzen eine hohe Transformationseffizienz. Zudem sind sie leicht manipulierbar

und im Vergleich zu Säugetierzellen kostengünstiger in der Haltung. Allerdings birgt dieses System auch Nachteile. Bakterien führen keine Modifizierungen wie Glykosylierungen oder Methylierungen durch und besitzen keine Chaperone, die bei der Faltung helfen. Sind diese jedoch für die Aktivität des Proteins notwendig, akkumulieren sich fehlgefaltete Proteine in *inclusion bodies* im Zytosol. Der hier verwendete *E. coli* Stamm BL21 basiert auf dem Promotorsystem des Bakteriophagen T7, der durch die lac-Gene reguliert und durch IPTG induziert wird. Außerdem ist dieser Proteasedefizient, sodass GST durch *E. coli* nicht abgebaut wird.

Neben IPTG können Zucker-induzierbare Systeme, wie Arabinose oder Rhamnose, oder das Tet-System, welches auf Anhydrotetrazyklin basiert, eingesetzt werden. Abgesehen von *inducer* Systemen gibt es auch temperatursensitive Systeme, wie das PL-System, das bei einem Temperaturumsprung auf 42°C induziert. Des Weiteren wurden auch verschiedene *E. coli* Stämme entwickelt, die andere Probleme beheben können. Beispielsweise enthält der Stamm Rosetta das pRARE Plasmid, das für tRNAs kodiert, die selten in *E. coli* auftauchen. Sie erhöhen die Proteinexpression, die andernfalls durch das Codon limitiert wird (Novy *et al.*, 2001). Alternativen zu *E. coli* sind Baculovirus- und Hefeexpressionssysteme. Die als Wirtsorganismus für Baculoviren eingesetzten Insektenzellen sind leicht zu kultivieren und posttranslationale Modifikationen ähneln denen eukaryotischer Zellen. Allerdings ist die Herstellung eines rekombinanten Baculovirus zeitintensiv. Bei den Hefesystemen kommt vor allem *Hansenula polymorpha* oder *Pichia pastoris* zum Einsatz.

Nach der Transformation in den Bakterienstamm wurden nun in einem kleineren Versuchsansatz die optimalen Induktionsbedingungen ermittelt (siehe Tabelle 5.3). Dabei wurden vier verschiedene Temperaturen und vier verschiedene IPTG-Konzentrationen bei einer Induktionszeit von drei Stunden getestet, um in einem folgenden größeren Ansatz eine möglichst Große Proteinausbeute zu erhalten. Konnte hierbei noch keine guten Expressionsbedingungen ermittelt werden wurde die ebenfalls die Induktionszeit optimiert oder weitere Temperaturen ausgetestet. Die optimalen Bedingungen sind hierbei Tabelle 5.3 zu entnehmen. Wie in Abbildung 5.7 ersichtlich konnte hierbei zumeist eine größere Proteinexpression bei dem jeweiligen Konstrukt mit den vier Lysinen verzeichnet werden, was beispielsweise an dem Protein GST- $\Delta$ rgp 4K und GST-CHR 4K zu erkennen ist. Bei den Fusionsproteinen GST-NHR, GST- $\Delta$ NHR und GST-plusNHR konnte nur Abbau verzeichnet werden, hierbei konnten allerdings die Konstrukte mit den vier Lysinen gut exprimiert werden. Des Weiteren war nur eine geringe Expression, dafür ein starker Abbau bei den Fusionsproteinen GST-rgp $\Delta$  und GST- $\Delta$ rgp $\Delta$  festzustellen. Dies wurde anhand einer deutlichen Bande in Höhe des GST-Proteins (26 kDa) gezeigt.

## 6.4 Detektion und Überexpression von TREM-1 in verschiedenen Zellen

In den folgenden *pull down* Analysen werden Zellysate zur Inkubation mit den gekoppelten Proteinen eingesetzt. Vorab muss daher gewährleistet sein, dass sich in den entsprechenden Lysaten TREM-1 enthalten ist. Daher wurden die verschiedenen Zellysate P14, P100 und S100 durch die Zytosol-Membran-Fraktionierung hergestellt. Des Weiteren wurden die Gesamtzellysate 293T-IPA, 293T-RIPA und 293T-PP durch die Transfektion von unterschiedlichen Zellen gewonnen. Im diesem Zusammenhang konnte in keinen der Zellysate TREM-1 detektiert werden. Auch in der käuflich erworbenen Positiv-Kontrolle (THP1 Cell Lysate: sc-2238) der Firma Santa Cruz und der selbst hergestellten Positiv-Kontrolle (HL-60-RIPA) laut Angaben der Firma Abnova konnte kein TREM-1 nachgewiesen werden. Es wurden 3 unterschiedliche primäre Antikörper der Firma Santa Cruz verwendet, wobei zwei dieser Antikörper nur durch die Firma vertrieben, jedoch nicht auf ihre Bindung getestet wurden. Ferner wurde ein vierter primärer Antikörper der Firma Santa Cruz verwendet und Versuchsoptimierungen durchgeführt, die jedoch ebenfalls keinen Erfolg zeigten.

Daraufhin wurden Zellen mit zwei unterschiedlichen Methoden transfiziert. Durch das zusätzlich exprimierte Grün-floureszierende Protein konnte mittels Immunfloureszenz die Transfektionseffizienz überprüft werden (siehe Abbildung 5.10). Anhand des Kontrollproteines PMM1 konnte festgestellt werden, dass eine Transfektion mittels Lipofectamine® eine höhere Transfektionseffizienz aufwies, als eine Transfektion mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitation. Bei der TREM-1 Expression konnten bei beiden Transfektionsmethoden nur vereinzelt Grün-floureszierende Zellen detektiert werden. Ferner wiesen diese meist eine veränderte Morphologie auf, wobei die Zellen abgekugelt waren. TREM-1 wurde vorher nicht auf seine Toxizität untersucht, was in Frage stellt, ob hierbei eine schlechte Transfektionseffizienz oder die toxische Wirkung von TREM-1 vorlag. Die normale Morphologie und die noch gut bewachsene Kulturschale legt allerdings eher eine schlechte Transfektionseffizienz nahe. In den daraus gewonnen Gesamtzellysaten (CaCl<sub>2</sub>-24, CaCl<sub>2</sub>-30, Lipo-24 und Lipo-30) konnte ebenfalls kein TREM-1 mittels WB detektiert werden. Hierbei wurde ein weiterer primärer Antikörper der Firma Abnova verwendet.

Parallel zum ersten Blot wurde mit einem HA-Antikörper zur Detektion des ebenfalls vorhandenen HA-Tags im pEGFP-IJ-Vektor gearbeitet. Hierbei konnte eine Expression des Kontrollproteins festgestellt werden, jedoch keine Expression von TREM-1. Dies lässt eine schlechte Transfektionseffizienz von TREM-1 vermuten. Neben einer schlechten Transfektionseffizienz besteht die Möglichkeit, das TREM-1 nur in einem bestimmten Zeitfenster exprimiert wird. Da die Zellysate 24 h und 30 h nach der Transfektion hergestellt

wurden, könnte EGFP-HA-TREM-1 bereits abgebaut worden sein und wäre daher in den gewonnenen Zelllysaten nicht mehr detektierbar. Des Weiteren ist TREM-1 ein erst vor kurzem entdecktes Oberflächenprotein, welches als Verstärker der Inflammation fungiert (Bouchon *et al.*, 2000, 2001; Bleharski *et al.*, 2003). Bisher wurde eher wenig Grundlagenforschung betrieben, sondern die Auswirkungen von TREM-1 untersucht, vor allem basieren viele Studien auf Untersuchungen der RNA-Ebene, sodass nur wenig über TREM-1, seine Eigenschaften und Handhabung bekannt ist.

Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit wurde der AG Denner freundlicherweise von dem Institut für Immunologie in Mainz ein ca. 17,5 kDa großes rekombinantes lösliches TREM-1 (rsTREM-1) und ein weiterer monoklonaler Antikörper zur Verfügung gestellt. In einer folgenden WB-Analyse mit rsTREM-1 konnte gezeigt werden, dass alle genutzten primären Antikörper TREM-1 detektieren können (siehe Abbildung 5.12), was darauf schließen lässt, dass in den Zelllysaten entweder kein TREM-1 enthalten ist oder die TREM-1 Konzentration unter der Nachweisgrenze liegt. In den meisten Studien mit TREM-1 wurden die Zellen mit LPS zur TREM-1 Expression stimuliert und keine unstimulierten Zellen verwendet (Bouchon *et al.*, 2001; Schenk *et al.*, 2005; Gómez-Piña *et al.*, 2007; Dower *et al.*, 2008).

## 6.5 Verifizierung der Interaktionsstudien

Um die Interaktion zweier Proteine verifizieren zu können wurden im Rahmen dieser Arbeit *pull down* Analysen durchgeführt. Da in den Zelllysaten kein TREM-1 detektiert werden konnte, wurde bei folgenden Versuchen das zur Verfügung gestellte rsTREM-1 des Institutes für Immunologie aus Mainz zur Inkubation eingesetzt. Zur Minimierung der nichtspezifischen Bindungen wurden Negativ-Kontrollen, d.h. nur *beads* und GST-Protein, mitgeführt. Bei diesem Versuch wurde, sowohl in den GST-*pull downs* als auch in den *pull down* Analysen mit den Magnetobeads, eine unspezifische Bindung von rsTREM-1 an alle Proben sowie an die mitgeführten Negativ-Kontrollen detektiert, was in Abbildung 5.13a+c ersichtlich ist. Bei einer stabilen Interaktion ist die Dissoziationskonstante zwischen den interagierenden Proteinen sehr gering, deswegen können sie oft und umfangreich mit einer hohen Ionenkonzentration im Puffer gewaschen werden, um so falsch positive Ergebnisse aufgrund nichtspezifischer Bindung zu vermeiden. Daraufhin wurde die Stringenz des Waschpuffers durch Änderung der Salzsorte sowie Erhöhung der Salzkonzentration erhöht und außerdem wurde die Kopplungsdauer vermindert. Es konnte hierbei jedoch keine Verbesserung der unspezifischen Bindung erreicht werden (siehe Abbildung 5.13b). Dieses Problem tritt jedoch häufig bei der Durchführung von *pull down* Analysen auf, sodass eine spezifischere Bindung durch eine weitere Puffer- und Kopplungszeitoptimierung nötig ist. Ferner könnten

überschüssige Bindungen zusätzlich beispielsweise mit Milchpulver oder ähnlichem abgesättigt werden. Des Weiteren könnten ebenfalls andere Methoden, wie beispielsweise die Immunopräzipitation, zur Verifizierung der Protein-Protein Interaktion genutzt werden.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Momentan leben weltweit 33,2 Millionen Menschen mit HIV/AIDS (UNAIDS/WHO, 2007), welche durch eine bislang nicht reversible, tödlich verlaufende Störung der Immunabwehr gekennzeichnet ist. Um effektivere therapeutische und prophylaktische Strategie bieten zu können, muss ein besseres Verständnis für die Pathogenese einer HIV-Infektion geschaffen werden. Bisher ist noch völlig unklar, wie durch eine Infektion mit HIV eine Immunsuppression ausgelöst wird. Es wird davon ausgegangen, dass bei der Fusion von Virus- und Wirtszellmembran durch die Interaktion der gp41 Ektodomäne mit einem noch unbekanntem Rezeptor immunsuppressive Prozesse ausgelöst werden.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit sollten neue putative Interaktionspartner der gp41 Ektodomäne identifiziert werden. Hierbei erfolgte zunächst ein *yeast two-hybrid screening* mit einem Deletionskonstrukt ( $\Delta$ NHR) der gp41 Ektodomäne in einer humanen Leukozytengenbank. Anschließend konnten mit Hilfe einer weiteren *yeast two-hybrid* Analyse, der Nutzung von Selektivmedien, dem X- $\alpha$ -Gal Test und anschließender Sequenzierung, mehrere putative Interaktionspartner identifiziert werden.

Als ein möglicher Bindungspartner in diesem System konnte der *triggering receptor expressed on myeloid cells-1* (TREM-1) identifiziert werden. Die Verifizierung der putativen Interaktion sollte anschließend mittels *GST-pull down* erfolgen. Hierbei wurden zunächst zur Eingrenzung des Interaktionsbereiches mittels Klonierung mehrere gp41 Deletionsmutanten hergestellt und anschließend die optimalen Induktionsbedingungen für eine Expression der GST-Fusionsproteine in Bakterien ermittelt. Durch Zytosol-Membran-Fraktionierung und mehrfach erfolgte transiente Transfektion konnten jedoch keine Zelllysate hergestellt werden, in denen TREM-1 angereichert vorliegt, sodass in den folgenden *pull down* Analysen ein freundlicherweise zur Verfügung gestelltes rekombinantes lösliches TREM-1 zum Einsatz kam. Die Interaktion zwischen der ISU-Domäne der gp41 Ektodomäne und TREM-1 konnte aufgrund einer starken unspezifischen Bindung mittels *pull down* nicht weiter verifiziert werden.

Im Anschluss an diese Arbeit sind daher weitere Optimierungen des *pull down assays* nötig, um eine Interaktion verifizieren zu können. Ferner müssen noch weitere Methoden genutzt werden, um eine Interaktion zwischen der ISU-Domäne der gp41 Ektodomäne und TREM-1 bestätigen zu können.

---

**LITERATURVERZEICHNIS**

- A**HO S, ARFFMAN A, PUMMI T *ET AL.*, 1997. A novel reporter gene MEL1 for the *yeast two-hybrid* system. *Anal Biochem* 253:270-2.
- ALCAMI A UND EFSTATHIOU S, 2000. Soluble chemokine binding proteins are also encoded by herpesviruses. *Immunol Today* 21: 526-7.
- ALCAMI A UND KOSZINOWSKI UH, 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today* 21: 447-55.
- ALKHATIB G, BRODER CC UND BERGER EA, 1996. Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. *J Virol* 70:5487-94.
- ALLAN JS, COLIGAN JE, LEE TH *ET AL.*, 1987. Immunogenic nature of a Pol gene product of HTLV-III/LAV. *Blood* 69:331-3.
- ALLCOCK RJ, BARROW AD, FORBES S *ET AL.*, 2003. The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *Eur J Immunol* 33:567-77.
- AZALA OA, NAGELKERKE NJ, BWAYO JJ *ET AL.*, 1995. Rapid progression to disease in African sex-workers with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 171:686-9.
- B**AILES E, GAO F, BIBOLLET-RUCHE F *ET AL.*, 2003. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* 300:1713.
- BAKER KA; DUTCH RE; LAMB RA *ET AL.*, 1999. Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion, *Mol Cell* 3:309-19.
- BALTIMORE D, 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209-11.
- BARCELLIN W, RIZZARDI GP, BORGHI MO *ET AL.*, 1994. TH1 and TH2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients. *AIDS* 8(6):757-62.
- BARCOVA M, KACANI L, SPETH C *ET AL.*, 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* 177:905-13.
- BARRE-SINOUSSE F, CHERMANN JC, REY F *ET AL.*, 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-71.
- BEGUM NA, ISHII K, KURITA-TANIGUCHI M *ET AL.*, 2004. Mycobacterium bovis BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages. *Infect Immun* 72:937-48.
- BIRNBOIM HC UND DOLY J, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for *screening* recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-23.
- BLEHARSKI JR, KIESSLER V, BUONSANTI C *ET AL.*, 2003. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J Immunol* 170:3812-8.
- BORGHI P, FANTUZZI L, VARANO B *ET AL.* 1995. Induction of interleukin-10 by human immunodeficiency virus type 1 and its gp120 protein in human monocytes/macrophages. *J Virol* 69:1284-7.
- BOSCH BJ, VAN DER ZEE R, DE HAAN CA *ET AL.*, 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol* 77:8801-11.
- BOUCHON A, DIETRICH J UND COLONNA M, 2000. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* 164:4991-5.

- BOUCHON A, FACCHETTI F, WEIGAND MA *ET AL.*, 2001. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410:1103-7.
- BOUCHON A, HERNANDEZ-MUNAIN C, CELLA M *ET AL.*, 2001. A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC Chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J Exp Med* 194:1111-1122.
- BRODER S AND GALLO RC, 1984. A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. *N Engl J Med* 311:1292-7.
- BRODER YC, KATZ S UND ARONHEIM A, 1998. The Ras recruitment system, a novel approach to the study of protein–protein interactions. *Curr Biol* 8:1121-4.
- BUCHBINDER SP, KATZ MH, HESSOL N *ET AL.*, 1994. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 8:1123-8.
- CANNON JP, HAIRE RN, MUELLER MG *ET AL.*, 2006. Ancient divergence of a complex family of immune-type receptor genes. *Immunogenetics* 2006.
- CANTONI C, BOTTINO C, VITALE M *ET AL.*, 1999. Nkp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 189:787-96.
- CAO J, BERGERON L, HELSETH E *ET AL.* 1993. Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. *Journal of Virology* 67:2747–55.
- CAO Y, QIN L, ZHANG L *ET AL.*, 1995. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 332: 201-8.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1981a. Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Weekly Report* 30:250-2.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1981b. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men – New York and California. *MMWR Morb Mortal Weekly Report* 30:305-8.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1981c. Follow-up on Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia. *MMWR Morb Mortal Weekly Report* 30:409-10.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1982. A Cluster of Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis carinii Pneumonia among Homosexual Male Residents of Los Angeles and range Counties, California. *MMWR Morb Mortal Weekly Report* 31:305-7.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1993b. Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. *MMWR Morb Mortal Weekly Report* 41.
- CHAN DC, FASS D, BERGER JM *ET AL.*, 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89:263-73.
- CHAN DC UND KIM PS, 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell* 93:681-4.
- CHEN YH, SPETH C, WU W *ET AL.*, 1998. Antigenic characterization of HIV-1 gp41 binding proteins. *Immunol Lett* 62:75-9
- CHEN YH, STOIBER H UND DIERICH MP, 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* 55:15-8.
- CHEN YH, XIAO Y UND DIERICH MP, 2000. HIV-1 gp41 and type I interferon: sequence homology and biological as well as clinical implications. *Immunol Res* 22:61-6.
- CHEN YH, XIAO Y, WU W *ET AL.*, 1999. The C domain of HIV-1 gp41 binds the putative cellular receptor protein P62. *AIDS* 13:1021-4.
- CHEN Z, LUCKAY A, SODORA DL *ET AL.*, 1997. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Virol* 71:3953-60.

- CHERMANN JC, BARRE-SINOSSI F, DAUGUET C *ET AL.*, 1983. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot Chemother* 32:48-53.
- CHERNOMORDIK L, CHANTURIYA AN, SUSS-TOBY E *ET AL.*, 1994. An amphipathic peptide from the C-terminal region of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein causes pore formation in membranes. *J Virol* 68:7115-23.
- CHIEN CT, BARTEL PL, STERNGLANZ R *ET AL.*, 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9578-82.
- CHUNG DH, SEAMAN WE UND DAWS MR, 2002. Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17. *Eur J Immunol* 32:59-66.
- CIANCIOLO GJ, BOGERD H UND SNYDERMAN R, 1988. Human retrovirus-related synthetic peptides inhibit T lymphocyte proliferation. *Immunol Lett* 19:7-13.
- CIANCIOLO G, COPELAND T, OROSZLAN S *ET AL.*, 1985. Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science* 230:453-5.
- CLAPHAM PR, BLANC D UND WEISS RA, 1991. Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by Simian immunodeficiency virus. *Virology* 181:703-15.
- CLAPHAM PR UND MCKNIGHT A, 2002. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *Journal of General Virology* 83:1809-29.
- CLAVEL F, GUETARD D, BRUN-VEZINET F *ET AL.*, 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233:343-6.
- CLERICI M, FUSI ML, RUZZANTE S *ET AL.*, 1997. Type 1 and type 2 cytokines in HIV infection – a possible role in apoptosis and disease progression. *Ann Med* 29:185-8.
- CLERICI M UND SHEARER GM, 1994. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* 15:575-81.
- CLERICI M, WYNN TA, BERZOFKY JA *ET AL.*, 1994. Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest* 93:768-75.
- CLEVELAND SM, MCLAIN L, CHEUNG L *ET AL.*, 2003. A region of the C-terminal tail of the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 contains a neutralizing epitope: evidence for its exposure on the surface of the virion. *J Gen Virol* 84:591-602.
- CLIPSTONE UND CRABTREE, 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357:695-7.
- COFFIN JM, 1992. Structure and classification of retroviruses. In: *The retroviridae* (Ed. JA Levy), pp 19-49. Plenum Press, New York.
- COFFIN JM, 1995 HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267:483-9.
- COFFIN JM, HAASE A, LEVY JA *ET AL.*, 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science* 232:697.
- COHEN EA, SUBBRAMANIAN RA UND GOTTLINGER HG, 1996. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol JID - 0110513* 214:19-235.
- COHEN J, 2001. TREM-1 in sepsis. *Lancet* 358:776-8.
- COLONNA M, 2003. TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol* 3:445-53.
- COPELAN EA, RINEHART JJ, LEWIS M *ET AL.*, 1983. The mechanism of retrovirus suppression of human T cell proliferation in vitro. *J Immunol* 131:2017-20.
- CRABTREE UND CLIPSTONE, 1994. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 63:1045-83.
- CROUISE GF, FRISCHAUF A UND LEHRACH H, 1983. An intergrated and simplified approach to cloning into plasmids and single stranded phages. *Methods. Emzymol.* 101:78-89.

- CULLEN BR, 1998. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93:685-92.
- D**ALGLEISH AG, BEVERLEY PC, CLAPHAM PR *ET AL.*, 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-7.
- DALTON S UND TRIESMAN R, 1992. Characterisation of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* 68:597-612.
- DAMOND F, WOROBEY M, CAMPA P *ET AL.*, 2004. Identification of a highly divergent HIV-2 and proposal for a change in HIV-2 classification. *AIDS Res Hum Retrovir* 20:666-72.
- DAWS MR, LANIER LL, SEAMAN WE *ET AL.*, 2001. Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family. *Eur J Immunol* 31:783-91.
- DE COCK KM, LUCAS SB, LUCAS S *ET AL.*, 1993. Clinical research, prophylaxis, therapy and care for HIV disease in Africa. *Am J Public Health* 83:1385-9.
- DECROLY E, BENJANNET S, SAVARIA D *ET AL.*, 1997. Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160. *Febs Lett* 405:68-72.
- DENG H, LIU R, ELLMEIER W *ET AL.*, 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:666-6.
- DENIS M UND GHADIRIAN E, 1994. Dysregulation of interleukin 8, interleukin 10, and interleukin 12 release by alveolar macrophages from HIV type 1-infected subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10:1619-27.
- DENNER J, 1998: Immunosuppression by retroviruses: implications for Xenotransplantation. *Ann NY Acad Sci* 862:75-86.
- DENNER J, 2000. How does HIV induce AIDS? The virus protein hypothesis. *J Hum Virol* 3:81-82.
- DENNER J, NORLEY S UND KURTH R, 1994. The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *AIDS* 8:1063-72.
- DENNER J, PERSIN C, VOGEL T *ET AL.*, 1996. The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T- and B-lymphocyte stimulation. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovir* 12:442-50.
- DENNER J, VOGEL T, NORLEY S, *ET AL.*, 1993. The immunosuppressive (ISU-) peptide of HIV-1: Binding to lymphocyte surface proteins. *J Cancer Research and Clinical Oncology* 119:28.
- DENNER J, VOGEL T, NORLEY S *ET AL.*, 1995. The immunosuppressive (ISU-) peptide of HIV-1: Binding proteins on lymphocytes detected by different methods. *J Cancer Res Clin Oncol* 121:34.
- DENNER J, WUNDERLICH V UND BIERWOLF D, 1980. Suppression of human lymphocyte mitogen response by disrupted primate retroviruses of type C (baboon endogenous virus) and type D (PMFV). *Acta Biol Med Ger* 39:K19-K26.
- DENNER J, WUNDERLICH V UND BIERWOLF D, 1986. Suppression of human lymphocyte mitogen response by proteins of the type-D retrovirus PMFV. *Int J Cancer* 37:311-6.
- DENNER J, WUNDERLICH V UND SYDOW G, 1985. Suppression of human lymphocyte mitogen response by retroviruses of type D. I. Action of highly purified intact and disrupted virus. *Arch Virol* 86:177-86.
- DORANZ BJ, RUCKER J, YI Y *ET AL.*, 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the  $\beta$ -chemo-kine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85:1149-58.
- DOWER K, ELLIS DK, SARAF K *ET AL.*, 2008. Innate immune responses to TREM-1 activation: overlap, divergence, and positive and negative cross-talk with bacterial lipopolysaccharide.
- DRAGIC T, LITWIN V, ALLAWAY GP *ET AL.*, 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381:667-73.
- DURFEE T, BECHERER K, CHEN PL *ET AL.*, 1993. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 7:555-69.
- E**ARL P, DOMS R UND MOSS B, 1990. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:648-52
- EASTERBROOK PJ, 1994. Non-progression in HIV infection. *AIDS* 8:1179-82.

- EBENBICHLER C, RODER C, VORNHAGEN R *ET AL.*, 1993. Cell surface proteins binding to recombinant soluble HIV-1 and HIV-2 transmembrane proteins. *AIDS* 7:489-95.
- EBENBICHLER CF, STOIBER H, SCHNEIDER R, *ET AL.*, 1996. The human immunodeficiency virus type 1 transmembrane gp41 protein is a calcium-binding protein and interacts with the putative second-receptor molecules in a calcium-dependent manner. *J Virol* 70:1723-8.
- ENDRES MJ, JAFFER S, HAGGARTY B *ET AL.*, 1997. Targeting of HIV- and SIV-Infected Cells by CD4-Chemokine Receptor Pseudotypes. *Science* 21:1462-4.
- FAXVAAG A, ESPEVIK T UND DALEN A, 1995. An immunosuppressive murine leukaemia virus induces a Th1-->Th2 switch and abrogates the IgM antibody response to sheep erythrocytes by suppressing the production of IL-2. *Clin Exp Immunol* 102:487-95.
- FENG Y, BRODER CC, KENNEDY PE *ET AL.*, 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872-7.
- FENNIE C UND LASKY LA, 1989. Model for intracellular folding of the human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* 63:639-46.
- FENOUILLET E, GLUCKMAN JC UND JONES IM, 1994. Functions of HIV envelope glycans. *Trends Biochem Sci* 19, 65-70.
- FIELDS S UND SONG O, 1989. A novel system to detect protei-protein interactions. *Nature* 340:245-6.
- FIELDS S UND STERNGLANZ R, 1994. The two hybrid system. an assay for protein-protein interactions. *Trans Genet* 10:286-92.
- GAINES H, SYDOW MAE VON, STEDINGK LV VON *ET AL.*, 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* 4:995-9.
- GALLAHER W, 1987. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* 50:327-8.
- GALLAHER W, BALL J, GARRY R *ET AL.*, 1989. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Research and Human Retroviruses* 5:431-40.
- GALLO RC, SALAHUDDIN SZ, POPOVIC M *ET AL.*, 1984. Frequent Detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS. *Science* 224:500-3.
- GALLO RC, SARIN PS, GELMANN EP *ET AL.*, 1983. Isolation of a human T cell leukaemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:865-7.
- GALLO SA, FINNEGAN CM, VIARD M *ET AL.*, 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* 1614:36-50.
- GAO F, BAILES E, ROBERTSON DL *ET AL.*, 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397:436-41.
- GAO F, YUE L, ROBERTSON DL *ET AL.*, 1994. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* 68:7433-47.
- GATTIS JL, WASHINGTON AV, CHISHOLM MM *ET AL.*, 2006. The structure of the extracellular domain of triggering receptor expressed on myeloid cells like transcript-1 and evidence for a naturally occurring soluble fragment. *J Biol Chem* 281:13396-403.
- GAWRISCH K, HAN K-H, YANG J-S *ET AL.*, 1993.. Interaction of peptide fragment 828–848 of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 with lipid bilayers. *Biochemistry* 32:3112-8.
- GELDERBLOM HR, 1991. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 5:617-637.
- GELDERBLOM HR, HAUSMANN EH, OZEL M *ET AL.*, 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156:171-176.
- GIBOT S, 2005. Clinical review: role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 during sepsis. *Crit Care* 9(5):485-9.

- GIBOT S, KOLOPP-SARDA MN, BENE MC *ET AL.*, 2004. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J Exp Med* 200:1419-26.
- GIETZ RD, TRIGGS-RAINE B, ROBBINS A *ET AL.*, 1997. Identification of proteins that interact with a protein of interests: Application of the *yeast two-hybrid screen*. *Mol Cell Biochem* 172:67-79.
- GINGRAS MC, LAPILLONNE H UND MARGOLIN JF, 2002. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol Immunol* 38:817-24.
- GOMEZ-PINA V, SOARES-SCHANOSKI A, RODRIGUEZ-ROJAS A *ET AL.*, 2007. Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol* 179:4065-73.
- GORDON S UND TAYLOR PR, 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953-64.
- GOUDSMIT J UND LUKASHOV VV, 1999. Dating the origin of HIV-1 subtypes. *Nature* 400:325-326.
- GRAHAM FL UND VAN DER EB AJ, 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-67.
- GRAZIOSI C, PANTALEO G, GANTT KR *ET AL.*, 1994. Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. *Science* 265:248-52.
- GUAN KL UND DIXON JE, 1991. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* 192:1071-80.
- GULTEKIN H UND HEERMANN KH, 1988. The use of polyvinylidene fluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* 172:320-9.
- GURTLER, L.G., HAUSER, P.H., EBERLE, J. *ET AL.*, 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* 68:1581-5.
- GYADER M, EMERMAN M, SONIGO P *ET AL.*, 1987. Genome organisation and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326:662-9.
- GYURIS J, GOLEMIS E, CHERTKOV H *ET AL.*, 1993 Cdk2, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75:791-803.
- H**AHN BH, SHAW GM, DE COCK KM *ET AL.*, 2000. AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science* 287:607-14.
- HALLENBERGER S, BOSCH V, ANGLIKER H *ET AL.*, 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360:358-61.
- HANAHAN D, 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557.
- Haraguchi S, Good RA, Cianciolo GJ *et al.*, 1992.. A synthetic peptide homologous to retroviral envelope protein down-regulates TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression. *J Leukoc Biol* 52:469-72.
- HARAGUCHI S, GOOD RA, CIANCIOLO GJ *ET AL.*, 1993. Transcriptional down-regulation of tumor necrosis factor-alpha gene expression by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope protein. *J Immunol* 151:2733-41.
- HARAGUCHI S, GOOD RA, CIANCIOLO GJ *ET AL.*, 1997. Immunosuppressive retroviral peptides: immunopathological implications for immunosuppressive influences of retroviral infections. *J Leukoc Biol* 61:654-66.
- HARAGUCHI S, GOOD RA UND DAY NK, 1995. Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns. *Immunol Today* 16:595-603.
- HARAGUCHI S, GOOD RA, JAMES-YARISH M *ET AL.*, 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 USA* 92:3611-5.

- HARRELL RA, CIANCIOLO GJ, COPELAND TD *ET AL.*, 1986. Suppression of the respiratory burst of human monocytes by a synthetic peptide homologous to envelope proteins of human and animal retroviruses. *J Immunol* 136:3517-20.
- HARRER T, HARRER E, KALAMS S *ET AL.*, 1996. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody response in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:585-92.
- HARRIS DT, CIANCIOLO GJ, SNYDERMAN R *ET AL.*, 1987. Inhibition of human natural killer cell activity by a synthetic peptide homologous to a conserved region in the retroviral protein, p15E. *J Immunol* 138:889-94.
- HASELMAYER P, GROSSE-HORVEST L, VON LANDENBERG P *ET AL.*, 2007. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* 110:1029-35.
- HAZENBERG MD, HAMANN D, SCHUITEMAKER H *ET AL.*, 2000. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat Immunol* 14:285-9.
- HEBEBRAND LC, OLSEN RG, MATHES LE *ET AL.*, 1979.. Inhibition of human lymphocyte mitogen and antigen response by a 15,000-dalton protein from feline leukemia virus. *Cancer Res* 39:443-7.
- HENDERSON L UND QURESHI M, 1993, A peptide inhibitor of human immunodeficiency virus infection binds to novel human cell surface polypeptides. *J Biol Chem* 268:15291-7.
- HO DD, NEUMANN AU, PERELSON AS *ET AL.*, 1995a. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123-6.
- HOFMANN B, NISHANIAN P, NGUYEN T *ET AL.*, 1993. Restoration of T-cell function in HIV infection by reduction of intracellular cAMP levels with adenosine analogues. *AIDS* 7:659-64.
- HOLLENBERG SM, STERNGLANZ R, CHENG PF *ET AL.*, 1995. Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol Cell Biol* 15:3813-22.
- HOWARD M, O'GARRA A, ISHIDA H *ET AL.*, 1992. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol* 12:239-47.
- HUBSMAN M, YUDKOVSKY G UND ARONHEIM A, 2001. A novel approach for the identification of protein-protein interaction with integral membrane proteins. *Nucleic Acids Res* 29:E18.
- IKEDA H, HARDY W JR, TRESS E *ET AL.*, 1975. Chromatographic separation and antigenic analysis of proteins of the oncornaviruses. V. Identification of a new murine viral protein, p15(E). *J Virol* 16:53-61.
- JAMES P, HALLADAY J UND CRAIG EA., 1996. Genomic libraries and host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425-36.
- JOHNSSON N UND VARSHAVSKY A, 1994. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10340-4.
- KAHN JO UND WALKER BD, 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *New Engl J Med* 339:33-9.
- KANKI PJ, M'BOUP S, RICARD D *ET AL.*, 1987. Human T-lymphotrophic virus type 4 and the human immunodeficiency virus in West Africa. *Science* 236:827-31.
- KANTANEN ML, LEINIKKI P UND KUISMANEN E, 1995. Endoproteolytic cleavage of HIV-1 gp160 envelope precursor occurs after exit from the trans-Golgi network (TGN). *Arch Virol* 140:1441-9.
- KAPLAN AH, MANCHESTER M UND SWANSTROM R, 1994. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J Virol* 68:6782-6.
- KATO A, MAKI K, EBINA T *ET AL.*, 2007. Mutational analysis of protein solubility enhancement using short peptide tags. *Biopolymers* 85:12-8.
- KEDZIERSKA K UND CROWE SM, 2001. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemother* 12:133-50.
- KEDZIERSKA K, CROWE SM, TURVILLE S *ET AL.*, 2003. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol* :39-56.

- KEEGAN L, GILL G UND PTASHNE M, 1986. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of an eukaryotic regulatory protein. *Science* 231:699-704.
- KEELE BF, VAN HEUVERSWYN F, LI Y *ET AL.*, 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313:523-6.
- KLATZMANN D, CHAMPAGNE E, CHAMARET S *ET AL.*, 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312:767-8.
- KLEINERMAN ES, LACHMAN LB, KNOWLES RD *ET AL.*, 1987. A synthetic peptide homologous to the envelope proteins of retroviruses inhibits monocyte-mediated killing by inactivating interleukin 1. *J Immunol* 139:2329-37.
- KLESNEY-TAIT J, TURNBULL IR UND COLONNA M, 2006. The TREM receptor family and signal intergration. *Nat Immunol* 7:1266-73.
- KLIGER Y, AHARONI A, RAPAPORT D *ET AL.*, 1997. Fusion peptides derived from the HIV type 1 glycoprotein 41 associate within phospholipid membranes and inhibit cell-cell fusion. Structure-function study. *J Biol Chem* 272:13496-505.
- KORBER B, MULDOON M, THEILER J *ET AL.*, 2000. Timing the ancestor of HIV-1 pandemic strains. *Science* 228:1789-96.
- KOUTSONIKOLIS A, HARAGUCHI S, BRIGINO E *ET AL.*, 1997. HIV-1 recombinant gp41 induces IL-10 expression and production in peripheral blood monocytes but not in T-lymphocytes. *Immunol Lett* 55:109-13.
- KOWALSKI M, POTZ J, BASIRIPOUR L *ET AL.*, 1987. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 237:1351-5.
- KYSHE L UND ANDERSON J, 1984. Electroblothing of multiple gels. A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from Acrylamid to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10:203-9.
- L**AEMMLI UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- LASKY LA, NAKAMURA G, SMITH DH *ET AL.*, 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* 50:975-985.
- LEE S-F, WANG C-T, LIANG J Y-P *ET AL.*, 2000. Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41. *J Biol Chem* 275:15809-19.
- LEITNER TD, ESCANILLA S, MARQUINA J *ET AL.*, 1993. Biological and molecular characterization of subtype D, G, and A/D recombinant HIV-1 transmissions in Sweden. *Virology*. 209:136-46.
- LEVY JA, 1993. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* 7:1401-10.
- LI B UND FIELDS S, 1993. Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the *yeast two-hybrid* system. *FASEB J*. 7:957-63.
- LICHTERFELD M, KAUFMANN DE, YU XG *ET AL.*, 2004. Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. *J Exp Med* 200:701-12.
- LIFSON J, FEINBERG M, REYES G *ET AL.*, 1986. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Science* 233:725-8.
- LINSTEDT AD, JESCH SA, METHA A *ET AL.*, 2000. Binding relationships of membrane tethering components. The giantin N terminus and the GM130 N terminus compete for binding to p115 C terminus. *J Biol Chem* 275:10196-201.
- M**A J UND PTASHNE M. 1987. A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 51:113-9.
- MALASHKEVICH VN, SCHNEIDER BJ, McNALLY M *ET AL.*, 1999. Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2662-7.

- MARKOWITZ N, HANSEN NI, WILCOSKY TC, *ET AL.*, 1993. Tuberculin and anergy testing in HIV-seropositive and HIV-seronegative persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Ann Intern Med* 119:185-93.
- MARX JL, 1982. New disease baffles medical community. *Science*. 217:618–21.
- MATHES LE, OLSEN RG, HEBEBRAND LC *ET AL.*, 1978. Abrogation of lymphocyte blastogenesis by a feline leukaemia virus protein. *Nature* 274:687-9.
- MATHES LE, OLSEN RG, HEBEBRAND LC *ET AL.*, 1979. Immunosuppressive properties of a virion polypeptide, a 15,000-dalton protein, from feline leukemia virus. *Cancer Res* 39:950-5.
- MCCUTCHAN FE, SALMINEN MO, CARR JK *ET AL.*, 1996. HIV-1 genetic diversity. *AIDS* 10:13-20.
- MELLORS JW, KINGSLEY LA, RINALDO CR JR. *ET AL.*, 1995. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 122:573-9.
- MILLER MA, CLOYD MW, LIEBMANN J *ET AL.*, 1993. Alterations in cell membrane permeability by the lentivirus lytic peptide (LLP-1) of HIV-1 transmembrane protein. *Virology* 196:89-100.
- MILLER MA, GARRY RF, JAYNES JM *ET AL.*, 1991. A structural correlation between lentivirus transmembrane proteins and natural cytolytic peptides. *AIDS Res Hum Retrovir* 7:511-9.
- MODROW S, FALKE D UND TRUYEN U, 2003. *Molekulare Virologie*. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin. pp 390-426.
- MONELL CR UND STRAND M, 1994. Structural and functional similarities between synthetic HIV gp41 peptides and defensins. *Clin Immunol Immunopathol* 71:315-24.
- MOORE KW, O'GARRA A, DE WAAL MALEFYT R *ET AL.*, 1992. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11:165-90.
- MOORE KW, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN RL *ET AL.*, 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.
- MOULARD M, HALLENBERGER S, GARTEN W *ET AL.*, 1999. Processing and routage of HIV glycoproteins by furin to the cell surface. *Virus Res* 60:55-65.
- MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S *ET AL.*, 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-73.
- N**AITO T, OGASAWARA H, KANEKO H *ET AL.*, 2003. Immune abnormalities induced by human endogenous retroviral peptides: with reference to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 23:371-6.
- NATHAN C UND DING A, 2001. TREM-1: a new regulator of innate immunity in sepsis syndrome. *Nat Med* 7:530-2.
- NETEA MG, AZAM T, FERWERDA G *ET AL.*, 2006. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR (NLR) pattern recognition receptors. *J Leukoc Biol* 80:1454–61.
- NEUMANN M, HARRISON J, SALTARELLI M *ET AL.*, 1994. Splicing variability in HIV type 1 revealed by quantitative RNA polymerase chain reaction. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10:1531-42.
- NOCHI H, AOKI N, OIKAWA K *ET AL.*, 2003. Modulation of hepatic granulomatous responses by transgene expression of DAP12 or TREM-1-Ig molecules. *Am J Pathol* 162, 1191-201.
- NOVAK TJ UND ROTHENBERG EV, 1990. cAMP inhibits induction of interleukin 2 but not of interleukin 4 in T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9353-7.
- O**'BRIEN W, KOYANAGI Y, NAMAZIE A *ET AL.*, 1990. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* 348:69–73.
- OGASAWARA M, HARAGUCHI S, CIANCIOLO GJ *ET AL.*, 1990. Inhibition of murine cytotoxic T lymphocyte activity by a synthetic retroviral peptide and abrogation of this activity by IL. *J Immunol* 145:456-62.
- OLSEN R, HOOVER E, SCHALLER J *ET AL.*, 1977. Abrogation of resistance to feline oncornavirus disease by immunization with killed feline leukemia virus. *Cancer Res* 37:2082-5.

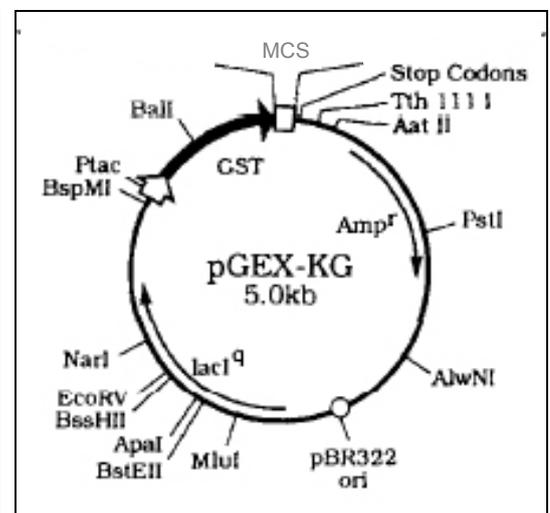
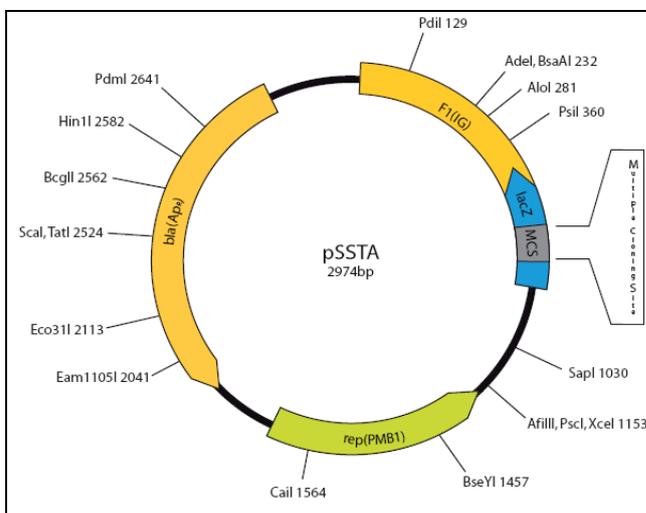
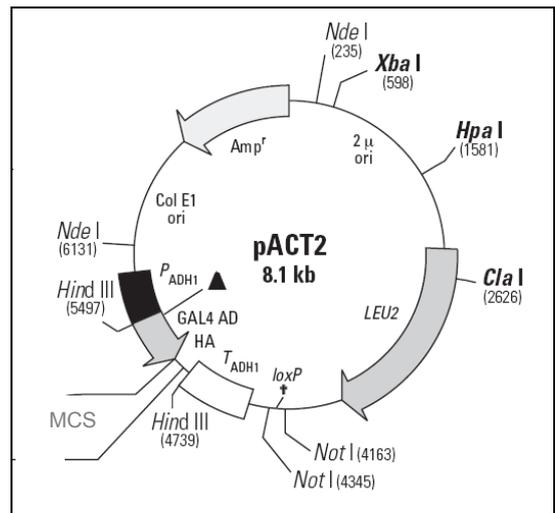
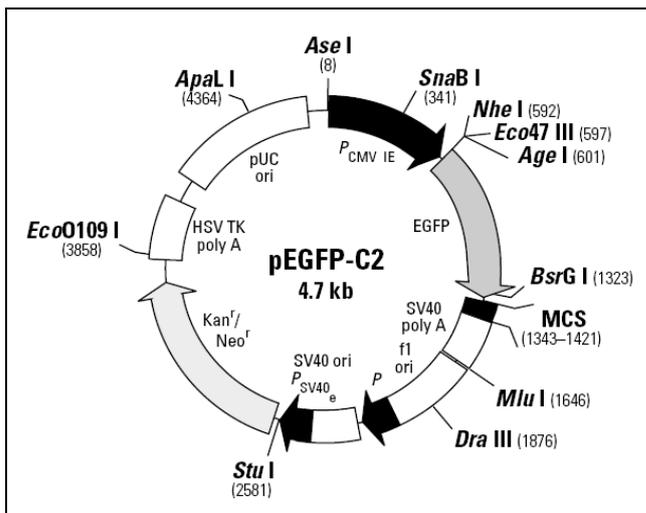
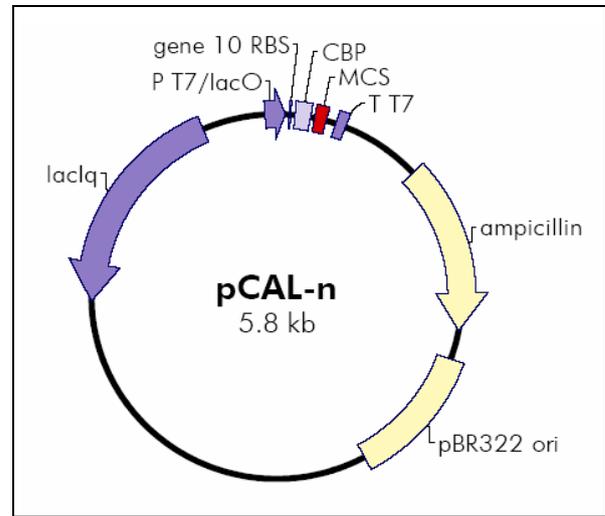
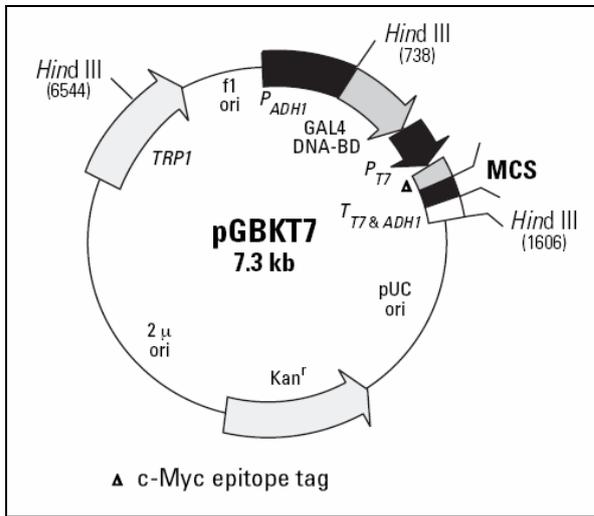
- ORNSTEIN L, 1964. Disc Electrophoresis – I. Background and theory. *Annals N.Y. Academy Sciences* 121:321.
- OROSZ CG, ZINN NE, OLSEN RG *ET AL.*, 1985a. Retrovirus-mediated immunosuppression. I. FeLV-UV and specific FeLV proteins alter T lymphocyte behavior by inducing hyporesponsiveness to lymphokines. *J Immunol* 134:3396-403.
- OROSZ CG, ZINN NE, OLSEN RG *ET AL.*, 1985b. Retrovirus-mediated immunosuppression. II. FeLV-UV alters in vitro murine T lymphocyte behavior by reversibly impairing lymphokine secretion. *J Immunol* 135:583-90.
- P**ALONEVA J *ET AL.*, 2002. TREM-2 mutations in presenile dementia, *PLOSL. Am J Hum Genet* 71:656-62.
- PAVLAKIS GN, SCHWARTZ S, D'AGOSTINO D *ET AL.*, 1992. Structure, splicing and regulation of expression of HIV-1: a model for general organisation of lentiviruses and other complex retroviruses. In: *AIDS research reviews*. (Eds. WC Koff, RC Kennedy und F Wong-Staal), pp.41-63. Marcel Dekker, New York.
- PINTER A, HONNEN W, TILLEY S *ET AL.*, 1989. Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* 63:2674-9.
- Phizicky EM und Fields S, 1995. *Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis*. *Microbiol Rev* 59:94-123.
- POPOVIC M, SARNGADHARAN MG, READ E *ET AL.*, 1984. „Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS“. *Science*. 224:497-500.
- PRESTON BD, POIESZ BJ UND LOEB LA, 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242:1168-1171.
- Q**URESHI N, COY D, GARRY R UND HENDERSON L, 1990. Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides. *AIDS* 4:553-8.
- R**AMANATHAN B, MINTON JE, ROSS CR *ET AL.*, 2004. Characterization of bovine cDNA encoding triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1). *Vet Immunol Immunopathol* 102:85-9.
- REISFELD RA, LEWIS UJ UND WILLIAMS DE, 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamid gels. *Nature* 195:281-3.
- ROBERT KOCH-INSTITUT BERLIN. 2007. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 47. Stand: Februar 2008. <http://www.weltaidstag.com/data/weltaidstag/media/doc/Welt-Aids-Tag.pdf>
- ROBERTSON DL, SHARP PM, MCCUTCHAN FE *ET AL.*, 1995a. Recombination in HIV-1. *Nature* 374:124-126.
- ROBERTSON KL, ANDERSON JP, BRADAC JA *ET AL.*, 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288:55.
- ROSENBERG ES, BILLINGSLEY JM, CALIENDO AM *ET AL.*, 1997. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278:1447-50.
- RUEGG CL, MONELL CR UND STRAND M, 1989. Identification, using synthetic peptides, of the minimum amino acid sequence from the retroviral transmembrane protein p15E required for inhibition of lymphoproliferation and its similarity to gp21 of human T-lymphotropic virus types I and II. *J Virol*. 63:325-56.
- RUEGG CL, MONELL CR UND STRAND M, 1989. Inhibition of lymphoproliferation by a synthetic peptide with sequence identity to gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 63:3257-60.
- S**AIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S *ET AL.*, 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91
- SAMSON M, LIBERT F, DORANZ BJ *ET AL.*, 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722-5.
- SANCHEZ-PESCADOR R, POWER MD, BARR PJ *ET AL.*, 1985. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* 227:484-92.

- SANGER F, NICKLEN F AND COULSON AR, 1977. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-7.
- SARAFIAN VS UND MARINOVA TT, 2006. Lysosomal membrane-associated glycoproteins are differentially expressed in acute and chronic human thymic involution. Acta Biol Hung 57:315-22.
- SCANGOS G UND RUDDLE FH, 1981. Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells – a review. Gene 14:1-10.
- SCHAWALLER M, SMITH G, SKEHEL J *ET AL.*, 1989. Studies with crosslinking reagents on the oligomeric structure of the env glycoprotein of HIV. Virology 172:367-9.
- SCHENK M, BOUCHON A, BIRRER S, *ET AL.*, 2005. Macrophages expressing triggering receptor expressed on myeloid cells-1 are underrepresented in the human intestine. J Immunol 174:517-24.
- SCHENK M, BOUCHON A, SEIBOLD F *ET AL.*, 2007. TREM-1-expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. J Clin Invest.
- SCHMID CD, SAUTKULIS LN, DANIELSON PE *ET AL.*, 2002. Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. J Neurochem 83:1309-20.
- SESSA G, PODINI P, MARIANI M *ET AL.*, 2004. Distribution and signaling of TREM2/DAP12, the receptor system mutated in human polycystic lipomembraneous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy dementia. Eur. J Neurosci 20:2617-28.
- SHARP PM, BAILES E, GAO F *ET AL.*, 2000. Origins and evolution of AIDS viruses: estimating the time-scale. Biochem Soc Trans 28:275-82.
- SHIODA T, LEVY J UND CHENG-MAYER C, 1991. Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. Nature 349:167-9.
- SIDNEY J, PETERS B, FRAHM N *ET AL.*, 2008. HLA class I supertypes: a revised and updated classification. BMC Immunol 9:1.
- SILVESTRI G, 2005. Naturally SIV-infected sooty mangabeys: are we closer to understanding why they do not develop AIDS? J Med Primatol 34:243-52.
- SIMON F, MAUCLERE P, ROQUES P *ET AL.*, 1998. Identification Of a New Human Immunodeficiency Virus Type 1 Distinct From Group M and Group O. Nature Medicine 4:1032-7.
- Skehel JJ und Wiley DC, 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. Annu Rev Biochem 69:531-69.
- SODROSKI J, GOH WC, ROSEN CA *ET AL.*, 1986. Role of the HTLV-III envelope in syncytium formation and cytopathicity. Nature (London) 321:412-7.
- SOMOGYI S. 2003. Divergente Transkriptionskontrolle von HIV-1: Strukturelle und funktionale Analyse des LTR-Promotors der Gruppen M, N und O. Dissertation, FU Berlin.
- SRINIVAS S K, SRINIVAS R V, ANANTHARAMAIAH G M *ET AL.*, 1992.. Membrane interactions of synthetic peptides corresponding to amphipathic helical segments of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. J Biol Chem 267:7121-7.
- SRINIVAS SK, SRINIVAS RV, ANANTHARAMAIAH GM *ET AL.*, 1993. Cytosolic domain of the human immunodeficiency virus envelope glycoproteins binds to calmodulin and inhibits calmodulin-regulated proteins. J Biol Chem 268:22895-9.
- STAGLJAR I UND FIELDS S, 2002. Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies. Trends Biochem Sci 27:559-63.
- STAGLJAR I, KOROSTENSKY C, JOHNSON N *ET AL.*, 1998. A new genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 95:5187-92.
- STEIN BS, GOUDA SD, LIFSON JD *ET AL.*, 1987. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. Cell 49:659-68.
- STEVENSON M, STANWICK TL, DEMPSEY MP *ET AL.*, 1990. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. Embo J 9:1551-60.

- STUDIER FW UND MOFFATT BA, 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-30.
- SUZUKI T, TAHRA H, NARULA S *ET AL.*, 1995. Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors. *J Exp Med* 182:477-86.
- TACKE S, KURTH R UND DENNER J, 2000. Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? *Virology*. 268:87-93.
- TAKATORI H, NAKAJIMA H, HIROSE K *ET AL.*, 2005. Indispensable Role of Stat5a in Stat6-Independent Th2 Cell Differentiation and Allergic Airway Inflammation. *J Immunol* 174:3734-40.
- TAKEDA K, TANAKA T, SHI W *ET AL.*, 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380:627-30.
- TAS M, DREXHAGE HA UND GOUDSMIT J, 1988. A monocyte chemotaxis inhibiting factor in serum of HIV infected men shares epitopes with the HIV transmembrane protein gp41. *Clin Exp Immunol* 71:13-8.
- TEMIN HM UND MITUZAMI S, 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous. sarcoma virus. *Biotechnology*. 24:51-56.
- TESSARZ AJ UND CERWENKA A, 2008. The TREM-1/DAP12 Pathway. *Immunol Lett* 116:111-6.
- TOWBIN J, STAHELIN T UND GORDON J, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from Polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl Acad Sci USA* 76:4350-4.
- TRIQUES K, BOURGEOIS A, SARAGOSTI S *ET AL.*, 1999. High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa. *Virology* 259:99-109.
- TRIQUES K, BOURGEOIS A, VIDAL N *ET AL.*, 2000. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:139-51.
- TSCHERNING C, ALAEUS A, FREDRIKSSON R *ET AL.*, 1998. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology* 241:181-8.
- TURNBULL IR, GILFILLAN S, CELLA M, *ET AL.*, 2006. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J Immunol* 177, 3520-4.
- UNAIDS/WHO, 2007. 2007 AIDS epidemic update. Stand: Februar 2008. [http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007\\_epiupdate\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_en.pdf)
- VAN AELST L, BARR M, MARCUS S *ET AL.*, 1993. Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6213-7.
- VIERTLBOECK BC, SCHMITT R UND GÖBEL TW, 2006. The chicken immunoregulatory receptor families SIRP, TREM, and CMRF35/CD300L. *Immunogenetics* 58:180-90.
- WAIN-HOBSON S, SONIGO P, DANOS O *ET AL.*, 1985. Nucleotide Sequence of the AIDS Virus, LAV. *Cell* 40: 9-17.
- WASHINGTON AV, QUIGLEY L UND MCVICAR DW, 2002. Initial characterization of TREM-like transcript (TLT)-1: a putative inhibitory receptor within the TREM cluster. *Blood* 100:3822-4.
- WEISS C, LEVY J UND WHITE J, 1990. Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *Journal of Virology* 64:5674-7.
- WEISSENHORN W, CARFI A, LEE KH *ET AL.*, 1998. Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol Cell* 2:605-16.
- WEISSENHORN W, DESSEN A, HARRISON S *ET AL.*, 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387:426-30.
- WEISSENHORN W, WHARTON S, CALDER L *ET AL.*, 1996. The ectodomain of HIV-1 env subunit gp41 forms a soluble, Alpha-helical, rod-like oligomer in the absence of gp120 and the N-terminal fusion peptide. *EMBO Journal* 15:1507-14.
- WHITE JM, 1992. Membrane fusions. *Science* 258:917-24.

- WOUTERS S, DECROLY E, VANDENBRANDEN M *ET AL.*, 1999. Occurrence of an HIV-1 gp160 endoproteolytic activity in low-density vesicles and evidence for a distinct density distribution from endogenously expressed furin and PC7/LPC convertases. *FEBS Lett* 456:97-102.
- WYATT R UND SODROSKI J, 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280:1884-8.
- XIAO Y, WU W, DIERICH MP *ET AL.*, 2000. HIV-1 gp41 by N-domain binds the potential receptor protein P45. *Int Arch Allergy Immunol* 121:253-7.
- YAMAGUCHI J, DEVARE SG UND BRENNAN CA, 2000. Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence. *AIDS Res Hum Retrovir* 16:925-30.
- YU X, YUAN X, MCLANE MF *ET AL.*, 1993. Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J Virol* 67:213-21.
- ZENG H, ORNATOWSKA M, JOO MS *ET AL.*, 2007. TREM-1 expression in macrophages is regulated at transcriptional level by NF-kappaB and PU. 1 *Eur J Immunol* 37:2300-8.
- ZHANG H, DORNADULA G, ALUR P *ET AL.*, 1996. Amphipathic domains in the C terminus of the transmembrane protein (gp41) permeabilize HIV-1 virions: a molecular mechanism underlying natural endogenous reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12519-24.
- ZHU T, KORBER BT, NAHMIAS AJ *ET AL.*, 1998. An African HIV-1 Sequence from 1959 and Implications for the Origin of the Epidemic. *Nature* 391:594-7.

ANHANG



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken ...

... bei Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Kurth und bei Herrn Dr. Joachim Denner, für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe P13 am Robert Koch-Institut in Berlin und die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Diplomarbeit.

... bei Frau PD Dr. Edith Pflüger, für Ihre Bereitschaft, als Zweitgutachterin tätig zu sein.

... bei Magdalena für ihre ständige Unterstützung, für die hervorragende Betreuung und fachliche Anleitung & dem "Erklären-nie-leid-zu-werden". Des Weiteren für das Korrekturlesen meiner Diplomarbeit.

... bei Kerstin, für die zahlreichen Tipps & Tricks bei meiner experimentellen Arbeit und bei Jo & Sven für die Hilfe bei den Immunfluoreszenzaufnahmen.

... bei der ganzen AG P13, vor allem bei Daniel und Michaela, für die stets nette & lustige Arbeitsatmosphäre.

... bei meinen Freunden für die liebe Unterstützung und die vielen wunderschönen Erlebnisse während meines Studiums, auch außerhalb der Vorlesungssäle & Labore.

... bei meinen Eltern und meiner Schwester für ihr Vertrauen, ihre Liebe, ihren Rat und ihre unermüdliche Unterstützung in jedweder Hinsicht.

...und bei meinem Freund, einfach dafür, dass es ihn gibt.

