

**Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Axel Rethwilm

**Die Wirkung von Antioxidantien auf die Apoptose und
die Reaktivierung von HIV in chronisch-infizierten
Zellen durch bakterielle CpG-ODN-Sequenzen.**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Johanna Maria Knöferle

aus Göttingen

Würzburg, Januar 2007

Referent : Herr Priv.-Doz. Dr. Carsten Scheller

Koreferent: Herr Prof. Dr. Michael Klein

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2007

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

<u>1.</u>	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Die physiologische Bedeutung der Apoptose	1
1.1.1	Die morphologischen Veränderungen infolge von Apoptose	1
1.1.2	Auslöser der Apoptose	3
1.1.3	Die Rolle der Mitochondrien	5
1.1.4	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	7
1.1.5	Die Funktion der Lysosomen	8
1.1.6	Das Endoplasmatische Retikulum und Calcium	9
1.1.7	Apoptose in T-Lymphozyten	9
1.1.8	Antioxidantien und Apoptose	10
1.2	HIV und AIDS – ein Rückblick auf die Anfänge der Forschung und die Entwicklung der Epidemiologie	11
1.2.1	Das klinische Bild der HIV-Infektion	12
1.2.2	Klassifikation, Morphologie und Replikationszyklus des HI-Virus	13
1.2.3	Pathogenese der HIV-Infektion	15
1.2.3.1	Die Transmission und akute Infektion	15
1.2.3.2	Die Bedeutung der Infektion von unterschiedlichen Zellarten	16
1.2.3.3	Förderung und Hemmung der Virusreplikation durch zelluläre Faktoren	17
1.2.3.4	Ursachen des CD4+ Zellen Verlustes	17
1.2.4	Immunantwort auf HIV	18
1.2.5	Therapiemöglichkeiten	20
1.2.6	Die Beeinflussung des Immunsystems durch bakterielle CpG Motive	21
<u>2.</u>	<u>Zielsetzung</u>	24
<u>3.</u>	<u>Material</u>	25
3.1	Geräte	25
3.2	Verbrauchsmaterialien	25
3.3	Chemikalien	26

3.4	Reagenzien für die Zellkultur	26
3.5	Inhibitoren	27
3.6	Antikörper und andere Reagenzien für die Markierung von Zellen	27
3.7	PTO-ODNs	28
3.8	Zellen	28
4.	<u>Methoden</u>	29
4.1	Zellkulturen	29
4.1.1	Zusammensetzung des Kulturmediums	29
4.1.2	Reinigen der Zellsuspensionen	29
4.1.3	Bestimmung der Zelldichte und Zellvitalität	30
4.1.4	Entfernen von toten Zellen aus der Zellkultur	31
4.1.5	Kryokonservierung	32
4.2	Gewinnung von PBMC	32
4.3	Anreicherung von primären Blut Lymphozyten (PBL) aus PBMCs	34
4.4.	Durchflusszytometrie	34
4.4.1	Extrazelluläre Färbung	35
4.4.2	Intrazelluläre Färbung	36
4.4.3	Verwendete Antikörper und deren Funktion	37
4.4.4	AnnexinV-/7AAD-Färbung	37
4.5	Statistik	39
4.5.1	Streuung bei der Zählung von Ereignissen in einer Stichprobe	39
4.5.2	Statistische Methoden bei der Messwertanalyse	40
5.	<u>Ergebnisse</u>	42
5.1	Antioxidantien können CD95 vermittelte Signalwege modulieren	42
5.1.1	NAC verhindert die Apoptose in E6-1 Jurkat-Zellen	43
5.1.2	Die Apoptose in A3.01 Zellen wird durch niedrige Konzentration von NAC gefördert, durch hohe Konzentrationen gehemmt	45
5.1.3	BHA wirkt anti-apoptotisch auf E6-1 Jurkat-Zellen	46
5.1.4	In A3.01 T-Lymphoblasten führt BHA zu einer verstärkten Apoptose	50
5.1.5	PBMC reagieren auf BHA mit verstärkter Apoptose	51

5.2	Die Reaktivierung von HIV durch CpG-ODNs	52
5.2.1	CpG-ODNs reaktivieren HIV in ACH-2 Zellen	54
5.2.2	ACH-2 Zellen werden durch CpG-ODNs nicht aktiviert	55
5.2.3	CpG-ODNs haben keinen Einfluss auf die Aktivierung CD-positiver PBMCs	56
5.2.4	Der NFkB-Inhibitor CAPE erhöht die durch CpG Motive verursachte Reaktivierung von HIV	58
5.2.5	Der NFkB-Inhibitor SN50 zeigt keinen Effekt auf die Reaktivierung von HIV	59
5.2.6	Die Hemmung des ERK/MAPK Signalweges durch UO126 hat keinen Einfluss auf die Reaktivierung von HIV	60
6.	<u>Diskussion</u>	62
6.1	Die Wirkung von Antioxidantien auf den Verlauf der Apoptose in verschiedenen Zellmodellen	62
6.1.1	Hypothesen über den durch BHA induzierten Signalweg in A3.01	62
6.1.2	Auch E6-1 Jurkat-Zellen könnten einen alternativen Signalweg aufweisen	64
6.1.3	Erklärung der unterschiedlichen Wirkung von BHA mithilfe der Einteilung der Zellen in zwei unterschiedliche Zelltypen	65
6.1.4	Mechanismus der durch NAC vermittelten Hemmung der Apoptose	68
6.1.5	Die Abhängigkeit des Phosphatidylserin-Flipflops von der Apoptose	68
6.2	Die Reaktivierung von HIV in chronisch infizierten Zellen durch CpG-ODNs	70
6.2.1	CpG-ODNs reaktivieren HIV direkt	70
6.2.2	Der stimulatorische Effekt von CpG-Motiven ist in T-Zellen nicht stark genug für eine Aktivierung der Zellen	71
6.2.3	Die Rolle von NFkB in der Reaktivierung von HIV durch CpG ODNs	72
6.2.4	Die Rolle des ERK/MAP-Kinase Signalweges bei der Reaktivierung von HIV	75
6.2.5	Modell der Reaktivierung von HIV durch das Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktore	75

6.2.6	Die Bedeutung der Reaktivierung von HIV durch CpG-ODNs im Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten	78
<u>7.</u>	<u>Zusammenfassung</u>	79
<u>8.</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	81

1. Einleitung

1.1 Die physiologische Bedeutung der Apoptose

Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet (PCD, engl.: programmed cell death), bedeutet das gezielt gesteuerte Absterben von Zellen. Dieser Prozess gewährleistet die Homöostase in Geweben, Zellverbänden und Zellgruppen, von der Embryonalentwicklung bis ins Alter: Durch diesen Vorgang wird sichergestellt, dass sich ontogenetische Relikte, die in verschiedenen Embryonalstadien noch sehr ausgeprägt sind, wie etwa Schwimmhäute zwischen den Händen und Füßen, zurückbilden. Des Weiteren sorgt der PCD bei der Reifung des Immunsystems für den Untergang von autoimmunaggressiven Lymphozyten und am Ende einer Immunreaktion für die Destruktion aktivierter Zellen. Auch am Zellumsatz von sich regenerierenden Zellen, wie sie in der Epidermis, dem Endometrium, oder dem Darmepithel vorkommen, ist die Apoptose maßgeblich beteiligt [1].

Allerdings kann eine Fehlregulation des PCD auch zu Erkrankungen führen: Eine überschießende Apoptose ist zum Beispiel bei Krankheitsbildern wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson zu beobachten. Andererseits treten bei einer verminderten Apoptoseaktivität gehäuft tumoröse Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen auf [1].

1.1.1 Die morphologischen Veränderungen in Folge von Apoptose

Apoptose kann jedoch nicht mit einer akzidentiellen Nekrose gleichgesetzt werden. Nekrose zieht als wesentliches Merkmal eine inflammatorische Reaktion nach sich, mit darauf folgender Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Eventuell wird sogar ein Ersatzgewebe ausgebildet, das die Funktion des Zellverbandes nicht mehr erfüllen kann.

So wurde der Begriff der Apoptose von Kerr et al. 1972 [2] als Muster morphologischer Veränderungen in Verbindung mit dem normalem PCD und verschiedenen pathologischen Prozessen *in vivo* postuliert.

Der Vorgang ist gekennzeichnet durch Zellschrumpfung, Verlust des Zell-Zellkontaktes, Chromatinkondensation und Spaltung der DNA in charakteristische 180 Basenpaare (bp, engl.: base pairs) (Größe eines Nukleosoms). Dabei bleibt die Membranintegrität erhalten, es kommt nicht zu einer Entzündungsreaktion.

Die Beseitigung der so zugrunde gegangenen Zellen durch Makrophagen wird vermutlich durch Änderungen an der Zelloberfläche ausgelöst. Eine davon ist der Flip-Flop von Phosphatidylserin von der inneren Schicht der Plasmamembran auf die äußere [3].

Im Gegensatz dazu ist die Nekrose gekennzeichnet durch Zellschwellung, Ruptur der Zellmembran und Austritt cytoplasmatischer Komponenten. Sie wird von einer Entzündungsreaktion begleitet und benachbartes Gewebe wird geschädigt.

Die Signalwege beider Vorgänge scheinen aber nicht so strikt voneinander getrennt zu sein wie bisher angenommen, da die Apoptose oft von einer sekundären Nekrose begleitet wird [4]. Zudem werden sowohl Apoptose als auch Nekrose von denselben biochemischen Parametern, wie etwa der Konzentration an intrazellulärem ATP, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS; engl.: reactive oxygen species) oder Ca^{2+} ausgelöst (rev in [5]). Bei der Untersuchung der Signalkaskaden konnte man feststellen, dass die Aufteilung in Caspase-abhängige Wege bei der Apoptose und Caspase-unabhängige Wege bei der Nekrose nicht aufrechterhalten werden kann [6]. Es existieren nämlich ebenso Caspase-unabhängige Signalwege bei der Apoptose [7].

Eine neue Klassifizierung der Apoptose teilt den PCD nach den morphologischen Kennzeichen der Chromatinkondensation in drei Kategorien ein: die klassische Apoptose (engl.: classical apoptosis), der Apoptose-ähnliche PCD (engl.: apoptosis-like PCD), und der Nekrose-ähnliche PCD (engl.: necrosis-like PCD) [6]. Abbildung 1 zeigt die Charakteristika der Untergruppen. Auf die Details der unterschiedlichen Signalkaskaden wird im weiteren Verlauf noch genauer eingegangen werden.

Die klassische Apoptose ist gekennzeichnet durch eine Chromatinkondensation vom Typ 2, das heißt, die DNA liegt in 180 bp Segmenten vor, was der Größe eines Nukleosoms entspricht. Von einer Typ 1 Kondensation dagegen spricht man bei einer weniger kompakten Aufteilung, bei der das Chromatin in 50 bp Segmenten kondensiert ist, wie man es bei dem apoptoseähnliche PCD beobachten kann [8].

Keine Chromatinkondensation oder nur eine geringgradige Verklumpung des Chromatins ist bezeichnend für den Nekrose-ähnlichen PCD [9, 10]. Dadurch ist er morphologisch nicht von der reinen Nekrose zu unterscheiden, stellt aber im Gegensatz zu dieser einen aktiven Zellprozess dar, der von Proteaseinhibitoren, Bcl-2 (eine Familie von anti- und proapoptotischen Proteinen), und anderen Modulatoren beeinflusst und eventuell sogar unterbrochen werden kann [11] [12] (Tab. 1.1). Außerdem können auch beim Nekrose-ähnlichen PCD sämtliche Apoptosezeichen wie Zellschrumpfung, Phosphatidylserin-Flip-Flop, Aktivierung von Caspasen, usw. in Erscheinung treten [6].

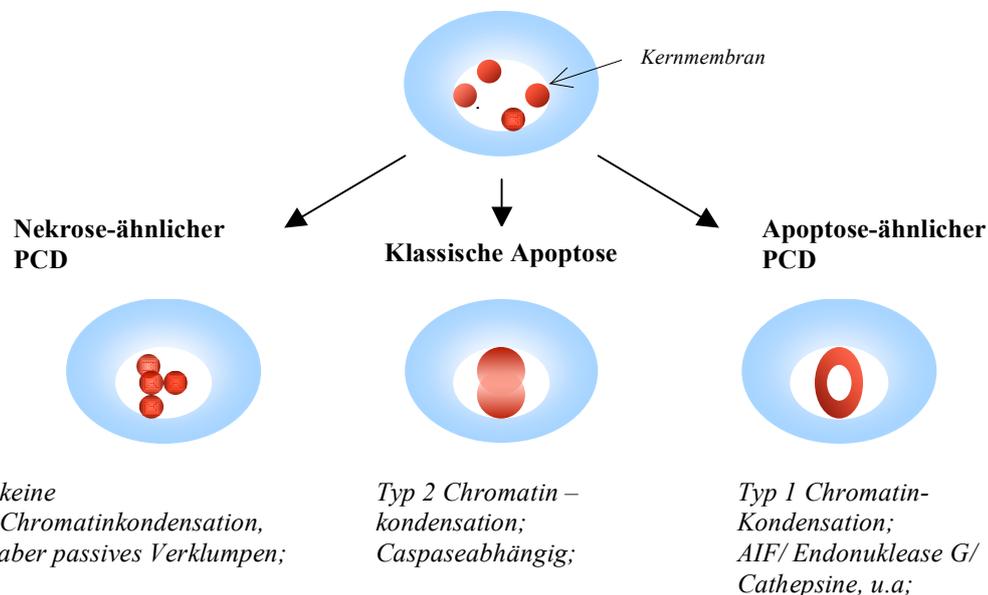


Abb.1.1.1: Unterteilung der verschiedenen Formen des PCDs anhand der Chromatinkondensation (mod. nach [13]).

1.1.2 Auslöser der Apoptose

Während die Nekrose relativ unspezifisch nach einer Schädigung der Zelle erfolgt, muss die Apoptose durch bestimmte Auslöser initiiert werden. Der PCD wird von

verschiedenen Stimuli veranlasst. Beispielsweise werden bestimmte Rezeptoren (engl.: death receptors; Todesrezeptoren) auf der Zelloberfläche stimuliert. Auch DNA-schädigende Noxen wie UV-Strahlung, radioaktive Strahlung, Oxidantien und chemische Toxine können Apoptose auslösen. Alle diese Initiatoren aktivieren entweder direkt oder indirekt eine Kaskade von proteolytischen Caspasen, die schließlich die Chromatinkondensation und alle anderen Apoptosereaktionen einleiten. In letzter Zeit wird jedoch auch ein Caspase-unabhängiger Signalweg in Betracht gezogen [7].

Während Noxen die Apoptose relativ unspezifisch einleiten, werden die Todesrezeptoren, von denen der bedeutendste CD95 (syn: Apo 1 (apoptosis 1), Fas (fibroblast activated)) ist, von spezifischen Proteinen, den CD95-Liganden (CD95L; syn: Fas-Ligand) aktiviert.

Der CD95-Rezeptor gehört zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren, die als transmembrane Glykoproteine vom Typ 1 (N-Terminus extrazellulär) in die Plasmamembran eingebettet sind. Die Ligandenbindungsstelle liegt an einer extrazellulären, cysteinreichen Domäne, die Signalweitergabe erfolgt über die cytoplasmatische Domäne. Es fügen sich jeweils drei durch intracysteine Disulfidbrücken stabilisierte Rezeptoren zu einem Komplex zusammen, die durch wiederum drei CD95- Liganden aktiviert werden [14]. CD95L liegt entweder membrangebunden oder als zirkulierendes Homotrimer vor. Nach der Clusterbildung des CD95L mit dem Rezeptor kommt es zur Assoziation der Todesdomäne (DD; engl.: death domain) des Rezeptors auf der cytoplasmatischen Seite [15]. Nun kann ein Adaptermolekül (FADD, syn: Mort 1) mit seiner Todesdomäne an die cytosolische Seite des Rezeptors binden. Durch diese Interaktion wird die Todes-Effektor-Domäne (DED; engl.: death effector domain) des FADD aktiviert und bindet an die DED der Caspase 8 (syn: FLICE 1, MACH 1) [15]. Die durch diesen Todeskomplex (DISC; engl.: death inducing complex) aktivierte Caspase 8 spaltet und aktiviert andere Caspasen, die über viele unterschiedliche Wege schließlich zum Untergang der Zelle führen [16]. Abbildung 1.3 stellt einen schematischen Überblick der Reaktionswege dar.

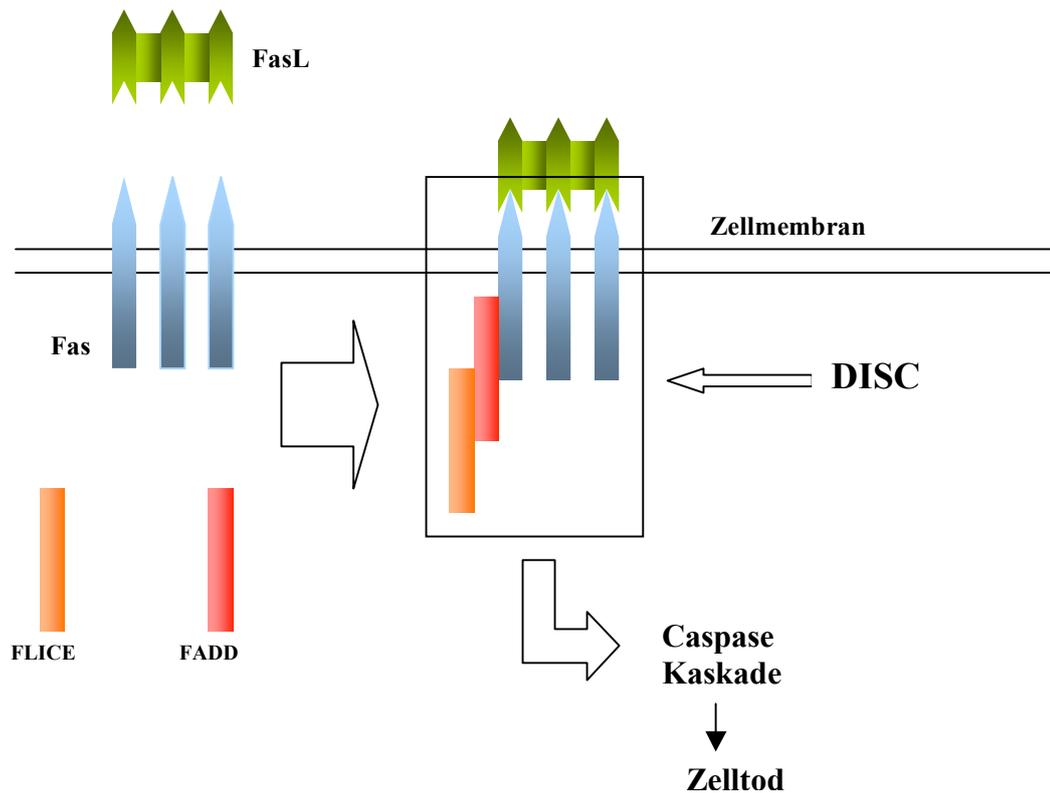


Abb.1.1.2: Schema der CD95/CD95L Reaktionskaskade (mod. nach [17])

Doch nicht nur dieser Reaktionsweg bestimmt den Ablauf der Apoptose, auch viele andere Zellorganellen, sowie verschiedene Inhibitoren und Aktivatoren (s. Tab. 1.1) sind am Zelluntergang beteiligt, wie im Nachfolgenden dargestellt werden soll.

1.1.3 Die Rolle der Mitochondrien

Eine zentrale Bedeutung bei dem PCD spielt die Störung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP; engl.: mitochondrial outer membrane permeabilization). Das mitochondriale Membranpotential steht überwiegend unter der Kontrolle von Proteinen der Bcl-2 Superfamilie, welche die Mitochondrien proapoptotisch (z.B. Bax, Bak) oder anti-apoptotisch (bcl-2, bcl-xL) beeinflussen (s. Tab. 1.1) [18]. Die Signalwege, die durch die Aktivierung dieser Proteine ausgelöst werden,

sind sehr verschieden und können sowohl Caspase-abhängig, als auch -unabhängig verlaufen:

Bei der klassischen Apoptose kommt es in Folge der Aktivierung der Caspase 8 zur Störung des transmembranen Potentials der äußeren Membran (MOMP), woraufhin Cytochrom c (ein Enzym der mitochondrialen Respiration) aus dem interzellulären Spalt freigesetzt wird [19]. Zusammen mit anderen Faktoren, wie Apaf-1 (apoptotischer Protease-aktivierender Faktor 1; engl.: apoptotic protease-activating factor 1), ATP, und Caspase 9 bildet Cytochrom c einen Komplex, der ebenfalls die Capsasen-Kaskade in Gang setzt und somit zum Zelltod führt. Auch dieser Vorgang kann durch Inhibitoren der Apoptose (IAP; engl.: inhibitor of apoptosis) und ihre Gegenspieler (Proteine wie Smac und Omi) reguliert werden.

Der Apoptose-ähnliche PCD wird ebenfalls durch MOMP ausgelöst: Ein Apoptose-induzierender Faktor (AIP; engl.: apoptosis inducing factor)) wird hierbei aus den Mitochondrien freigesetzt und induziert im Nukleus die Caspase-unabhängige Formation von 50 bp Fragmenten (Typ 1 Chromatinkondensation) [8]. Endonuklease G, Omi und andere Faktoren sind ebenso dazu in der Lage, die DNA-Fragmentation einzuleiten [20].

PCD vom nekrotischen Typ dagegen wird über einen Tumornekrosefaktor (TNF; engl.: tumor necrosis factor) eingeleitet. TNF wird dabei von reaktiven Sauerstoffspezies induziert. Dieser Vorgang kann durch Antioxidantien und Serinprotease-Inhibitoren verhindert werden [21].

Meist ist nicht nur einer dieser Signalwege aktiviert, sondern sie laufen nebeneinander ab und induzieren sich gegenseitig. Welcher Vorgang schließlich überwiegt liegt auch an der Schnelle des jeweiligen Weges.

Inhibitoren der Apoptose

FAP 1	Labiler Inhibitor des Fas Rezeptors
Decoy	Verhindert die Induktion des Todessignals durch Bindung des Liganden
FLIP	Hemmt die Aktivierung der Caspasen 8 und 10
Y/ZVAD-fmk	Hemmt die Caspase 1 und 3

DEVD-fmk	Hemmt die Caspase 3
VEID-fmk	Hemmt die Caspase 6
CrmA	Blockiert Granzyme B, Caspase 1,3 u.a.
p35	Hemmt Caspase 1 und 3
XIAP	Hemmt die von Cytochrom c eingeleitete Kerndestruktion und Caspasen 1,3
Bcl-2	Anti- apoptotische Proteine der Bcl-2 Superfamilie
Bcl-xL	
Bcl-w	
Mcl-1	
A1/Bfl-1	
Boo/Diva	
Nr-13	

Aktivatoren der Apoptose

Apaf 1-3	Aktiviert die Caspase 3
Bax	Pro- Apoptotische Proteine der Bcl-2 Superfamilie
Bak	
Bok/Mtd	
Bid Bad Bik/Nbk Blk Noxa/Puma u.v.a.	BH3- only: Bcl-2 Superfamilie Inhibieren die anti- apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie oder aktivieren die pro- apoptotischen durch Bindung mit ihnen

Tabelle 1.1.1 Übersicht über pro- und antiapoptotische Transmitter

1.1.4 Reaktive Sauerstoffspezies

ROS entstehen zum Beispiel im Rahmen der biologischen Zellatmung, als Nebenprodukt der Elektronentransportkette in den Mitochondrien, aus Superoxidradikalanionen ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$). Diese werden anschließend durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid reduziert ($O_2^{\bullet -} + e^- + H_2O \rightarrow H_2O_2$). Wasserstoffperoxid wird durch die Katalase und die Glutathion-Peroxidase zu 2 H₂O

und O₂ bzw. Glutathion-Disulfid (GSSG) entgiftet. Falls jedoch die zellulären Vorräte erschöpft sind, oder Wasserstoffperoxid im Überschuss gebildet wird, wie dies bei oxidativem Stress durch chemische und physikalische Noxen, aber auch bei Apoptose-Stimuli beobachtet wird, versagen diese Entgiftungsmechanismen. Aus H₂O₂ wird nun unter Oxidation von zweiwertigem Eisen das reaktivste Radikal, das Hydroxylradikal (OH[•]) gebildet (FENTON-Reaktion). Durch sein hohes Reduktionspotential ist das Hydroxylradikal in der Lage, mit vielen Molekülen der Zelle sehr schnell zu reagieren. So können sowohl OH[•], als auch andere ROS Enzyme und Proteine inaktivieren, zur Lipidperoxidation führen, und hierdurch zur Apoptoseinduktion und -exekution mit beitragen. Doch nicht nur über die direkte Oxidation ist eine Schädigung möglich: auch durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ist eine pro-apoptotische Wirkung gegeben (s.u.).

1.1.5 Die Funktion der Lysosomen

Als weiteres Zellorganell kontrollieren die Lysosomen mit ihren Enzymen (z.B. den Cathepsinen) den PCD. Noch bevor die ersten morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zelle sichtbar werden, ist schon eine hohe cytoplasmatische Konzentration von Cathepsinen messbar [22]. Diese Enzyme, besonders Cathepsin B und L, sind in allen Formen des PCD vorzufinden. Sie werden von vielfältigen Mechanismen, wie TNF-Rezeptoren, Oxidantien oder Caspasen aktiviert, agieren in Caspase-abhängigen und -unabhängigen Signalwegen, sind Caspasen vor- oder aber auch nachgeschaltet. Ihre Funktion und ihre Substrate sind also in jeder Hinsicht den Aufgaben der Caspasen ähnlich.

Da Cathepsine normalerweise als ziemlich unspezifische Digestivenzyme bekannt sind, die auf Stressreize unkontrollierten Zellschaden zufügen, stellt sich die Frage, wie sie solch spezifische Aufgaben erfüllen können. Es zeigt sich jedoch, dass die relativ unspezifische Exopeptidase im neutralen pH des Cytosols weitgehend inaktiviert wird, während die spezifische Endopeptidase nur teilweise ihre Aktivität verliert [23]. Die Einzelheiten der lysosomalen Funktionen im Rahmen der Apoptose sind aber noch im Unklaren.

1.1.6 Das Endoplasmatische Retikulum und Calcium

Das endoplasmatische Retikulum verfügt über zwei Mechanismen, um die Apoptose einzuleiten. Sowohl eine Akkumulation von denaturierten Proteinen, als auch eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration initiiert MOMP und zieht so die unterschiedlichen Formen des PCD nach sich [18].

Calcium kann aber auch selbst den Apoptosesignalweg einleiten: Bei einem Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration werden Calpaine, Cysteinproteasen, ATPasen, Proteasen, Phospholipasen und Endonukleasen in ihre aktive Form überführt, und können nun die Zelle auf vielfältige Art und Weise zu schädigen z.B. durch Inaktivierung von Proteinen oder Fragmentation von DNA [24].

1.1.7 Apoptose in T-Lymphozyten

Apoptose erfüllt als kontrollierendes Element eine wichtige Rolle für die Entwicklung von T-Lymphozyten. Nach einer Immunantwort auf ein Antigen sorgt sie für die Elimination von aktivierten T-Zellen, um Autoimmunität zu verhindern und das Zellgleichgewicht aufrechtzuerhalten [25].

Dabei können zwei unterschiedliche Modelle beobachtet werden: der durch Aktivierung induzierte Zelltod (AICD; engl.: activation-induced cell death) und der von aktivierten T-Zellen selbstständig herbeigeführte Tod (ACAD; engl.: activated t-cell autonomous death).

AICD wird hauptsächlich durch die Expression von CD95 und CD95L ausgelöst [26] [27]. ACAD dagegen scheint unabhängig von CD95 abzulaufen [21]. Diese Art von Zelltod wird durch die oben schon besprochenen Caspase-unabhängigen Signalwege, durch das pro-apoptotische BH3-Mitglied Bim und eine Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies bewirkt [28]. Obwohl sämtliche Anzeichen der Apoptose, wie Phosphatidylserin-Flipflop, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und DNA-Fragmentation beobachtet wurden, berichteten manche Gruppen von einer sekundären Nekrose bei dieser Variante des Zelltods [21].

1.1.8 Antioxidantien und Apoptose

In vielen Studien wurde nachgewiesen, dass Antioxidantien wie Thiole die Apoptose abschwächen und sogar hemmen können [29] [30].

Dabei wurde anfangs großes Augenmerk auf reaktive Sauerstoffspezies als direkte Gegenspieler der Antioxidantien gelegt. So wurde angenommen, dass bei Apoptoseformen, die in der Exekutionsphase eine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, oder eine Zerstörung bzw. Erschöpfung der zellulären Glutathionreserven auslösen, Antioxidantien diese physiologischen Depots wieder auffüllen, bzw. direkt helfen, die reaktiven Sauerstoffspezies zu neutralisieren [31]. Allerdings wurde schnell klar, dass noch andere Mechanismen beteiligt sein müssen: auch bei Apoptoseformen, die primär auf den CD95-Signalweg angewiesen sind, und bei welchen die Exekutionsphase unabhängig von reaktiven Sauerstoffspezies ist, sind Antioxidantien potente Apoptoseinhibitoren [29]. Als Erklärung wird angenommen, dass reaktive Sauerstoffspezies nicht nur in der Exekutionsphase der Apoptose (wie etwa bei der Nekrose-ähnlichen Apoptose) eine Rolle spielen: auch die Regulation der Expression von CD95L ist ein Redox-kontrollierter Vorgang. Verschiedene Forschungsarbeiten zeigen, dass Antioxidantien die Expression von CD95L verringern. Die Hemmung der CD95L-Expression geht mit einer verringerten DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NFκB einher [29], der unter dem Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies gebildet wird (Übersichtsartikel [32]). Die Inhibition von NFκB durch IκB hemmt ebenfalls die CD95L-Expression [29]. Daraus wird geschlussfolgert, dass Antioxidantien der von reaktiven Sauerstoffspezies induzierten Produktion von Transkriptionsfaktoren wie NFκB und AP-1 entgegenwirken können und somit die Expression von CD95L gestört wird. Als Indiz dafür wird die Identifizierung einer NFκB-Bindungsstelle innerhalb des CD95L Promoters angesehen [33]. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass Antioxidantien als Gegenspieler von reaktiven Sauerstoffspezies sowohl in der Initiation, als auch der Exekution der Apoptose eine bedeutende Rolle spielen, abhängig von dem jeweils vorherrschenden Apoptosetyp.

1.2 HIV und AIDS – ein Rückblick auf die Anfänge der Forschung und die Entwicklung der Epidemiologie

Seit Ärzte in New York und Kalifornien 1981 erstmals das gehäufte Auftreten von seltenen Erkrankungen wie Kaposi Sarkom, Pneumocystis carinii Infektionen oder persistierende Lymphadenopathien in einer Gruppe junger homosexueller Männer beobachteten [34], hat das Krankheitsbild, das später unter dem Namen AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) traurige Berühmtheit erlangte, den gesamten Erdball erobert. Das Syndrom geht einher mit einem immunologischen Defizit, das durch eine Verminderung der zirkulierenden CD4+ T-Zellen erklärt werden kann.

Nachdem zuerst unterschiedlichste Vermutungen über die möglichen Ursachen angestellt wurden, wurde bald klar, dass die neue Krankheit durch Mikroorganismen, die über Blut und andere Körperflüssigkeiten übertragen werden, hervorgerufen wird. Viele Forscher verdächtigten eine neue Spezies von Retroviren: die damals gerade erst entdeckten Retroviren HTLV I und II waren bekannt für eine Infektion der CD4+ Zellen, die nachfolgend Immunschwäche verursacht [35]. Tatsächlich gelang es 1983 französischen Forschern um Luc Montagnier das Virus zu isolieren [36]. Im darauf folgenden Jahr wurde die Zugehörigkeit des Virus zur Familie der Retroviren durch Klonierung und Sequenzierung des Genoms bestätigt. Es gehört zur Gruppe der Lentiviren und erhielt den Namen HIV (engl.: human immunodeficiency virus; humanes Immunschwäche Virus) [37]. Nach anfänglichem Optimismus, bald eine Impfung gegen den neuen Erreger zu entwickeln, zeigten sich bald die Grenzen des Wissensstandes der Forschung: die Mechanismen von Infektion und Persistenz des Virus waren, und sind zum Teil bis heute, unverstanden.

Die Versuche, eine Vaccine gegen das Virus zu finden, scheiterten an vielen verschiedenen Tatsachen. Das Virus lässt sich nicht nur in die Spezies HIV-1 und HIV-2 einteilen, es existieren zudem viele verschiedene Mutanten, auch Quasispezies genannt, die durchaus auch in ein- und demselben Individuum nebeneinander auftreten können. Diese entstehen durch Ungenauigkeiten bei der Replikation des Virus. Zusätzlich sorgt die Anwendung von antiviralen Medikamenten, von denen als erstes Zidovudin 1987 lizenziert wurde, für einen größeren Selektionsdruck und ein erhöhtes Auftreten von Mutanten.

Verschiedene alternative Interventionsmöglichkeiten ergaben sich erst durch Erweiterung des Wissens im Bereich der Immunologie: So wurden die „Eintrittspforten“ (die Membranrezeptoren CD4, CXCR4, CCR5) des Virus auf den CD4+ T-Zellen identifiziert [38]. Weitere Erkenntnisse über Fusionsproteine, Reverse Transkriptase und Proteinasen führten schließlich zur Entwicklung neuerer Medikamente [39]. Für effektivere Medikamente wird der Pathomechanismus des Virus noch genauer verstanden werden müssen.

Trotz intensiver Bemühungen, die Verbreitung des Virus zu verhindern, infizierten sich bis zum Jahr 2003 über 60 Millionen Menschen weltweit, von denen etwa bereits ein Drittel an den Folgen der Erkrankung verstarben [40]. Epidemieherde entwickelten sich vor allem in den Ländern der Dritten Welt, wo über 95% aller Infizierten leben [41]. Ansteigende Infektionszahlen sind in letzter Zeit in Osteuropa und Asien zu beobachten [42]. Der Anteil der erkrankten Frauen nimmt dabei immer mehr zu. Erfreulicherweise verzeichnen die Bemühungen von Hilfsorganisationen, durch soziale Beratung und Unterricht in kleinen Gruppen die Sensibilität für die Erkrankungsursachen zu erhöhen, Erfolge [43].

Die klinischen Kennzeichen der Erkrankung, der Aufbau des Virus, der Pathomechanismus von HIV und Möglichkeiten zur Entwicklung wirksamerer Medikamente soll im nachfolgenden näher erklärt werden.

1.2.1 Das klinische Bild der HIV-Infektion

Bereits wenige Wochen nach der Ansteckung kommt es bei bis zur Hälfte aller Infizierten zu dem akuten Krankheitsbild der generalisierten, persistierenden Lymphadenopathie. Symptome sind Lymphknotenschwellung, Pharyngitis, Exantheme, und Fieber. Begleitet wird dieses Stadium von einer hohen Virämie, einer schnellen Virusreplikation und einem deutlichen Abfall der T-Helferzellen. Darauf folgt meist eine Zeit der klinischen Latenz, die bis zu 10 Jahre betragen kann: das Immunsystem kämpft gegen das sich schnell replizierende Virus an, wobei etwa 10^8 Virionen täglich produziert werden und etwa 2×10^9 CD4+ T-Zellen pro Tag ersetzt werden [44]. Im symptomatischen Stadium schließlich tritt eine zunehmende Schwächung des

Immunsystems auf, begleitet von opportunistischen Infektionen (mit z.B. VZV, humanen Papillomaviren, CMV, Candida species, Parasiten). Dieses Stadium ist begleitet von einer hohen Virus-RNA-Last im Plasma. Das Vollbild AIDS tritt ab CD4+ Zellzahlen von unter 200/ μ l auf. Kennzeichnend sind, um nur einige Symptome zu nennen, HIV-Enzephalopathie, Kaposi-Syndrom, Pneumocystis-carinii Pneumonien und Kachexie, an welchen der Großteil der Patienten innerhalb von 2 Jahren verstirbt. Ursächlich für alle Symptome ist dabei der stete Abfall der CD4+ T-Zellen.

1.2.2 Klassifikation, Morphologie und Replikationszyklus des HI- Virus

Unter dem Elektronenmikroskop erscheint das HI-Virus als kleines, kugeliges Gebilde mit einem Durchmesser von 0,1 μ m. Sein zweisträngiges RNA-Genom wird umgeben von einer Hülle, der Matrix und dem Kapsid.

Im Gegensatz zur äußeren Hülle, die aus der Zellmembran der Wirtszelle besteht, wird das in ihr verankerte Glykoprotein gp41 (41 kDa) und das nichtkovalent daran gebundene gp120 (120 kDa) von Virus-RNA kodiert. Das darunterliegende Matrixprotein p17 dient der Aufrechterhaltung von Struktur und Integrität des Virus. Umschlossen wird die virale RNA zusätzlich noch von einem Kapsid, welches aus dem monomeren Protein p24 besteht. Auch die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Proteinase befinden sich innerhalb des Kapsids. Abb. 1.2.1 zeigt eine schematische Darstellung der Virusstruktur.

Das HIV Genom setzt sich aus neun Genen zusammen, die von LTRs (engl.: long terminal repeats; lange terminale Wiederholungen) umgeben sind, welche wichtig für die Integration der Virus cDNA sind und Bindungsstellen für genregulierende Proteine besitzen. Die Gene Gag und Env kodieren dabei für Strukturproteine (für die Hüll-, Kapsid-, und Matrixproteine), Pol für enzymatische Proteine (Reverse Transkriptase, Integrase, Proteinase), Tat und Rev sind Regulationsproteine. Die Gruppe der akzessorischen Proteine Vif, Nef, Vpu und Vpr spielt eine Rolle in der virale Replikation [45].

HIV gehört als Lentivirus (von lat. lentus, langsam) in die Gruppe der Retroviren. Diese Art Viren enthalten das Enzym Reverse Transkriptase, das sie befähigt, die zwei Kopien

ihres RNA-Genoms in DNA umzuschreiben. Diese wird dann mit Hilfe der viruseigenen Integrase ins Chromosom der Wirtszelle integriert. Die von ihr stammenden RNA-Transkripte sorgen als mRNA für die Synthese viraler Proteine, oder bilden das RNA-Genom für neue Virionen.

Wenn die Zelle aktiviert wird, beginnt die Transkription des Provirus in geringem Maße. Es werden vor allem die frühen Gene Tat und Rev translatiert, welche für die Erhöhung der Transkriptionsrate (Tat), und des Transports (un-) gespleißter viraler RNA aus dem Zellkern ins Cytoplasma (Rev), sorgen. Die Struktur- und Regulationsenzyme werden später translatiert.

Da Gag und Pol mRNAs zu langen Polypeptidketten translatiert werden, müssen sie von einer zellulären Protease in die funktionellen Proteine aufgespalten werden. Erst durch diese Protease wird das gp160 in die funktionellen gp120 und gp41 gespalten, die in Form von Trimeren in die Virushülle eingebaut werden. Nachdem die Viruspartikel in der Zelle zusammengesetzt worden sind, verlassen sie die Zelle durch Abschnürung vom Cytoplasma (engl.: budding), wobei die Lipiddoppelschicht der Zellmembran einen wichtigen Bestandteil für die Virushülle bildet.

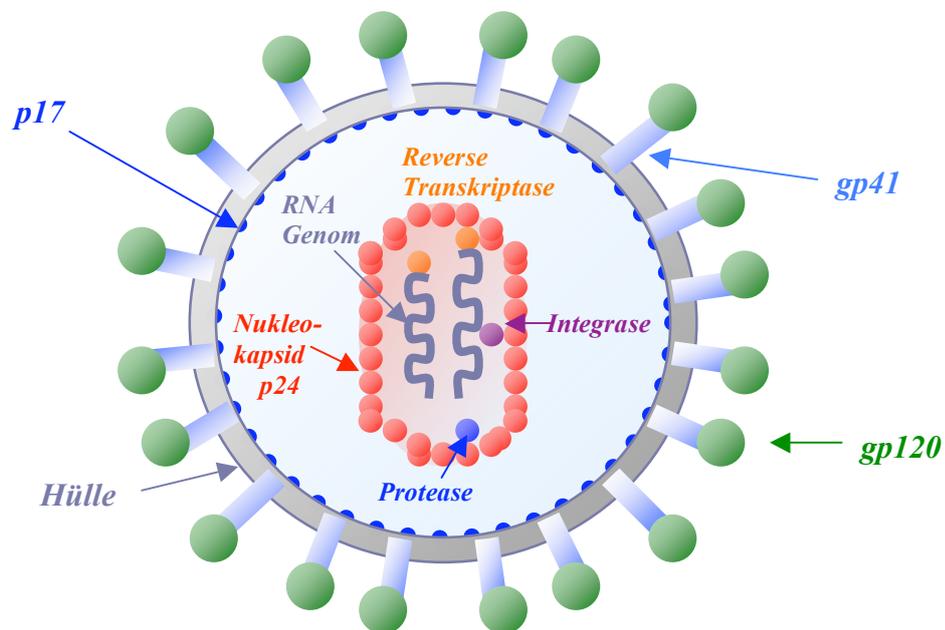


Abb. 1.2.1: Schematische Darstellung des HI- Virus

1.2.3 Pathogenese der HIV-Infektion

1.2.3.1 Die Transmission und akute Infektion

Das Virus wird durch Körperflüssigkeiten infizierter Personen, wie Blut, Sperma oder Vaginalsekret übertragen.

Nachdem das Virus in Kontakt mit der Körperoberfläche gekommen ist, gelangt es entweder über (Mikro-) Läsionen des Endothels (bzw. der Epidermis), oder über Transcytose durch das intakte Epithel in das darunterliegende Gewebe [46]. Dort infiziert es CD4-positive Zellen (CD4+ T-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen).

Der *CD4-Tropismus des Virus wird durch die* Hüllproteine gp120 und gp41 bestimmt:

HIV bindet über gp120 an den CD4-Rezeptor der Zielzelle. Dies bewirkt eine Konformationsveränderung von gp120, wodurch es nun zusätzlich mit seiner hypervariablen V3 Region an einen spezifischen Chemokinrezeptor (entweder CXCR4 oder CCR5), der als Corezeptor fungiert, binden kann [47] [48]. Durch diese Interaktion wird gp41 für die folgende Interaktion mit der Zellmembran der Zielzelle frei zugänglich, was die Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran der Wirtszelle bewirkt.

Durch die unterschiedliche Nutzung der Rezeptoren CCR5 und CXCR4 können zwei Quasispezies unterschieden werden, die R5 und die X4 Variante [49]. Übertragen werden vor allem die R5 Stämme, da R5-HIV von Epithelzellen selektiv eingefangen wird; später treten die X4 Stämme in den Vordergrund [50]. Die große Bedeutung dieser Corezeptoren zeigt sich in der Beobachtung, dass Individuen, die homozygot eine Deletion von 32 Basenpaaren in CCR5 aufweisen ($\Delta 32$ -CCR Polymorphismus), immun gegenüber einer Infektion mit HIV-1 sind [51]. Auch die natürlichen Liganden der Chemokinrezeptoren, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES können die Bindung des Virus an die Zielzelle verhindern [52].

Makrophagen und dendritische Zellen (DCs; engl.: dendritic cells) stellen ebenfalls Primärziele für HIV dar: dendritische Zellen können mithilfe ihres C-Typ Lektinrezeptors DC-SIGN Virionen einfangen, und sie entweder an CD4+ T-Zellen weitergeben, oder selbst infiziert werden. Nach dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle erfolgt die reverse Transkription, Integration und Expression der viralen RNA. Diese Vorgänge wurden bereits in 1.2.2 beschrieben.

1.2.3.2 Die Bedeutung der Infektion von unterschiedlichen Zellarten

Wie bereits angedeutet infiziert HIV neben CD4+ T-Zellen auch Makrophagen und dendritische Zellen. Dabei hat sich vor allem die Persistenz von HIV in ruhenden Zellen zu einem großen Problem in der Therapie entwickelt [53].

In aktivierten T-Zellen erfolgt die Virusreplikation schnell: Die LTRs des Virusgenoms besitzen Bindungsstellen für zelluläre Faktoren, welche die Transkription von HIV hochregulieren. Das virale Protein Tat erzielt durch Bindung des zellulären Faktors Cyclin-T1 eine weitere Erhöhung der Transkriptionsrate [54].

Im Gegensatz dazu scheinen ruhende T-Zellen kein Virus zu exprimieren, auch wenn in ihnen das Virus persistiert [55]. Nach einer Aktivierung können sie die Virusproduktion wieder aufnehmen, was bei AIDS Patienten nach einer Behandlung mit einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART; engl.: highly active antiretroviral therapy, s. 1.2.5) zu einem Wiederaufflammen der Virämie führt. Ruhende Zellen im G₀ Stadium sind jedoch infektionsrefraktär [56]; die Infektion muss also in einem frühen Stadium des Zellzyklus erfolgen, erst danach tritt sie in die Ruhephase ein. Es wurden mehrere Faktoren identifiziert, welche die Infektion von Zellen in diesem frühen Zellzyklus begünstigen: So wird postuliert, dass HIV-1 Nef dem Virus den Eintritt in ruhende Zellen erleichtert [57], oder dass infizierte Makrophagen Nef-abhängig Cytokine exprimieren [58].

Makrophagen, die bevorzugt über den CCR5 Corezeptor infiziert werden, spielen eine große Rolle als ruhendes Virusreservoir, das die Virämie unter antiretroviraler Therapie unterhält. Außerdem wird vermutet, dass Makrophagen die Etablierung der Infektion, die Weitergabe des Virus an CD4+ T-Zellen und die Sensibilisierung ruhender Zellen durch Cytokine (s.o.) begünstigen [58].

Dendritische Zellen werden entweder direkt infiziert oder fangen Virionen (über DC-SIGN) ein, die sie dann an CD4+ T-Zellen weitergeben. Zudem wirken sie über verschiedene Signale verstärkend auf die Replikationsrate infizierter Zellen.

Die langlebigen dendritischen Zellen und ruhenden T-Zellen stellen also ein bedeutendes Problem in der Therapie der HIV-Infektion dar, da sie die Virämie aufrechterhalten, und nach Unterbrechung der Therapie für ein Wiederaufflammen der Infektion verantwortlich sind.

1.2.3.3 Förderung und Hemmung der Virusreplikation durch zelluläre Faktoren

Um dem Variantenreichtum und der hohen Replikationsrate bei gleichzeitigem Versagen der immunologischen Abwehrfunktionen entgegenzutreten, muss auch das Wissen auf molekularer Basis erweitert werden. Zahlreiche zelluläre Faktoren, die durch Interaktion mit den Genprodukten des Virus die Replikationsrate hemmen oder fördern, sind bis heute identifiziert worden. Einen Überblick über die wichtigsten Vertreter zeigt Tabelle 1.2.2.

Faktoren, welche die Replikation fördern

CXCR4/ CCR5	Ermöglicht Bindung des HI- Virus an die Zielzelle;
NFAT	(nuclear factor of activated T- cells) Cofaktor für die Reverse Transkriptase; hilft die optimale DNA Integrationsstelle für die virale cDNA zu finden;
Cyclin-T1	Wird von Tat rekrutiert, da es die Effektivität der Replikation erhöht.
CRM-1(nukleäres Transportprotein)	wird von Rev benötigt, um die virale RNA vom Nukleus zur Transkriptionsstelle zu bringen;
Cyclophylina (Proteinfaltung)	Erhöht durch Assoziation mit Gag die Infektiosität; wird in Virione mit aufgenommen;
HP-68	Bindet an Gag; Bestandteil des viralen Core;
TSg-101	Interagiert mit Gag: fördert das „budding“, die Abschnürung fertiger Virionen vom Cytoplasma;

Faktoren, welche die Replikation hemmen

CEM-1	Blockiert die Virusreplikation auf noch ungeklärte Weise; wird durch Vif inhibiert;
REF-1	Hemmt die Infektion nach Viruseintritt in manchen Affenzelllinien;

Tab. 1.2.1: zelluläre Faktoren, die Einfluss auf die Replikationsrate nehmen

1.2.3.4 Ursachen des CD4+ T-Zell-Verlustes

Der Verlust der CD4+ T-Zellen wird durch verschiedene Mechanismen erklärt. Wirtszellen können direkt durch die Virusinfektion geschädigt werden, nicht infizierte Zellen gehen durch indirekte Auswirkungen des Virus zugrunde: vor allem zu Beginn einer Infektion ist eine rapide Abnahme der CD4+ T-Zellen zu beobachten, obwohl

angenommen wird, dass nur etwa 1 bis 9 von 1000 zirkulierenden CD4+ T-Zellen infiziert sind [59].

Als direkter, zellschädigender Faktor wird zum Beispiel das virale Env Glykoprotein und seine Fusionsaktivität mit der Zellmembran angesehen [60]. Folge der Fusion könnte eine Störung der Membranintegrität sein, welche zu Flüssigkeitseinstrom und Degeneration der Zelle führt [61]. Auch das Verlassen des fertigen Virions könnte die Zelle schädigen.

Weiterhin werden virale Proteine wie Vpr verdächtigt, die Apoptose von infizierten Zellen zu fördern [62].

Neben vielen anderen direkten Mechanismen, auf die hier nicht näher eingegangen wird, dürfen natürlich die verminderte Synthese zelleigener, lebenswichtiger Proteine und Lipide, sowie die Zerstörung durch zelluläre und humorale Immunantwort nicht vergessen werden.

Nicht infizierte Zellen werden auf andere Art und Weise beeinflusst. Schon alleine der Kontakt mit Virusbestandteilen soll einen cytopathischen Effekt auf nicht infizierte Zellen haben: frei zirkulierendes gp120 könnte nach Bindung an eine CD4+ T-Zelle direkt über Komplementaktivierung oder Immunreaktionen mit CD8+ T-Zellen zum Zelluntergang führen [63]; zellgebundenes gp160 bedingt die Zellfusion und Synzytienbildung mit gesunden Zellen [64]. Die vermehrte Expression von CD95L durch infizierte Zellen induziert die Apoptose benachbarter Zellen; das virale Protein Nef verstärkt die CD95L-Produktion und schützt die Zelle gleichzeitig vor dem Apoptosesignal [65].

1.2.4 Immunantwort auf HIV

Noch bevor Antikörper gegen HIV produziert werden, treten HIV-Peptid-spezifische T-Helfer-Zellen auf [66]. Danach erscheinen spezifische CD8+ T-Zellen.

Erst wenn die Virusreplikation schon voll in Gange ist, setzt die Produktion von Antikörpern, vor allem gegen die frühen HIV-Varianten, ein. Antikörper in HIV-positiven Seren verfügen über eine nur schwach neutralisierende Wirkung [67]. Es finden sich vor allem Antikörper gegen den hypervariablen V3 Loop, gegen die CD4-

Bindungsstelle der Virushülle und gegen das transmembrane gp41. Nur den Antikörpern gegen gp41 wird eine protektive Eigenschaft zugesprochen. Die V3-Antikörper dagegen sind isolatspezifisch (können also nur einen Teil der Virusspezies binden), und werden von der glykosilierten Virushülle sterisch an der Bindung behindert [68]. Bei bereits bestehender Infektion spielen sie also nur eine geringe protektive Rolle, sie erhöhen sogar noch die Selektion verschiedener Mutanten. Trotzdem wird vermutet, dass neutralisierende Antikörper zur Prävention einer HIV-Infektion genutzt werden könnten [69].

Schon früh erscheinen hohe Zahlen von spezifischen CD8 T-Lymphozyten im Serum, in den Lymphknoten, in der Haut, und in vielen anderen Geweben infizierter Individuen. Sie sind durch verschiedene Mechanismen in der Lage, dem HI-Virus entgegenzutreten: *in vitro* hemmen sie die virale Replikation [70]; durch das Erkennen viraler Bestandteile, die an MHC-Klasse-1-Molekülen infizierter Zellen gebunden sind, können CD8+ T-Zellen die infizierte Zelle lysieren [71]. Es hat sich gezeigt, dass bestimmte Varianten dieser MHC-1-Moleküle, nämlich die Typen HLA-B27 und HLA-B57 eine besonders gute Prognose für den Krankheitsverlauf aufweisen [72]. Zudem produzieren CD8+ T-Zellen Cytokine wie MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES, welche die Eintrittsrezeptoren der Viren blockieren können [52]. Spezifische CD4+ T-Zellen dienen wohl vor allem als Helfer bei der Erkennung infizierter Zellen und der Antikörperreaktion.

Trotz der Aktivierung von Antikörpern und CD8+ T-Zellen wird das Fortschreiten der Erkrankung nicht verhindert. Ursache ist vor allem die hohe Mutationsrate von HIV-1 (etwa 3×10^{-5} pro Aminosäure und Replikationszyklus), welche durch die Fehlerhaftigkeit der Reversen Transkriptase und durch den Selektionsdruck begünstigt wird. Folge ist eine große Variabilität der Proteine, die isolatspezifische Antikörper nicht mehr binden können, sowie eine Veränderung der Glykoside, die ebenfalls die Bindung von Antikörpern erschweren. Aber selbst Mutationen einzelner Aminosäuren in Virusepitopen, die notwendig für die Bindung an MHC-1-Moleküle sind, können vor der Erkennung durch CD8+ T-Zellen schützen.

1.2.5 Therapiemöglichkeiten

Nachdem 1987 Zidovudin als erstes antiretrovirales Medikament von der FDA (US Food and Drug Administration) zugelassen wurde, erschienen in den 90er Jahren weitere Medikamente, die in Kombination die Viruslast im Blut deutlich senken können. Allerdings kann die vollständige Elimination des Virus nicht erreicht werden. Es persistiert in ruhenden Zellen.

Ein sehr wirksames Behandlungsschema ist eine Tripelkombination (auch HAART: highly active antiretroviral therapy genannt). Dabei werden 2 Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI) und ein Proteaseinhibitor (PI) bzw. ein Nicht-nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor (NNRTI) eingesetzt.

NRTIs hemmen kompetitiv die Aktivität der Reversen Transkriptase: es kommt zum Kettenabbruch der proviralen DNA und die Infektion der Zelle wird verhindert. Beispiele für neuere NRTIs sind Abacavir, Didanosin, Tenofovir oder Lamivudin.

NNRTIs dagegen inhibieren die Transkription des viralen Genoms durch eine Konformationsänderung der aktiven Seite der Reversen Transkriptase: das Enzym wird blockiert und kann seine Aufgabe nicht mehr erfüllen. Zu ihnen gehören die Wirkstoffe Delavirdin, Efavirenz und Nevirapin.

Die seit 1995 zugelassenen Proteaseinhibitoren (z.B. Saquinavir, Ritonavir, Indinavir) greifen die virale Protease an. Dadurch können die Gag-Proteine des Virus nicht mehr gespalten werden, wodurch eine Reifung der Virionen zu infektiösen Partikeln verhindert wird.

Als neueste Medikamentengruppe zur Therapie des weit fortgeschrittenen AIDS und bei sonstigem Therapieversagen wurden am 13. März 2003 die Fusionsinhibitoren (Enfuvirtide) zugelassen [73]. Enfuvirtide blockieren die Fusion des Virus mit der Zielzelle: als Peptid der extrazellulären Domäne von gp41 kann es die Konformationsänderung des Hüllproteins, welche grundlegend für die Fusion ist, unterbinden.

Obwohl sich zurzeit mehrere Impfstoffe in der Phase der klinischen Prüfung befinden, gilt die Entwicklung einer verlässlichen Vaccine in den nächsten Jahren als nicht sehr wahrscheinlich. Probleme sind vor allem die hohe Mutationsrate, die ineffektive Bildung neutralisierender Antikörper, sowie die Schwierigkeit, CD8+ T-Zellen ohne

antigenpräsentierende dendritische Zellen zu stimulieren. Getestet werden derzeit Impfstoffe, die Immunogene in Form von viralen adjuvanten Peptiden und Proteinen enthalten, oder virale DNA mithilfe von Plasmiden [74] und Virusvektoren wie Canarypox und Adenovirus [75] in den Organismus einschleusen.

Große Hoffnung wird in letzter Zeit in die Entwicklung von Substanzen gelegt, welche die Virusreservoirs in ruhenden T-Zellen nach einer antiretroviralen Therapie stimulieren und zur Virusreplikation aktivieren, so dass sie einer Therapie zugänglich sind. Versuche, diese Reservoirs zu reaktivieren wurden schon mit verschiedenen Cytokinen, wie etwa IL-2 oder dem stimulierenden Antikörper OKT3 unternommen [76], die allerdings viele Nebenwirkungen aufweisen und deren Wirkung noch nicht gesichert sind. In dieser Arbeit wird versucht werden, mit bestimmten bakteriellen DNA-Sequenzen, sogenannte CpG-Sequenzen, die unter anderem als Immunstimulans benutzt werden, die HIV-Replikation in einer chronisch infizierten T-Zelllinie *in vitro* zu reaktivieren. Nachfolgend soll der Wirkmechanismus bakterieller CpG-Motive auf das Immunsystem erläutert werden.

1.2.6 Die Beeinflussung des Immunsystems durch bakterielle CpG-Motive

Schon vor über einem Jahrhundert wurden bakterielle Extrakte aus *Streptokokkus pyogenes* von einem amerikanischen Arzt, William B. Coley, therapeutisch genutzt, da er beobachtet hatte, dass sich Tumormetastasen während bakteriellen Infektionen verkleinerten [77]. Heutzutage ist man sich ziemlich sicher, dass diese immunstimulatorische Wirkung unter anderem auf unmethylierte CpG-Dinukleotide der bakteriellen DNA zurückzuführen ist, welche die Zellen des Immunsystems zu einer vermehrten Produktion von Cytokinen, wie IFN γ und IL-12 stimulieren [78] [79].

Als CpG-Motiv wird eine bestimmte Aneinanderreihung von Basen bezeichnet: XX**CG**XX. Eukaryotische DNA enthält auch CpG-Sequenzen, zeigt aber nicht die Wirkung bakterieller CpG-Sequenzen. CpG-Nukleotide kommen in bakterieller DNA in einer viel höheren Frequenz vor (eine von 16 Basen) im Gegensatz zur vertebralen DNA (eine von 64 Basen) [80]. Zudem sind die bakteriellen CpGs unmethyliert,

während über 80% der Cytosine in eukaryotischen CpG-Sequenzen methyliert sind [80].

Obwohl man zuerst von einer unspezifischen Immunstimulation ausgegangen war, konnte gezeigt werden, dass CpGs spezifisch an TLR-9 (engl.: toll-like-receptor-9) binden. Dieser Rezeptor gehört der TLR-Familie, aus der Superfamilie der Muster-Erkennungs-Rezeptoren (engl.: pattern recognition receptors) an [81]. Im Menschen sind 10 verschiedene TLRs mit unterschiedlichen Erkennungsmustern bekannt, die in verschiedenen Kompartimenten der Zelle exprimiert werden. TLR-9 zum Beispiel kommt in Endosomen von plasmazytotischen dendritischen Zellen (pDCs) und B-Zellen vor [82]. Nachdem also eines oder mehrere CpG-Motive durch Endozytose in die B-Zelle oder plasmazytotische dendritische Zelle aufgenommen worden sind, interagieren sie mit TLR-9. Hierdurch werden Signalwege aktiviert, die in der Sekretion verschiedener Cytokine enden und so ein T-Helferzellen-1 ähnliches Milieu kreieren: B-Zellen sezernieren vor allem Interleukin-6 und Interleukin-10, werden empfindlich für Antigene und regulieren in Anwesenheit von Antigenen durch Antikörperproduktion die humorale Immunantwort hoch. Dendritische Zellen beginnen mit der Sekretion von Interleukin-12, TNF- α , und Interferon α/β (INF α/β). Dies wiederum aktiviert natürliche Killerzellen, welche Interferon- γ sezernieren und zur Lyse befähigt werden. Außerdem werden vermehrt Antigen-spezifische T-Zellen gebildet. Abb.1.2.3 zeigt einen Überblick über den Aktivierungsmechanismus.

Diese spezifische Aktivierung des Immunsystems könnte in Zukunft bei vielen Erkrankungen des Immunsystems therapeutisch genutzt werden, zumal nun auch synthetische Oligodeoxynukleotide (ODNs mit einer Länge von 8-30 bp) mit einem oder mehreren CpG-Motiven hergestellt werden: CpG-ODNs konnten in Mäusen die Produktion von antitumoralen Axs verstärken [83], die Immunantwort auf Allergene verhindern [84] und als Impf-Adjuvans die humorale und zelluläre Immunantwort deutlich stimulieren [85].

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass CpG-ODNs HIV in chronisch infizierten Zellen *in vitro* reaktivieren können. Indiz dafür ist die Beobachtung, dass TLR-9 den Transkriptionsfaktor NF κ B in dendritischen Zellen aktiviert [86, 87]. Diesen benötigt das HI-Virus für die Replikation [88]. Daraus könnte eine neue Therapieform der HIV-Infektion resultieren. Nach der Eliminierung des Virus aus dem Kreislauf könnten

chronisch infizierte Zellen zur Virusreplikation stimuliert werden und so der Behandlung mit antiretroviralen Medikamenten zugänglich gemacht werden.

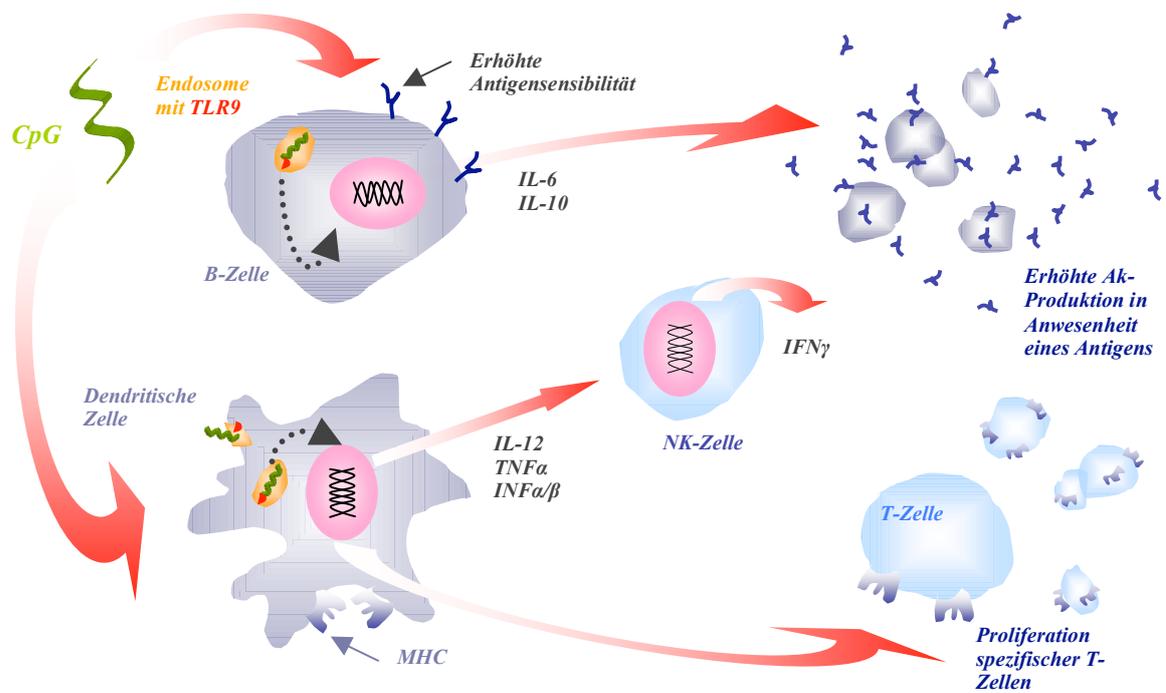


Abb.1.2.2: Immunstimulation durch CpGs (mod. nach [89]);

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei unterschiedliche Themenbereiche bearbeitet werden. Da die Arbeitsgruppe bereits verschiedene Beobachtungen zu dem Verhalten apoptotischer Zelllinien auf die Zugabe von Antioxidantien gemacht hatte [90], sollte nun der Verlauf der Apoptose unter dem Einfluss verschiedenartiger Antioxidantien getestet werden. Zudem sollte untersucht werden, ob das Verhalten von der verwendeten Zelllinie abhängig ist.

Ein weiterer Versuchsblock sollte sich mit der Reaktivierung von HIV in einer chronisch infizierten Zelllinie durch CpG ODNs beschäftigen. Dabei sollte untersucht werden, ob die beobachtete Reaktivierung abhängig von CpG Motiven ist, und welche Signalwege zur Reaktivierung führen könnten.

3. Material

3.1 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Arbeitswerkbank	Modell BSI C, Antair
Brutschrank, CO ₂ -begast	Heraeus
Dispenser	Socorex
Douncer	Schott
Durchflußzytometer (FACScan)	Becton & Dickinson
Flüssigstickstoffbehälter	Cryosystem
Gefrier- und Kühlschränke	Bosch
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop (Fluorovert)	Leitz
Mikroliterpipetten	Socorex und Gilson und Eppendorf
Netzgerät (2301 Makrodrive)	LKB Wallac
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Pipettierhilfe, elektrisch	Knirschmann
Zelleinfrierbox	Nalgene

3.2 Verbrauchsmaterialien

<u>Material</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Einmalhandschuhe	Semperit
Einmalpipetten (1 ml, 2 ml)	Falcon
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml)	Greiner
FACS-Röhrchen	Multimed
Glaspipetten (10 ml)	Brand
Kryoröhrchen (2 ml)	Nalgene
Miniaturreaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Saerstedt

Objektgläschen	Marienfeld
Objektträger	Marienfeld
Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Gilson
Rührfische	Roth
Sterilfilter	Schleicher & Schüll
Zellkulturflaschen (70ml, 250 ml)	Falcon, Becton & Dickinson
Zellkulturflaschen (600ml)	Cellstar, Greiner
Zellkulturplatten 96-Loch Flachboden	Falcon, Becton & Dickinson
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner

3.3 Chemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumcarbonat	Merck
Dinatriumhydrogencarbonat	Merck
EDTA	Roth
Formaldehyd (37 %ige wässrige Lösung)	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Gibco, BRL
Saponin	Roth
Trypanblau	Sigma
N-Acetylcystein (NAC)	Sigma
BHA (buthyliertes Hydroxyanion)	Sigma
PBS mit 0,1% BSA und 0,02% Natriumazid	Medienküche

3.4 Reagenzien für die Zellkultur

<u>Substanz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Ficoll (Lymphoprep)	Nycomed Pharma

Fötale Kälberserum (FCS)	Linearis
L(+)-Glutamin	Fluka
HEPES	Roth
Interleukin-2 (IL-2)	EuroCetus
PHA	Sigma
RPMI-1640 (ohne Glutamin)	Gibco

3.5 Inhibitoren

Name	Ziel der Inhibition	Bezugsquelle
Cape	NFkB	Calbiochem-Novabiochem
SN 50	NFkB	Calbiochem-Novabiochem
U0126	MEK/ERK	Calbiochem-Novabiochem
zVAD-fmk	Caspase 8	Calbiochem-Novabiochem

3.6 Antikörper und andere Reagenzien für die Markierung von Zellen

Name	Ziel	Bezugsquelle
183-H12-5C	HIV-p24	selbst produziert aus Hybridom
7AAD	Nucleus	Pharmigen
7C11	CD95	Coulter-Immunotech
Annexin-5	Phosphatidylserin	Pharmingen
Antiserum (g)	Maus IgG	DAKO
UCHT1	CD3	DAKO
Anti-CD69	CD69	Pharmigen

g: goat, Ziege

3.7 PTO-ODNs

Posphothioat (PTO)-Oligodesoxynukleotide (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany) waren von high purity salt free (HPSF) gereinigter Qualität und in H₂O (1mg/ml) gelöst.

CpG-ODN 2006: TC**GTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT**;

Non-CpG-ODN 2006 4xTG: TTGTTGTTTTGTTGTTTTGTTGTT;

CpG-ODN 2040: CT**GTCGTTTTGTCGTTTTGTCTGG**;

Non-CpG-ODN 2041: CTGGTCTTTCTGGTTTTTTTCTGG;

3.8 Zellen

<u>Name</u>	<u>Eigenschaft</u>	<u>Bezugsquelle</u>
A3.01	CD4+ T-Lymphoblasten	NIH
ACH-2	A3.01, chronisch mit HIV infiziert	NIH
Jurkat E6-1	CD4+-T-Zelllymphomzellen(h)	NIH
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen	Isolation aus dem Blut gesunder Spender

h: human, menschlich

NIH: NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Maryland, USA

4. Methoden

4.1 Zellkulturen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien lagen in Suspension vor. Sie wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Um einer Kontamination durch Keime vorzubeugen, wurde dem Kulturmedium Penicillin und Streptomycin zugesetzt. Zudem wurden alle Arbeiten mit Zellkulturen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in der Regel alle 3-4 Tage passagiert, so dass die Zellzahl von 2 x 10⁶ nicht überschritten wurde. Ein weiteres Kennzeichen für die Notwendigkeit, die Zellen zu passagieren, war die Gelbfärbung des Mediums: Der im Nährmedium enthaltene Indikator Phenolrot (basisch) schlug beim Anstieg saurer Stoffwechselprodukte in gelb um.

Für die folgenden Abschnitte gilt grundsätzlich, dass alle für die Zellkultur verwendeten Medien oder Lösungen auf 37 °C vorgewärmt wurden.

4.1.1 Zusammensetzung des Kulturmediums

RPMI 1640:

Penicillin	100 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L(+)-Glutamin	500 µg/ml
HEPES	10 mM, pH 7,4
FCS	10% (v/v)

Für die Kultivierung von PBMC enthielt das Medium zusätzlich IL-2 (100 U/ml).

4.1.2 Reinigen der Zellsuspensionen

Um Substanzen wie Antikörper, Stimulantien oder andere Chemikalien, die den Zellsuspensionen zugefügt worden waren, wieder aus dem Zellüberstand zu entfernen,

mussten die Zellen „gewaschen“ werden: Die Zellkultur wurde dazu in einem Röhrchen zentrifugiert, der Überstand mit der zu entfernenden Substanz wurde abgekippt (bei der mit HIV infizierten Zelllinie ACH-2 abgesaugt), das Zellpellet wurde mit frischem Medium aufgeschüttelt. Dieser Vorgang wurde in der Regel 2 x durchgeführt.

Die Zentrifugation der Zellen erfolgte in einer Hettich-Kühlzentrifuge (5 Minuten, 1000 rpm (ca. 230 x g), bei Raumtemperatur, ohne Anlauf, mit Bremse auf Stufe 9).

4.1.3 Bestimmung der Zelldichte und Zellvitalität

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dafür wurden die Zellen gut resuspendiert und eine kleine Probe davon (50 μ l) in einem geeigneten Verhältnis mit Trypanblaulösung (50 μ l) und PBS (100 μ l) verdünnt (Verdünnung um den Faktor 4). Da nur tote Zellen durch Trypanblau angefärbt werden, ermöglichte diese Färbung die Bestimmung der Lebendzelldichte, sowie der Vitalität der Kultur.

Als Vorbereitung zur eigentlichen Zählung wurden Neubauer-Zählkammer und Deckglas mit Alkohol gesäubert und anschließend die äußeren beiden Flächen des Objektträgers mit 1-2 μ l Flüssigkeit benetzt. Dann wurde das Deckglas unter leichtem Druck an die Zählkammer angepresst, bis sich Newtonsche Ringe bildeten. Durch Pipettieren der Zellsuspension an den Rand zwischen Deckglas und Objektträger wurde die Suspension durch die auftretenden Kapillarkräfte in die Zählkammer hineingesaugt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die in den Großquadraten der Zählkammer liegenden Zellen gezählt. Um den statistischen Fehler zu minimieren, wurden mindestens 150-200 Zellen gezählt. Lag die ermittelte Zellzahl darunter, wurde entweder eine geringere Verdünnung der Zellsuspension gewählt, oder es wurde eine weitere Zählkammer beladen und ausgezählt.

Der Abstand zwischen Deckglas und Objektträger beträgt genau 0,1 mm und jedes der Großquadrate hat eine Fläche von 1 mm x 1 mm. Über jedem der Quadrate bildet sich daher ein Volumen von 0,1 mm x 1 mm x 1 mm = 0,1 mm³ oder 0,1 μ l. Anhand der pro Großquadrat Q bestimmten Zellzahl N lässt sich daher die Zellzahl pro Milliliter verdünnter Zellsuspension ermitteln. Durch Einbeziehung des Verdünnungsfaktors V

bei der Trypanblaufärbung ergibt sich daraus die Zelldichte D (Zellen/ml) in dem Kulturgefäß.

Man erhält so:

$$D = \frac{N}{Q} \cdot V \cdot 10^4$$

mit

- D: Zelldichte in der Kultur in Zellen/ml
- N: Zahl der gezählten Zellen
- Q: Anzahl der ausgezählten Großquadrate
- V: Verdünnungsfaktor der Zellsuspension bei der Trypanblaufärbung 10^4 : Umrechnungsfaktor von Zellen/0,1µl auf Zellen/ml

Beispiel: Bei einer Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblaulösung um den Faktor 4 (50 µl Zellsuspension + 50 µl Trypanblaulösung + 100 µl PBS) wurden in 4 Großquadraten insgesamt 216 Zellen gezählt. Daraus ergibt sich eine Zelldichte von $216/4 \times 4 \times 10^4 = 2,16 \times 10^6$ Zellen/ml.

Zusammensetzung der Trypanblaulösung:

Trypanblau	0,1% (v/v)
Ethanol	20% (v/v)

aq. bidest.

4.1.4 Entfernen von toten Zellen aus der Zellkultur

Wurde bei der Bestimmung der Zelldichte eine Anzahl toter Zellen größer als 25% festgestellt, musste die Zellkultur von toten Zellen und Zelltrümmern beseitigt werden. Dazu eignet sich die Aufbereitung in einem Dichtegradienten mithilfe von Ficoll-Paque, einer Polyzuckerlösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Die aufzutrennende Zellsuspension wurde in einem Röhrchen mit 37° C warmen Ficoll-Paque vorsichtig

unterschichtet und für 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (1500rpm, Anlaufzeit 120 s, Bremse 0).

Da lebende Zellen eine Dichte kleiner als 1,077 g/ml besitzen, sammeln sie sich an der Grenze von Medium und Ficoll, während sich tote Zellen mit einer größeren Dichte am Boden des Röhrchens absetzen.

Lebende Zellen konnten mit der Pipette von der Medium-Ficoll Grenzschicht abgesaugt, gewaschen und in neues Kulturmedium aufgenommen werden.

4.1.5 Kryokonservierung

Die einzufrierenden Zellen wurden in einer Dichte von $2-10 \times 10^6$ Zellen/ml in eisgekühltem Einfriermedium, bestehend aus 50% FCS, 40% Medium und 10% DMSO aufgenommen und Aliquots von 1-2 ml in Kryostatgefäße überführt. DMSO lagert sich in die Zellmembran ein und stabilisiert so die Zellen. Aufgrund der zellschädigenden Wirkung von DMSO sind diese während der gesamten Prozedur aber unbedingt kühl zu halten. Die Zellen wurden über Nacht in einer Zelleinfrierbox auf -80 °C abgekühlt und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff (-130 °C) gelagert.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen in einem 37 °C -Wasserbad erwärmt und zweimal mit eiskaltem Medium gewaschen. Danach konnten die Zellen in frisches Kulturmedium aufgenommen werden. Für Experimente konnten sie allerdings erst nach ca. 3 Wochen verwendet werden.

Allgemein gilt, dass sowohl beim Einfrieren, als auch beim Auftauen der Zellen wegen der zytotoxischen Wirkung von DMSO möglichst schnell vorgegangen werden soll.

4.2 Gewinnung von PBMC

PBMCs wurden aus dem frisch entnommenen, heparinisierten Blut gesunder Menschen gewonnen. Dazu wurde dem Spender eine Menge von etwa 30 ml Blut entnommen, in Portionen zu je 15 ml auf Röhrchen verteilt und in einem Verhältnis von 1:1 mit 37 °C warmem Medium vermischt. Um die verschiedenen Blutbestandteile voneinander zu

trennen, wurde, genauso wie bei der Entfernung von Zelldetritus (4.1.5), ein Dichtegradient mit Ficoll-Paque durchgeführt: Das Medium-Blut-Gemisch wurde vorsichtig mit ca. 10 ml raumpemtertem Ficoll (Lymphoprep) unterschichtet und in einer Hettich-Zentrifuge aufgetrennt (30 min, 1500 rpm, Raumtemperatur, Anlauf 120 s, ohne Bremse). Nach der Ficoll-Hypaque-Zentrifugation entstand folgende Verteilung: Aufgrund der höheren Dichte sammelten sich Erythrozyten, polymorphkernige Leukozyten (PMNC: basophile, eosinophile und neutrophile Zellen) und Granulozyten in dem Zentrifugationsrückstand (Blutkuchen). Die weniger dichten mononukleären Zellen (PBMC) wie Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten), NK-Zellen und Monozyten sammeln sich oberhalb der Ficollschicht. Die Schicht mit den PBMC wurde vorsichtig mit dem darunterliegenden Ficoll abgesaugt. Das so isolierte Zell-Ficoll Gemisch wurde noch einmal mit Kulturmedium gemischt. Es ist wichtig, dass hierbei das mitabgesaugte Ficoll ausreichend verdünnt wird (ca. 10 ml Ficoll/PBMC-Suspension auf 30 ml RPMI). Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (10 min, 1500 rpm, RT, ohne Anlauf, mit Bremse auf Stufe 9), und das entstandene Zellpellet mit RPMI 1640 gewaschen.

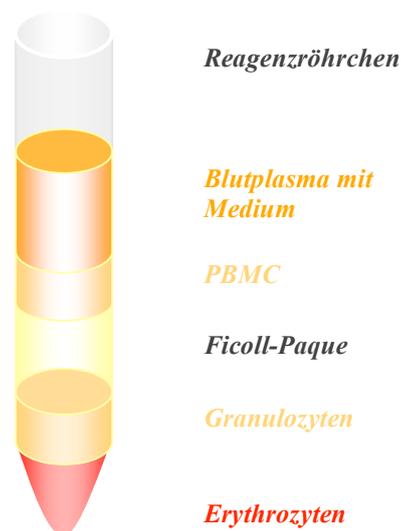


Abb.4.1: Auftrennung des Blutes im Dichtegradienten.

4.3 Anreicherung von primären Blut-Lymphozyten (PBL) aus PBMCs

Die in der Kultur der PBMCs enthaltenen Monozyten differenzieren in Zellkultur sehr rasch zu Makrophagen aus und werden adhärent. Aufgrund dieser Eigenschaft lassen sie sich sehr leicht durch eine kurze Ruhezeit von B- und T-Lymphozyten abtrennen: Die isolierten PBMCs in RPMI 1640 wurden in einer Zellkulturflasche für ca. 90 min liegend bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Flasche vorsichtig aufrecht gestellt, geschwenkt und das Medium abgesaugt. Die Makrophagen haften am Plastik und verbleiben so in der Flasche.

Um die so gewonnenen PBLs zum Wachstum anzuregen und für Apoptosestimuli zugänglich zu machen, mussten sie stimuliert werden. Dazu wurden sie für 24 h mit PHA inkubiert (2 µl PHA/ml Zellkultur). Am nächsten Tag wurde das PHA durch zweimaliges Waschen sorgfältig entfernt und das Zellpellet in RPMI 1640 mit IL-2 (2 µl IL-2/ml RPMI 1640) aufgenommen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden in der Regel PBLs am 5. Tag nach Stimulation eingesetzt.

4.4. Durchflusszytometrie

Die Analyse der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Becton & Dickinson FACScan Durchflusszytometers und der Aufnahmesoftware Lysis II (Becton & Dickinson).

Die Messung im Durchflusszytometer ermöglicht eine Beurteilung der Zellen bezüglich ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzemission (bei Verwendung fluoreszierender Farbstoffe). Jede zu messende Zelle wird als Ereignis gezählt und ihre Messdaten für Größe, Granularität und Fluoreszenz werden gespeichert. In der Regel wurden nur die Zellen berücksichtigt, die in der FSC/SSC-Analyse innerhalb der Lebendzell-Population lagen.

Größe und Granularität der Zellen hängt von der Zellpopulation und ihrer Vitalität ab. Während nekrotische Zellen gegenüber einer gesunden Zelle deutlich vergrößert sind, weisen apoptotische Zellen eine erhöhte Granularität auf.

Bestimmt werden diese Parameter durch einen im Gerät befindlichen Laserstrahl, dessen Licht je nach Zellgröße in Vorwärtsrichtung (FSC: forward scatter,

Vorwärtsstreulicht) oder je nach Granularität in Seitwärtsrichtung (SSC: side scatter, Rechtswinkelstreulicht) gestreut wird.

Eindeutig einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden können die Zellen durch Anfärbung mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper, der entweder direkt oder indirekt über einen zweiten Antikörper gebunden wird. Bei der Analyse der Fluoreszenz wurden nur diejenigen Ereignisse als positiv gewertet, die eine höhere Fluoreszenz aufwiesen als die Zellen der Isotyp-Kontrollfärbung.

Für die Anregung der an die Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe verantwortlich ist ein Argonlaser, mit einer Wellenlänge von 488nm. Die Emissionswellenlänge jedoch, welche als Messergebnis registriert wurde, variierte je nach verwendetem Farbstoff: FITC (Fluorescein Isocyanate) leuchtete mit einer Wellenlänge von 525 nm grün, PE (Phycoerythrin) ergab eine rot-orange Färbung (Emissionswellenlänge von 575 nm).

Die Messergebnisse wurden mithilfe einer Auswertungssoftware graphisch dargestellt.

4.4.1 Extrazelluläre Färbung

Für jede Probe wurden ca. 10^5 Zellen in einem FACS-Röhrchen gesammelt und zweimal mit je 2 ml Färbepuffer gewaschen. Bei der Anfärbung HIV- infizierter Zellen mussten diese aus Sicherheitsgründen zuerst mit 4% Formaldehydlösung für 15-20 min fixiert werden. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe eines oder mehrerer Antikörper (z.B. CD69, CD3) für 60 Minuten bei 4 °C in einem Volumen von ca. 100 μ l gefärbt. Als Negativkontrolle wurde ein anti-Maus-IgG Antikörper gleichen Isotyps verwendet. Nichtgebundener Antikörper wurde danach durch zweimaliges Waschen mit je 2 ml Färbepuffer entfernt. Wurde in dem ersten Färbeschritt ein nichtmarkierter Antikörper verwendet, wurden die Zellen nachfolgend mit einem Detektionsantikörper für weitere 60 Minuten inkubiert und erneut zweimal mit Färbepuffer gewaschen. Danach wurden die Zellen, falls nicht davor schon geschehen, in 200 μ l 2%iger Formalinlösung fixiert und konnten analysiert werden.

Färbepuffer:

BSA	0,1 % (w/v)
Natriumazid in PBS	0,02 % (w/v)

Formalinlösung (2%):

Formalin in PBS	2 % (v/v)
--------------------	-----------

4.4.2 Intrazelluläre Färbung

Für die intrazelluläre Färbung mussten die Zellen zunächst fixiert werden. Dazu wurde je 1 ml 4%-ige Formalinlösung in FACS-Röhrchen vorgelegt. In diese Lösung wurden dann ca. 10^5 Zellen gegeben und für 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Insbesondere bei HIV-infizierten Zellen wurden die Zellen aus Sicherheitsgründen ohne zuvoriges Waschen direkt aus der Kulturplatte in die Formalinlösung pipettiert. Bei HIV infizierten Zellen sollte die Einwirkzeit der Formaldehydlösung von 15-20 min auf keinen Fall unterschritten werden, wenn auch eine ausreichende Zellfixierung schon nach einer Minute erzielt wird. Durch zweimaliges Waschen mit je 2 ml Saponinlösung wurde das Formalin entfernt und die Zellen permeabilisiert, um dem Antikörper den Zugang zum Zellinneren zu ermöglichen. Die Zugabe der Antikörper erfolgte nach dem gleichen Schema wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben. Zum Waschen wurde jedoch statt des Färbemediums Saponinlösung verwendet. Zellen, die nach oben genanntem Protokoll mit Saponin behandelt wurden bleiben für Antikörper permeabel, auch wenn nachfolgend saponinfreie Färbe- oder Waschpuffer verwendet werden (Daten nicht gezeigt). Die durch Saponin erreichte Permeabilisierung ist also nicht reversibel. Nach der Färbung wurden die Zellen in je 200 μ l 2%iger Formalinlösung aufgenommen und analysiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem Isotypserum gefärbt.

Saponinlösung:

BSA	0, 1 % (w/v)
Saponin	0, 5 % (w/v)
Natriumazid	0, 02 % (w/v)
in PBS	

Formalinlösung (4%):

Formalin	4 % (v/v)
in PBS	

4.4.3 Verwendete Antikörper und deren Funktion

Folgende Antikörper wurden bei der Immunfärbung für die Durchflußzytometrie verwendet:

<u>Name</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Spezies</u>	<u>Marker</u>	<u>Färbung</u>	<u>µl/Färbg</u>
183-H12-5C (HÜ)	anti-HIV-p24	Maus	-	i	50
UCHT1	anti-CD3 (human)	Maus	RPE	e	3
Ziegenserum	anti-Maus IgG	Ziege	FITC	i/e	3
anti-CD69	anti-CD69 (human)	Maus	RPE	E	3

e: extrazelluläre Färbung

i: intrazelluläre Färbung

HÜ: Hybridomüberstand

4.4.4 AnnexinV-/7AAD-Färbung

AnnexinV-FITC ist ein 35-36 kDa schweres Protein, welches in Anwesenheit von Calcium Phospholipide bindet. Es hat eine hohe Affinität für das Membranphospholipid

Phosphatidylserin, das in intakten Zellen nur auf der Membraninnenseite aufzufinden ist, bei apoptotischen Zellen aber auf die Zelloberfläche translociert.

7AAD dagegen gelangt über Poren in der geschädigten Zellmembran in die Zelle, und bindet dort an Proteine des Nukleus. Poren in der Zellmembran treten im Verlauf von Nekrose auf, die Zellmembran apoptotischer Zellen hingegen bleibt intakt.

Folge dieser unterschiedlichen Eigenschaften ist, dass gesunde Zellen nicht angefärbt werden, apoptotische Zellen nur AnnexinV positiv sind, während nekrotische Zellen sowohl AnnexinV, als auch 7AAD binden.

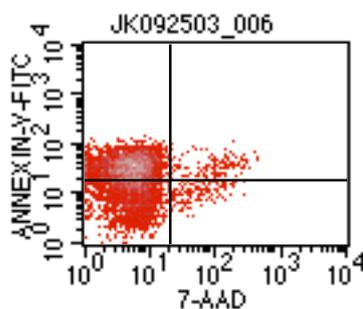
Zunächst erfolgte das Färbeprotokoll nach den Anweisungen des Herstellers, anstelle der vorgeschlagenen Kontrollfärbung durch Propidium Iodid wurde 7AAD eingesetzt:

Es wurden ca. 10^5 Zellen in einem FACS-Röhrchen gesammelt und mit 1 ml Annexin-5-Färbepuffer gewaschen. In einem Restvolumen von 50 μ l wurden je 1 μ l AnnexinV und 7AAD zugegeben, die Röhrchen gevortext und die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 100 μ l Annexin-5-Färbepuffer wurden die Zellen unverzüglich mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert.

Bei dieser Behandlung zeigte sich aber ein zeitabhängiger Switch von der Apoptose zur Nekrose (Abb. 4.2): Eine zuerst apoptotische Zellkultur erschien nach wiederholter Messung bereits nach 10 Minuten deutlich nekrotisch. Dieser Effekt wurde durch die Annahme, 7AAD habe selbst zellmembranschädigende Wirkung, erklärt.

Folglich wurde das Färbeprotokoll umgestellt: AnnexinV wurde wie bisher 20 Minuten mit den Zellen inkubiert, 7AAD dagegen wurde erst kurz (ca. 1 min) vor der Messung in das FACS-Röhrchen gegeben. Der „Switch“ konnte nun nicht mehr beobachtet werden.

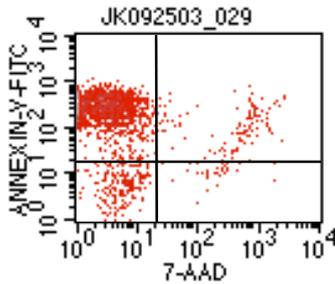
a)



File:
JK092503_006

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	5869	71.51	17.34
UR	161	1.96	0.48
LL	2062	25.12	6.09
LR	115	1.40	0.34

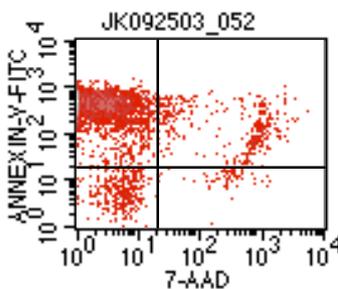
b)



File:
JK092503_029

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1965	84.08	20.63
UR	131	5.61	1.38
LL	215	9.20	2.26
LR	26	1.11	0.27

c)



File:
JK092503_052

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	3174	80.17	19.68
UR	371	9.37	2.30
LL	358	9.04	2.22
LR	56	1.41	0.35

Abb. 4.2: Die nekrotische Population (UR, rot) nimmt in Abhängigkeit von der Zeit zu. a) direkt nach Zugabe von 7AAD; b) 10 Minuten nach Zugabe; c) 20 Minuten nach Zugabe;

4.5 Statistik

4.5.1 Streuung bei der Zählung von Ereignissen in einer Stichprobe

In vielen Experimenten wird über die Bestimmung einer Stichprobe auf die Gesamtheit geschlossen. Dabei entstehen statistische Fehler, auf die an dieser Stelle hingewiesen werden soll.

So werden zum Beispiel bei der Ermittlung der Zelldichte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (4.1.4)) nicht alle Zellen der Kultur gezählt, sondern nur eine Stichprobe daraus. Das bedeutet, dass die daraus berechnete Zelldichte von dem wahren Wert mehr

oder weniger stark abweichen wird. Dieses wird deutlich, wenn man aus derselben Kultur mehrmals hintereinander eine Zellzahlbestimmung durchführt. Die bei einer wiederholten Zellzählung auftretende Streuung (σ) der Ergebnisse um den wahren Wert lässt sich nicht nur experimentell bestimmen, sondern in dem vorliegenden Fall sogar rechnerisch vorhersagen. Sie entspricht nämlich einer Normalverteilung (Gaußkurve), so dass sich die Standardabweichung (σ) aus der Wurzel der Zahl der ausgezählten Zellen (n) ergibt, also:

$$\sigma = \sqrt{n}$$

Das bedeutet, dass bei 25 ausgezählten Zellen die Streuung um den wahren Wert ± 5 Zellen beträgt (s. Anmerkung). Der ermittelte Wert weicht daher um $\pm 20\%$ von dem wahren Wert ab. Werden jedoch mehr Zellen ausgezählt, z.B. 100, so beträgt die Streuung 10 und die Abweichung vom wahren Wert reduziert sich damit auf $\pm 10\%$. Je mehr Zellen also ausgezählt werden, desto genauer lässt sich die tatsächliche Zelldichte bestimmen.

Anmerkung: Aus der Gaußverteilung folgt, dass der wahre Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 68% innerhalb der berechneten $\pm 1\sigma$ -Grenzen liegt. Das bedeutet aber auch, daß in 32% der Fälle die Abweichung vom wahren Wert sogar größer als $\pm 1\sigma$ ist. Weitet man die Grenzen auf $\pm 2\sigma$ aus, so liegt der wahre Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 95% innerhalb der angegebenen Schwankungsbreite.

4.5.2 Statistische Methoden bei der Messwertanalyse

Alle in der hier vorliegenden Arbeit gezeigten Experimente, die einen numerischen Messwert lieferten (Durchflusszytometrie) sind grundsätzlich als Triplikat-Analysen durchgeführt worden. (Ausnahmen sind gesondert hervorgehoben.) Das bedeutet, dass jede Behandlung in einem Experiment (z.B. Inkubation mit mAb 7C11) in drei parallelen Ansätzen erfolgte. Aus diesen Werten wurden die Mittelwerte (\bar{x}) und die dazugehörige Standardabweichung (σ) berechnet.

Dabei gilt:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Alle gezeigten Ergebnisse stammen aus jeweils einem repräsentativen Experiment von gleichartigen Experimenten (in der Regel mindestens drei). Ausnahmen hiervon sind gesondert hervorgehoben.

5. Ergebnisse

5.1 Antioxidantien können CD95-vermittelte Signalwege modulieren

Der membranständige CD95-Rezeptor aus der Familie der TNF-Rezeptoren ist Auslöser für die Apoptose in aktivierten T-Zellen (AICD, s.o.) [26] [27]. Diese Art der Apoptose erfolgt vor allem durch die Aktivierung einer Kaskade von Caspasen, ganz im Sinne der klassischen Apoptose. Zeichen des PCD sind vor allem der Flipflop von Phosphatidylserin von der inneren Seite der Zellmembran auf die äußere, die DNA-Fragmentation in 180 bp Segmenten und die Zellschrumpfung.

Antioxidantien sind schon lange Zeit als Inhibitoren eines Typs von Zelltod bekannt, der weitgehend Caspase-unabhängiger Natur ist, dafür aber durch eine massive Anreicherung an reaktiven Sauerstoffspezies gekennzeichnet ist. Demnach sollen Antioxidantien die zellulären Glutathion-Depots wiederauffüllen, oder direkt die entgiftende Glutathionperoxidase unterstützen [31].

Die Beobachtung, dass Antioxidantien auch CD95-vermittelte Signalwege inhibieren, die kaum von reaktiven Sauerstoffspezies abhängig sind, lässt einen weiteren Reaktionsweg vermuten: Antioxidantien greifen in die Redox-vermittelte Expression des Transkriptionsfaktors NFkB ein und inhibieren auf diese Weise die Expression von CD95L [29].

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Hemmung der Apoptose abhängig von der Art des Antioxidans und der verwendeten Zelllinie ist. Um die physiologische Reaktion von Glutathion (GSH) nachzuahmen, wurde N-Acetylcystein (NAC), eine Vorstufe von GSH, ausgetestet. Um zu überprüfen, ob die inhibierende Wirkung von Antioxidantien auf diese natürlicherweise in der Zelle vorkommenden Reduktionsmittel beschränkt ist, wurde ebenfalls BHA (Butyl-Hydroxyanisol) eingesetzt. Dieses ist ein synthetisches phenolisches Antioxidans.

Ferner war von Interesse, ob der während der Apoptose oft beobachtete Flipflop von Phosphatidylserin ebenfalls durch Antioxidantien zu hemmen ist: Phosphatidylserin ist in der asymmetrisch aufgebauten Zellmembran unter physiologischen Umständen nur auf der inneren Plasmamembranseite aufzufinden. Den Flipflop auf die äußere

Membranseite verhindert die Aminophospholipid-Translokase [91]. Während der Apoptose erscheint Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite und spielt als Erkennungsmerkmal für Makrophagen eine Rolle bei der nicht-inflammatorischen Phagozytose der apoptotischen Zelle [3]. Da die Aminophospholipid-Translokase oxidativen Stress nur geringfügig toleriert [92], könnte die Entgleisung der Stoffwechselforgänge während der Apoptose zu einem Verlust derselben führen. Phosphatidylserin könnte so nicht mehr von der äußeren Seite der Membran entfernt werden.

Durch die Anfärbung der Zellen mit Annexin V vor der Messung im Durchflusszytometer konnte neben der Messung von Granularität und Größe der Zelle, das Erscheinen von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran (ein Apoptosezeichen) quantifiziert werden: Annexin V bindet an Phosphatidylserin der äußeren und inneren Membran. Da bei Nekrose Annexin V durch die Membranporen gelangen kann und so durch Bindung an Phosphatidylserin auf der inneren Membranseite fälschlicherweise als positives Signal gezählt werden könnte, wurde außerdem noch der Fluoreszenzfarbstoff 7AAD eingesetzt, der an den Zellkern bindet. Zellen, die *nur* für Annexin V positiv sind, also Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite aufweisen, wurden als apoptotisch gezählt, während 7AAD *und* Annexin V positive Zellen als nekrotisch angesehen wurden. Die Apoptoserate wurde definiert als Verhältnis von Annexin V-positiven/7AAD-negativen Zellen zu Annexin V/7AAD-negativen Zellen.

Als Zellmodelle wurden Jurkat (E6-1)-Zellen (T-Lymphoblasten) und A3.01 Zellen (T-Zelllymphoblasten) verwendet.

5.1.1 NAC verhindert die Apoptose in E6-1 Jurkat-Zellen

NAC als Vorstufe des zellulären GSH ist schon in einigen Studien als zumindest partieller Inhibitor der Apoptose vorgestellt worden [30]. Um den Einfluss von NAC auf den CD95-vermittelten Signalweg zu untersuchen, wurden E6-1 Jurkat-Zellen verwendet. Die Apoptose wurde durch den monoklonalen Antikörper 7C11 (mAk7C11), einen synthetischen Liganden für CD95 induziert. Die Zellen wurden für

7h mit mAk7C11 bzw. Medium und verschiedenen Konzentrationen an NAC inkubiert. Während die ausschließlich mit mAk7C11 behandelten Zellen im Durchflusszytometer eindeutige Apoptosezeichen aufwiesen (hohe Granularität, keine Zellschwellung, Annexin V-positiv), sank der Prozentsatz der Annexin V-positiven Zellen mit höheren Konzentrationen von NAC deutlich ab.

Bei einer Konzentration von 24 mM NAC wurde die Apoptose sogar komplett gehemmt. Diese Zellen zeigten keinen Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle. Ab Konzentrationen von 30mM wirkte NAC toxisch (Daten nicht gezeigt).

Der Flipflop von Phosphatidylserin wurde also durch NAC verhindert: Die Zunahme der NAC-Konzentration ging mit einer Abnahme der Anzahl von Annexin V-positiven Zellen einher.

NAC ist folglich dazu in der Lage, CD95-positive Apoptosewege zu hemmen, und den Phosphatidylserin-Flipflop zu verhindern.

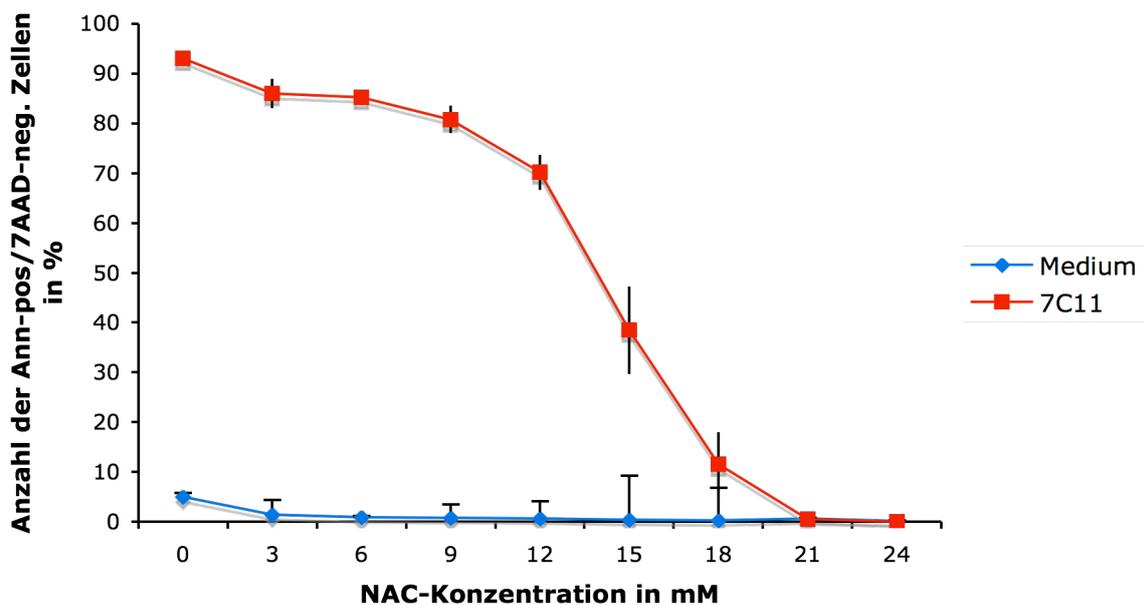


Abb. 5.1.1: *NAC hemmt die Apoptose in Korrelation zu der eingesetzten Konzentration bei E6-1 Zellen. E6-1 Lymphoblasten wurden für 7h entweder mit Medium oder 7C11 inkubiert. Zusätzlich erfolgte der Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen an NAC. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte durch Annexin V/7AAD-Färbung im Durchflusszytometer.*

5.1.2 Die Apoptose in A3.01 Zellen wird durch niedrige Konzentration von NAC gefördert, durch hohe Konzentrationen gehemmt

Während die Apoptose bei Jurkat-Zellen hauptsächlich über den CD95-Signalweg reguliert wird, vermutet man bei den CD4-positiven T-Zelllymphoblasten A3.01 eine zusätzliche, Caspase-unabhängige Signalübertragung, die neben der normalen Apoptose abläuft: wenn der Caspase-abhängige Signalweg durch Caspaseinhibitoren wie z.B. den Pancaspaseinhibitor Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon (zVAD-fmk) blockiert wird, kann bei diesen Zellen Nekrose oder Nekrose-ähnlicher PCD beobachtet werden [90].

A3.01 wurden ebenfalls für 7h mit mAk7C11 (200ng/ml) bzw. Medium und unterschiedlichen Konzentrationen an NAC (3mM- 30mM) inkubiert. Hier zeigt sich bei niedrigen Konzentrationen (9-12 mM NAC), anders als bei den E6-1 Zellen, eine geringfügige Zunahme der Annexin V-positiven/7AAD-negativen Zellzahl. Fraglich ist allerdings, ob in Anbetracht der Fehlerbalken von einer Zunahme gesprochen werden kann, oder ob von einer Meßunregelmäßigkeit ausgegangen werden muss. Dieselbe Beobachtung wurde bei wiederholten Versuchen gemacht, jedoch trat sie nicht regelmäßig auf.

Jedes Mal zu beobachten war jedoch die Abnahme der Apoptoserate und des Phosphatidylserin-Flipflops bei NAC-Konzentrationen höher als 12 mM. NAC-Konzentrationen ab 24 mM zeigten aber schon toxische Wirkung.

NAC kann den durch mAk7C11 induzierten Phosphatidylserin-Flipflop also auch in A3.01-Zellen verhindern.

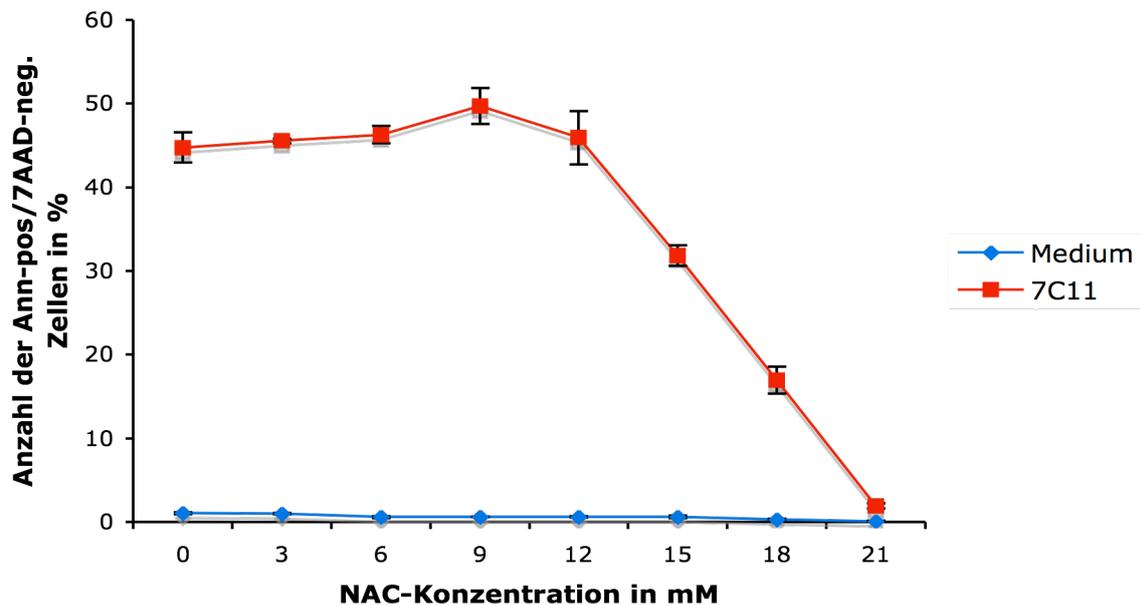


Abb. 5.1.2: Die Wirkung von NAC auf A3.01 Zellen ist konzentrationsabhängig. A3.01 T- Lymphoblasten wurden 7h lang mit mAk7C11 bzw. Medium und verschiedenen Konzentrationen an NAC inkubiert. Die Auswertung des Anteils der apoptotischen Zellen erfolgte mittels AnnexinV/ 7AAD Färbung im Durchflusszytometer.

5.1.3 BHA wirkt anti-apoptotisch auf E6-1 Jurkat-Zellen

Anders als bei NAC konnten bei dem synthetischen phenolischen Antioxidans BHA in verschiedenen Studien unterschiedliche Beobachtungen gemacht werden. So konnte BHA Ratten-Thymozyten nach der Induktion von Apoptose durch Peroxynitrit vor der Apoptose schützen [93]. Eine andere Studie belegt, dass BHA in Hepatozyten Apoptose auslösen kann [94].

In der Annahme, dass die Unterschiede durch den jeweiligen Zelltyp erklärbar sind, wurde zunächst die Wirkung auf E6-1 Jurkat-Zellen getestet.

Dazu wurde BHA in Konzentrationen von 0-500 mM auf E6-1 Jurkat-Zellen in An- oder Abwesenheit von mAk7C11 (200ng/ml) gegeben und 7h inkubiert. Schon ab einer

Konzentration von 100 mM BHA konnte eine Abnahme der Annexin V-positiven/7AAD-negativen Zellzahlen erkannt werden. Eine absolute Inhibition des Phosphatidylserin-Flipflops war bei 500 mM BHA zu vermerken.

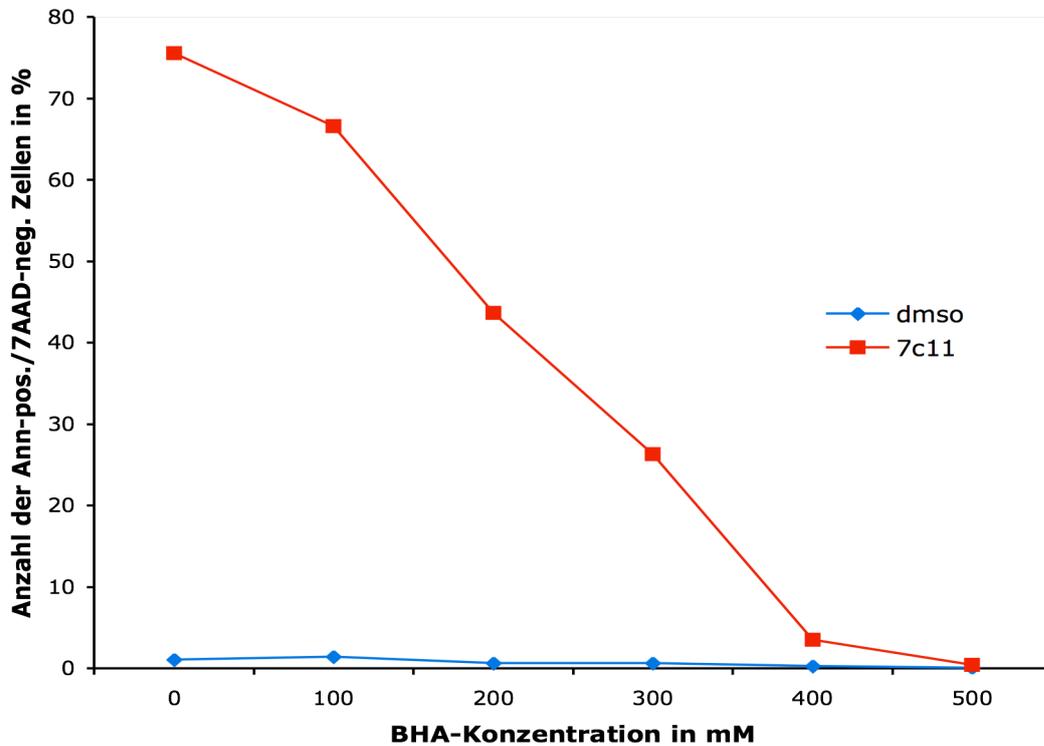


Abb.5.1.3.a: BHA hemmt die Apoptose maximal bei einer BHA-Konzentration von 500 mM. BHA wurde in verschiedenen Konzentrationen auf E6-1 Jurkat-Zellen gegeben, die mit oder ohne mAk7C11 behandelt worden waren. Die Apoptoserate wurde nach der Anfärbung mit Annexin V/7AAD im Durchflusszytometer bestimmt.

Daraufhin wurde die Abhängigkeit der Wirkung von der Zeit mit einer 7h Kinetik untersucht. Dabei wurde die Konzentration von BHA verwendet, bei der die Apoptose maximal inhibiert wurde:

Mit Hilfe von mAk7C11 (200 ng/ml) wurde in Jurkat T-Zellen Apoptose ausgelöst. Im Abstand von jeweils einer Stunde wurde den einzelnen Ansätzen BHA (500 μ M in DMSO) zugegeben und die Apoptoserate nach 7 Stunden mittels Annexin-V/7-AAD-Durchflusszytometrie bestimmt. Kontrollansätze enthielten entweder kein 7C11

(Apoptosekontrolle), kein BHA (ersetzt durch konzentrationsgleiches DMSO; Lösungsmittelkontrolle) oder weder 7C11 noch BHA.

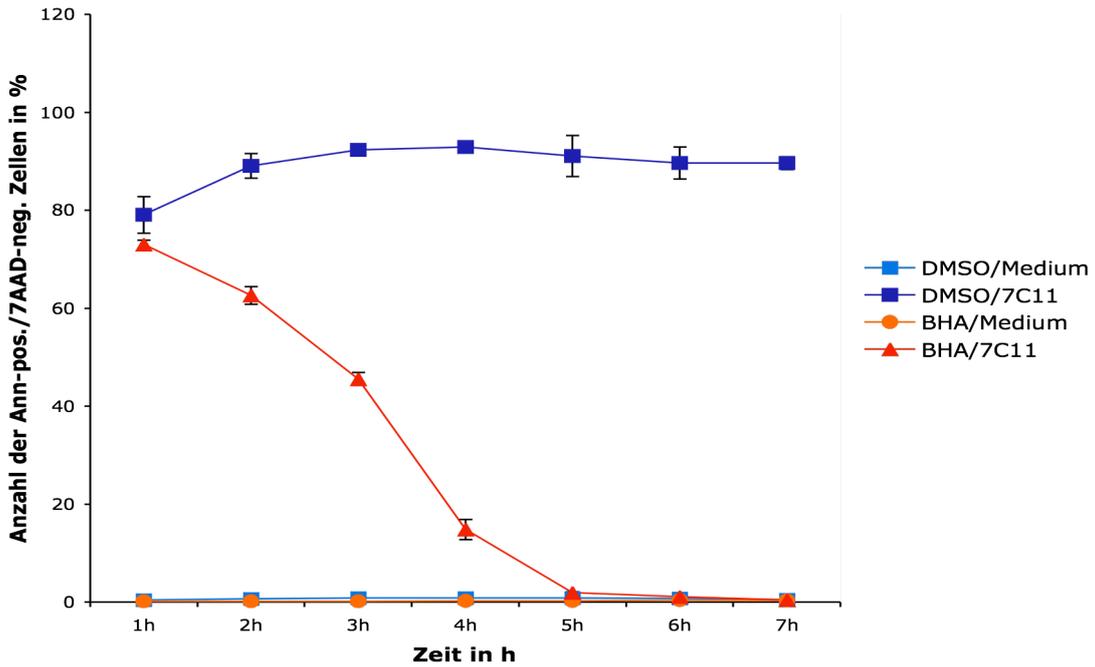
Es zeigte sich, dass nach den ersten 3 Stunden nach Zugabe von BHA mit 7C11 die Rate an Annexin V-positiven/7AAD-negativen Zellen verringert werden konnte. Mit verlängerter Inkubationszeit konnte sogar eine Hemmung des Phosphatidylserin-Flipflops beobachtet werden (Abb 5.1.3.b).

Um zu untersuchen, ob dieser Effekt nicht durch eine Interaktion von BHA mit dem mAk7C11 selbst hervorgerufen worden war (da die Substratmischungen zu Beginn des Experiments hergestellt wurden), wurden die Zellen in einem zweiten Versuch 7h lang in An- oder Abwesenheit von mAk7C11 (200ng/ml) inkubiert. Im Abstand von einer Stunde erfolgte die Zugabe von BHA (500mM) bzw. DMSO.

Jetzt ergab sich ein klareres Bild: in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit BHA war bereits nach 5h eine vollständige Reduktion des Phosphatidylserin-Flipflops erkennbar. Zellen, die nur mit BHA/Medium inkubiert worden waren, zeigten keine Apoptoseanzeichen.

Folglich kann festgestellt werden, dass BHA die Apoptose in E6-1 Jurkat-Zellen innerhalb der ersten drei Stunden nur unzureichend hemmt, während Inkubationszeiten von 5 Stunden und mehr zu einer Inhibition des Phosphatidylserin-Flipflops führen. BHA ist wie NAC dazu fähig, den simultan mit der Apoptose auftretenden Flipflop von Phosphatidylserin zu verhindern.

b)



c)

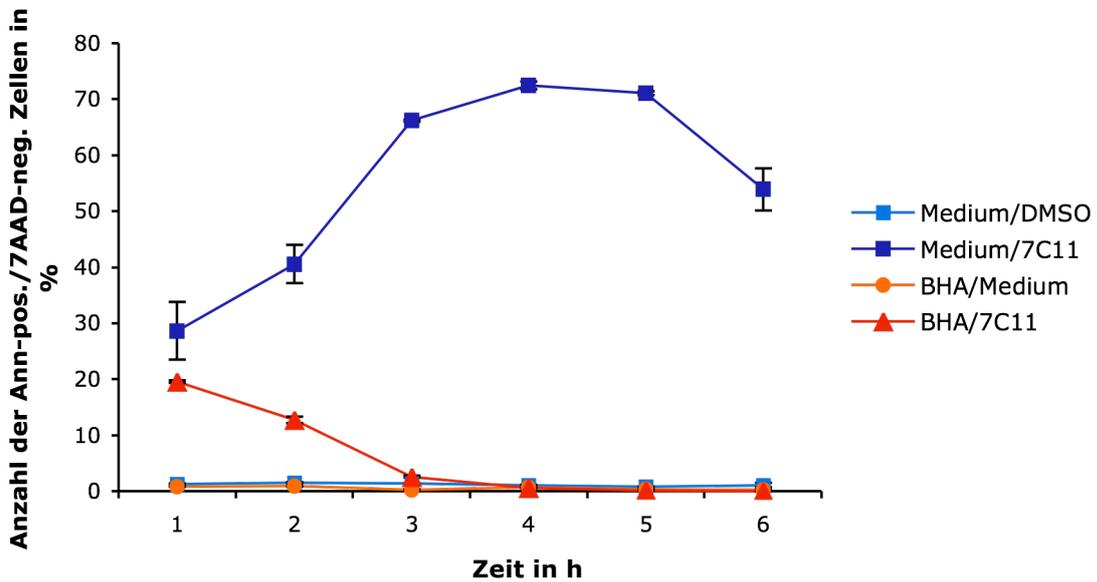


Abb. 5.1.3b/c: Der Anteil von Annexin V-positiven/7AAD-negativen E6-1 T-Lymphoblasten nimmt proportional zur Inkubationszeit mit BHA ab. b) Die Zellen wurden mit oder ohne mAk7C11 und BHA inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 1, 2, 3, 4, 5, 6, oder 7 Stunden. Die Apoptoserate wurde mit AnnV/7AAD Färbung im

Durchflusszytometer bestimmt. c) Die Zellen wurden für 7h mit oder ohne mAk7C11 inkubiert. Im Abstand von 1h wurde BHA (500mM) oder DMSO zugegeben. Die Apoptoserate wurde mit AnnV/7AAD Färbung im Durchflusszytometer bestimmt.

5.1.4 In A3.01 T-Lymphoblasten führt BHA zu einer verstärkten Apoptose

Bei der Wirkung von BHA auf apoptotische A3.01 T-Lymphoblasten wird klar, dass diese Zelllinie einen anderen Apoptosetyp repräsentiert. Bei ihnen bewirkt die Behandlung mit BHA und 7C11 eine Zunahme der Apoptose:

Wiederum wurde eine 7h Kinetik durchgeführt. Unbehandelte A3.01 T-Lymphoblasten wurden in stündlichem Abstand mit BHA (500mM) in An- oder Abwesenheit von mAk7C11 (200ng/ml) oder mit DMSO mit oder ohne mAk7C11 behandelt.

Hier aber kam es zu einem ganz anderen Effekt: BHA verstärkte das Erscheinen von Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite im Vergleich zu den nur mit mAk7C11 behandelten Zellen zu jedem Zeitpunkt.

Als mögliche Erklärung kann nun die Zugehörigkeit zu den verschiedenen Zelltypen herangezogen werden:

Während durch Caspaseinhibitoren wie zVAD-fmk bei A3.01 Zellen als alternativer Signalweg Nekrose ausgelöst wird, zeigen E6-1 Jurkat-Zellen nur eine Inhibition der Apoptose ohne Nekrose. Man könnte so vermuten, dass in diesem Experiment durch eine Inhibition der Nekrose (durch BHA) eine forcierte Apoptose ausgelöst wird: wenn der eine Signalweg wegfällt, tritt der andere in Erscheinung oder wird verstärkt.

BHA hemmt also folglich entweder verschiedene Signalwege, nämlich den nekrotischen (bei A3.01 Zellen) und den Caspase-abhängigen (bei E6-1 Zellen), oder E6-1 Zellen verfügen zusätzlich noch über einen weiteren Signalweg, der essentiell für den Ablauf der Apoptose ist.

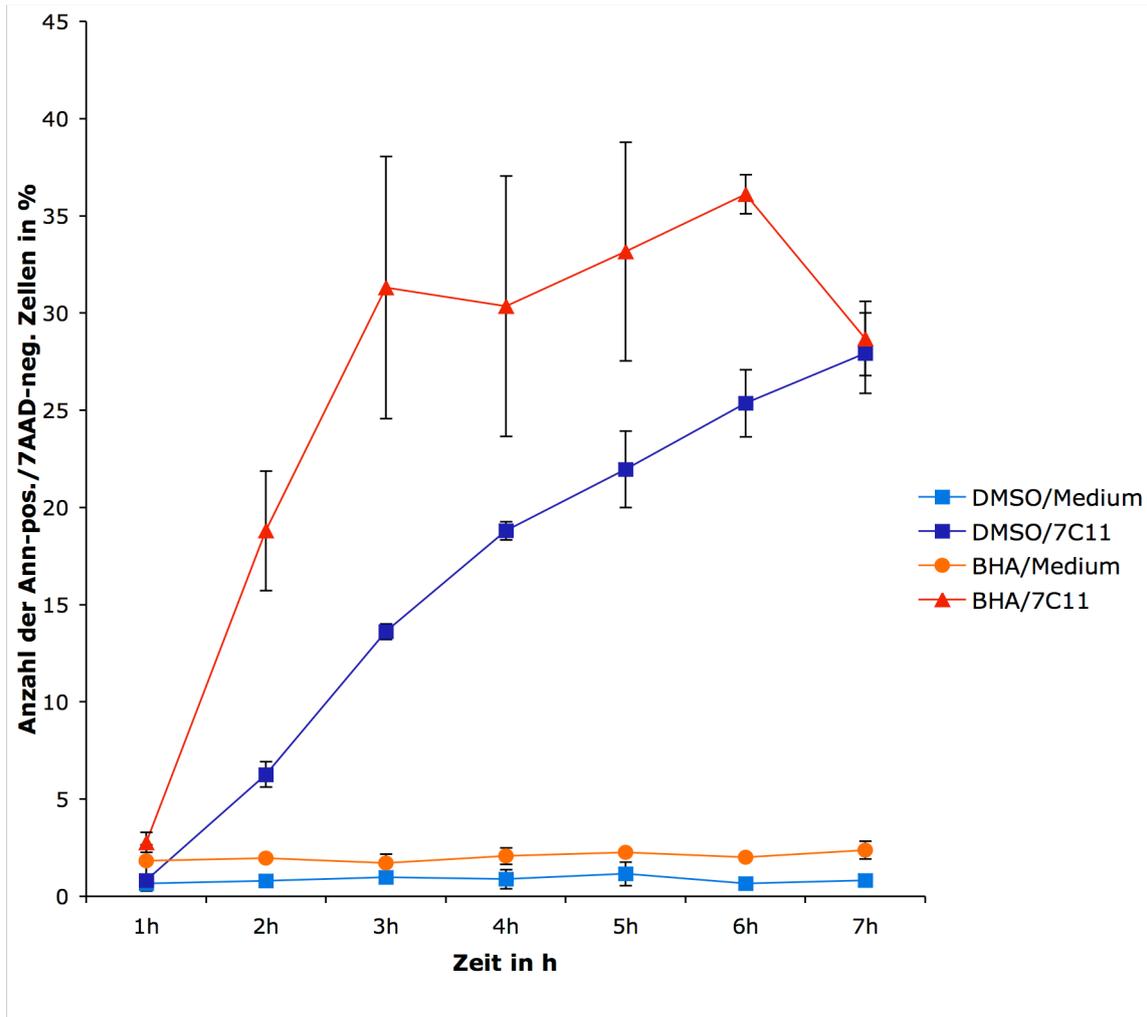


Abb. 5.1.4: BHA fördert die Apoptose in A3.01 T-Lymphoblasten. Die unbehandelten Zellen wurden im Abstand von 1h mit BHA (500mM)/bzw. DMSO mit oder ohne mAk7C11 inkubiert. Die Apoptoserate wurde mit Annexin V/7AAD Färbung im Durchflusszytometer bestimmt.

5.1.5 PBMC reagieren auf BHA mit verstärkter Apoptose

Nachdem die Ergebnisse bei den zwei Zelllinien E6-1 und A3.01 sehr unterschiedlich ausgefallen sind, sollte als nächstes die Wirkung von BHA auf humane periphere Blutmonozyten (PBMC) ausgetestet werden. Da natürliche, isolierte PBMC nicht auf Apoptosestimuli reagieren, mussten die Zellen zuerst stimuliert werden, z.B. mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA). Erst nach Stimulation exprimieren diese Zellen

CD95-Rezeptoren und werden empfänglich für Apoptosestimuli, besonders unter dem Einfluss des Zytokins Interleukin 2, welches im Kulturmedium enthalten war.

Die PBMC wurden 5 Tage nach Stimulation, wie vorher schon beschrieben, stündlich mit BHA bzw. DMSO in An- oder Abwesenheit von mAk7C11 inkubiert. Wie bei der A3.01 Zelllinie konnte eine verstärkte Apoptoserate unter dem Einfluss von BHA festgestellt werden.

PBMCs scheinen also ähnliche Signalwege aufzuweisen wie A3.01. Durch die Hemmung des nekrotischen Zelltods könnte die Apoptose forciert werden.

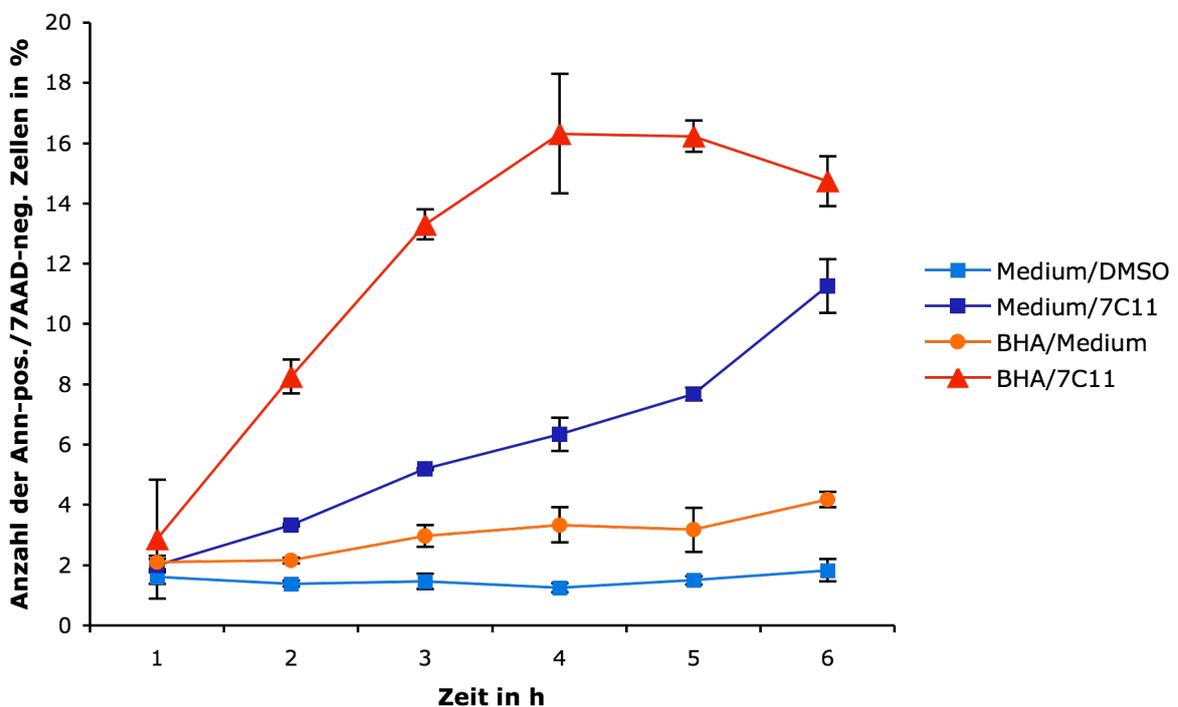


Abb. 5.1.5: BHA fördert die Apoptose in PBMC: Die unbehandelten Zellen wurden im Abstand von 1h mit BHA (500mM)/bzw. DMSO mit oder ohne mAk7C11 inkubiert. Die Apoptoserate wurde mit AnnV/7AAD Färbung im Durchflusszytometer bestimmt.

5.2 Die Reaktivierung von HIV durch CpG-ODNs

Die Problematik des Virusreservoirs in chronisch HIV-infizierten, ruhenden Zellen ist ein limitierender Faktor für den Erfolg von HAART. Obwohl HAART den Virustiter im

Plasma infizierter Personen bis unter die Sensitivitätsgrenze klinischer Tests senkt, kann das Virus nicht vollständig aus dem Körper entfernt werden. Als Folge davon müssen Erkrankte lebenslang mit der komplexen antiretroviralen Therapie behandelt werden. Das HI-Virus ist in ruhenden Zellen eingebettet in das Wirtsgenom, repliziert aber nicht. Sobald diese Zellen aktiviert werden, kommt es zur Transkription und Translation der Virus-DNA; der Virustiter im Blut steigt an. HIV in den Virusreservoirs muss folglich reaktiviert werden, um es der HAART zugänglich zu machen.

Verschiedene Versuche, die Replikation des Virus in diesen Zellen zu aktivieren, wurden bereits gemacht. So zeigt sich eine Reaktivierung von HIV in chronisch infizierten Zelllinien durch physiologische Substanzen wie TNF- α , IL-1 β , und IFN- γ [95]. Aber auch verschiedene chemische Substanzen, wie der Phorbol-ester PMA [96], Prostratin [97], oder Trichostatin A [98] erzielten ähnliche Wirkung. Olaf Kutsch et al. zeigten zudem die Reaktivierung durch kostimulatorische Moleküle, wie CD40 [99]. Allen diesen Stoffen gemeinsam ist letztendlich die Aktivierung von NF κ B.

Aufgrund der Beobachtung, dass bakterielle Infektionen bei HIV-positiven Individuen oftmals mit einer gesteigerten Virämie einhergehen (Übersichtsartikel [100] [101]), wird in dieser Arbeit versucht, mit CpG-ODNs, synthetischen CpG-Sequenzen, die einen Bestandteil bakterieller DNA bilden, eine Reaktivierung von HIV in latenten Zellen *in vitro* hervorzurufen. Es wurden verschiedene DNA-Sequenzen getestet, um eine unspezifische Wirkung von beliebigen DNA-Sequenzen auszuschließen. Als Zellmodell wurden chronisch infizierte ACH-2 T-Lymphoblasten eingesetzt, welche mit der Zelllinie A3.01 verwandt sind. Diese Zellkultur produziert Virus nur in geringfügigen Mengen, der Großteil der Zellen verbleibt im inaktiven Zustand. Erst nach einer adäquaten Stimulation erfolgt die Virusreplikation in größerem Umfang. Die Messung der Reaktivierungsrate erfolgte mit dem Durchflusszytometer: Das Virusprotein p24 wurde mit dem Mausantikörper anti-HIVp24 mAk markiert, und mit dem daran bindenden Anti-Maus-IgG-Antikörper, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, detektiert (s. Material und Methoden). Die Menge an produziertem p24 verhält sich proportional zur Effektivität der Virusreplikation. Die Aktivierungsrate der Zellen wurde mithilfe des anti-CD69 Antikörpers gemessen. In allen folgenden Experimenten wurde die Messung der Reaktivierungsrate von HIV und der Zellaktivierungsrate auf diese Art und Weise bestimmt.

5.2.1 CpG-ODNs reaktivieren HIV in ACH-2 Zellen

Um zu überprüfen, ob die immunstimulatorischen Eigenschaften bakterieller DNA-Sequenzen auch eine direkte Wirkung auf die Replikation von HIV zeigen, wurden latent-infizierte ACH-2 Zellen mit unterschiedlichen CpG- und nicht-CpG-Sequenzen behandelt.

Es wurden verschiedene CpG- und nicht-CpG-ODNs ausgetestet. Die ACH-2 Zellen wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen DNA-Sequenzen inkubiert.

Die Behandlung mit der CpG-Sequenz ODN 2006 führte zu einer signifikanten Reaktivierung von HIV. Auch die CpG-Sequenz ODN 1040 erzielte eine Vermehrung an HIV produzierenden Zellen. ODN 2041, das keine CpG Motive enthält, zeigte dagegen keinen Effekt auf die Reaktivierungsrate, genau wie eine mutierte Version von ODN 2006, ODN 2006 4x TG. Bei dieser Non-CpG Sequenz sind alle Cytidinbasen gegen Thymin ausgetauscht worden.

Es kann somit festgestellt werden, dass CpG-Sequenzen HIV reaktivieren, dieser Effekt sequenz-spezifisch ist und nicht durch die PTO-Modifikation hervorgerufen wird.

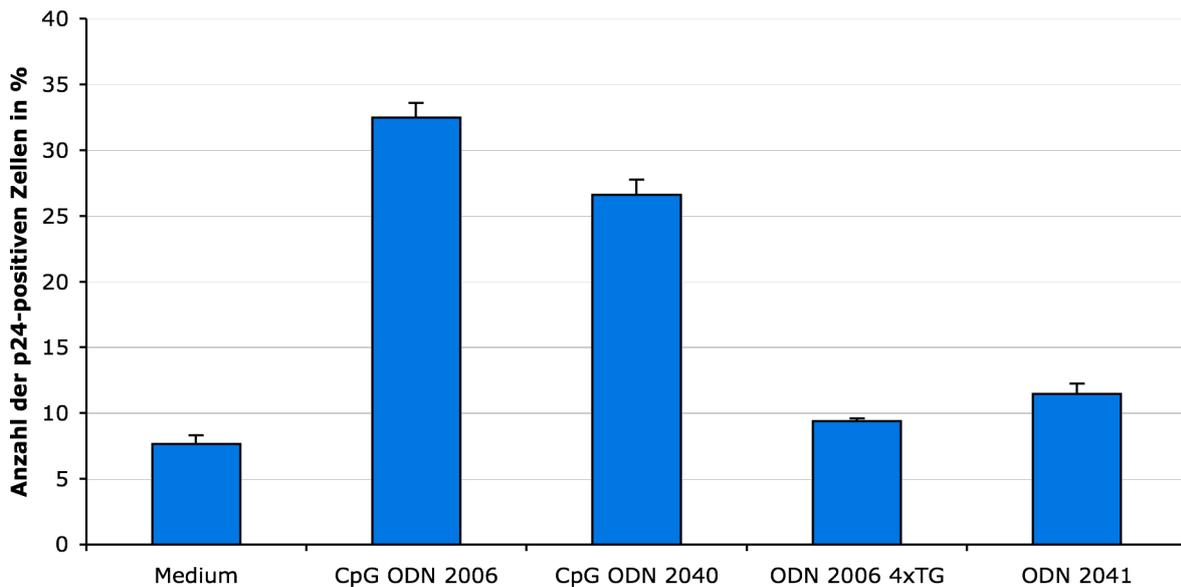


Abb.5.2.1: HIV Reaktivierung erfolgt nach Stimulation mit CpG Motiven. ACH-2 T-Lymphoblasten wurden für 24h mit unterschiedlichen PTO-ODN Sequenzen inkubiert. Die Messung der HIV-Reaktivierungsrate erfolgt mit dem Durchflusszytometer.

5.2.2 ACH-2 Zellen werden durch CpG-ODNs nicht aktiviert

Um zu überprüfen, ob die HIV-Reaktivierung durch CpG-ODNs als Folge einer Aktivierung der Zellen verursacht worden sein könnte, wurden ACH-2 Zellen mit ODN-CpG 2006, Phytohämagglutinin (PHA)/Interleukin-2 (IL-2) und Paramethoxyamphetamin (PMA)/Ionomycin behandelt. Anschließend wurde sowohl die Expression von p24, als auch die Aktivierungsrate der Zellen mit dem anti-CD69 mAk gemessen. PMA/Ionomycin zeigte erwartungsgemäß eine Aktivierung der Zellen und der Virusproduktion, und diente als Positivkontrolle. PHA/IL-2 zeigte weder eine signifikante HIV-Aktivierung, noch eine Zellaktivierung im Vergleich zu der Negativkontrolle.

Die CpG-Sequenz ODN 2006 dagegen aktivierte die Virusreplikation, ohne dabei die ACH-2 Zellen zu stimulieren.

CpG Motive aktivieren also die Virusreplikation unabhängig von einer Aktivierung der Zelle.

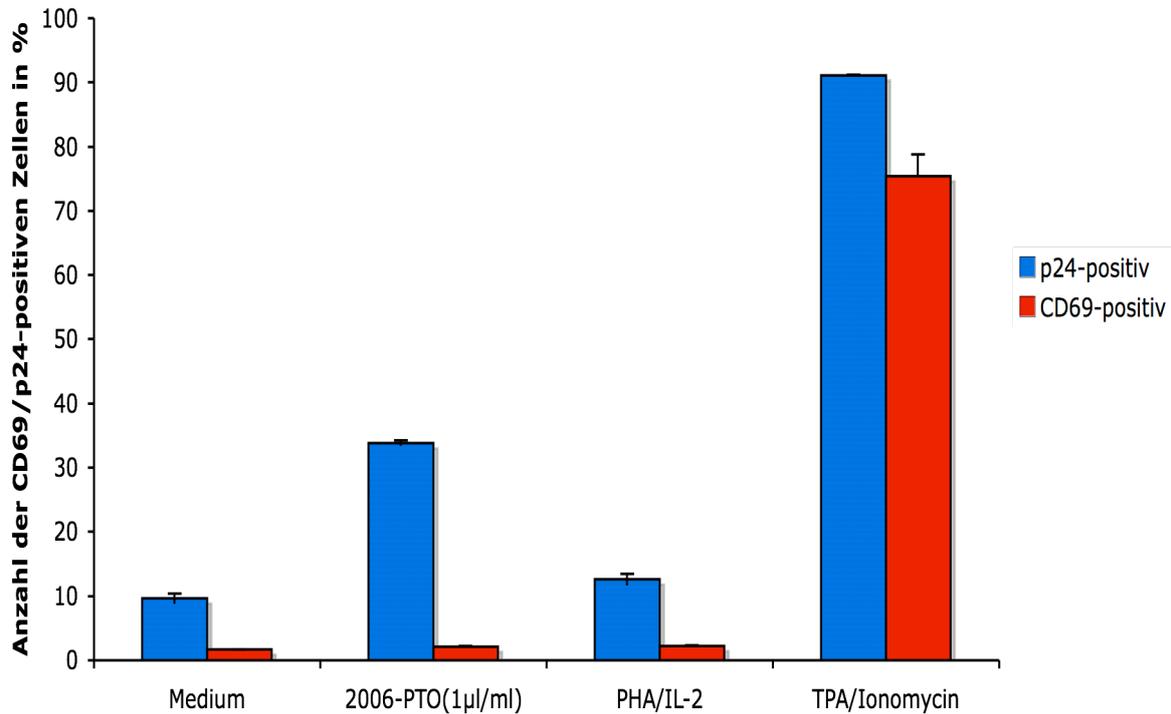


Abb. 5.2.2: CpG-Motive aktivieren HIV, aber nicht ACH-2 Zellen. ACH-2 Zellen wurden für 24h mit der CpG-Sequenz ODN 2006, PHA/IL-2 und TPA/Ionomycin inkubiert. Danach wurde die Zellaktivierung und die Reaktivierung von HIV mit anti-CD69mAk und anti-p24mAk im Durchflusszytometer bestimmt.

5.2.3 CpG-ODNs haben keinen Einfluss auf die Aktivierung CD3-positiver PBMCs

Da ACH-2 Zellen nicht durch CpG-ODNs aktiviert werden konnten, sollte festgestellt werden, ob sich humane periphere mononukleäre Blutzellen, die nicht infiziert sind, ähnlich verhalten, oder ob der Effekt durch eine Eigenheit der Zelllinie bedingt ist. Da ACH-2 Zellen als T-Lymphoblasten CD3-positiv sind, PBMCs jedoch ein Gemisch verschiedener Zellarten darstellt, wurde die PBMC Zellkultur im Durchflusszytometer durch anti-CD3mAk in CD3-positiv (T-Zellen), und CD3-negativ (B-Zellen, Makrophagen, usw.) aufgetrennt. Die Zellaktivierung wurde gleichzeitig mit einem

anti-CD69mAk im Durchflusszytometer gemessen. PMA/Ionomycin, ein starkes Stimulans für CD3-positive und -negative Zellen diente als Positivkontrolle.

Genauso wie bei ACH-2 Zellen zeigte sich bei CD3-positiven Zellen keine Erhöhung der Anzahl aktivierter Zellen unter dem Einfluss der CpG-Sequenz ODN 2006. Auch andere CpG- und Non-CpG-Sequenzen, wie ODN 2040, ODN 2006 Me, ODN 2041, ODN 2006 4 x TG konnten CD3-positive PBMCs nicht aktivieren.

Im Gegensatz dazu konnten CD3-negative Zellen (z.B. B-Zellen) von allen Cpg- und Non-CpG-Sequenzen aktiviert werden.

Diese Ergebnisse könnten durch den in Abb. 1.2.3 abgebildeten Mechanismus erklärt werden: Während B-Zellen als Träger von TLR9 direkt von CpG-Motiven aktiviert werden, dauert die indirekte Stimulation von Antigen-spezifischen T-Zellen durch pDCs meist Tage und kann in diesem Versuch also nicht beobachtet werden.

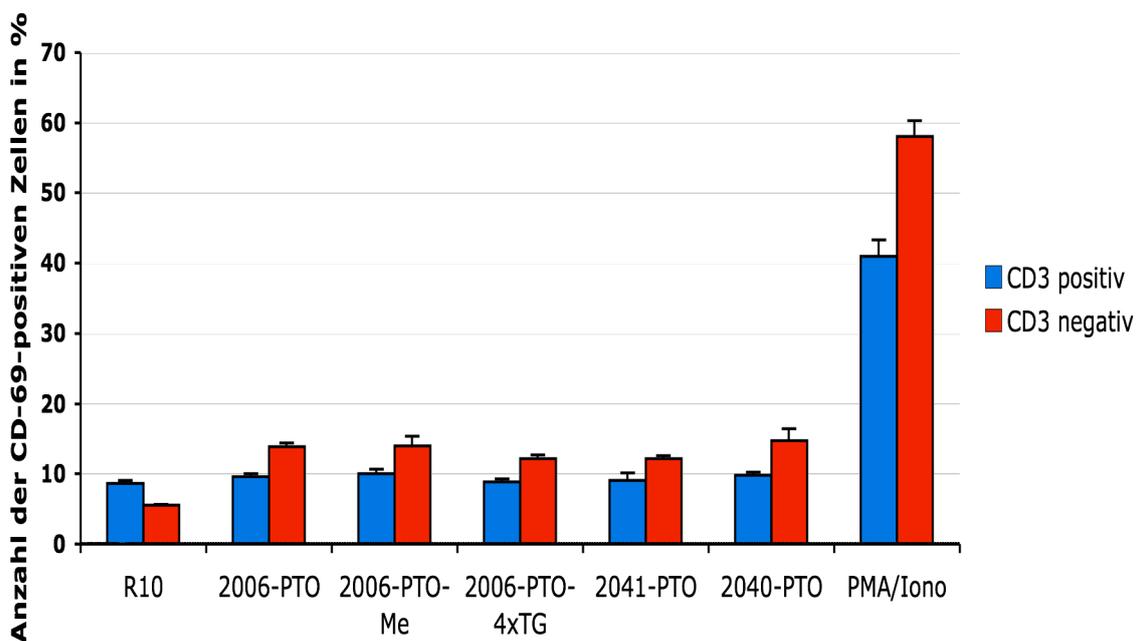


Abb. 5.2.3: CD3 positive PBMCs werden durch CpG Motive nicht aktiviert. PBMCs wurden für 24h mit verschiedenen CpG und Non CpG Sequenzen behandelt. Um isoliert die CD3+ Zellpopulation beurteilen zu können, wurden sie mit anti-CD3mAK in CD3+ und CD3- aufgetrennt, während die Ermittlung der Zellaktivierung durch anti-CD69mAk im Durchflusszytometer erfolgte.

5.2.4 Der NFkB-Inhibitor CAPE erhöht die durch CpG Motive verursachte Reaktivierung von HIV

Der Transkriptionsfaktor NFkB spielt eine große Rolle in der Regulation der Transkription von HIV. Die LTR (long terminal repeats) im HIV-Genom weisen zwei Bindungsstellen für NFkB auf. Aus diesem Grund wurde versucht, die Reaktivierung von HIV durch CpG-ODNs durch den NFkB-Inhibitor CAPE (Caffeic acid phenylethyl ester) zu hemmen. CAPE ist bekannt für immunstimulatorische, antiinflammatorische und antikarzinogene Wirkungen. Zudem verhindert es die Translokation der p65-Untereinheit von NFkB in den Nukleus und die Resynthese des physiologischen Inhibitors Ikb α . Diese Wirkung ist spezifisch für NFkB und kann nicht auf andere Transkriptionsfaktoren übertragen werden [102]. ACH-2 Zellen wurden für 24 h mit CAPE in verschiedenen Konzentrationen (10-50 μ M) in An- oder Abwesenheit der CpG-Sequenz ODN 2006 inkubiert. Die Messung der p24-Aktivität erfolgte mit dem Durchflusszytometer.

Erstaunlicherweise hemmte CAPE die HIV-Reaktivierung nicht, sondern steigerte sie bei Konzentrationen von 10-30 μ g/ml sogar noch. Erst ab der Konzentration von 40 μ g/ml zeigte sich eine leichte Hemmung. Gleichzeitig wurde ein Anstieg der HIV-Reaktivierungsrate in der Negativkontrolle, die nur mit CAPE behandelt wurde, beobachtet.

Dies deutet darauf hin, dass CAPE selbst innerhalb bestimmter Konzentrationen HIV in latent-infizierten Zellen reaktivieren kann. Eventuell ist dieser Effekt auf die immunmodulatorische Fähigkeit von CAPE zurückzuführen.

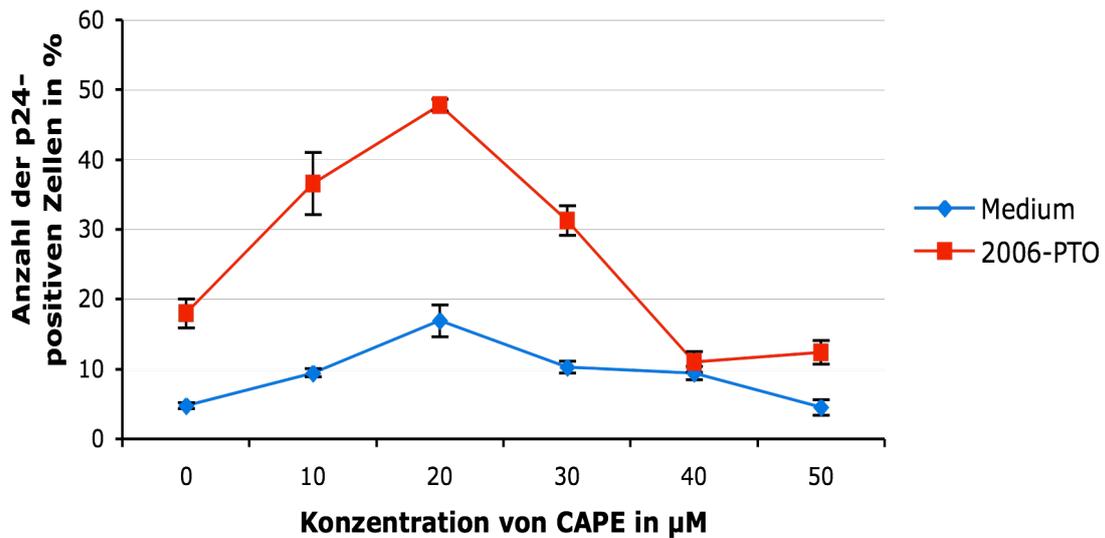


Abb.5.2.4: CAPE aktiviert die HIV-Replikationsrate in ACH-2 Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentration von CAPE in An- bzw. Abwesenheit der CpG-Sequenz ODN 2006 inkubiert. Die Messung der Reaktivierungsrate erfolgte nach Anfärbung mit anti-p24mAk und anti-Maus-Antiserum mit dem Durchflusszytometer.

5.2.5 Der NFkB-Inhibitor SN50 zeigt keinen Effekt auf die Reaktivierung von HIV

Im Gegensatz zu CAPE bindet SN50 an die p50-Untereinheit von NFkB. Es verhindert ebenfalls die Translokation in den Nukleus (über eine Hemmung der Phosphorylierung und Degradierung von I κ B α), und die Bindung an die virale DNA.

Genauso wie in 5.2.4 wurden ACH-2 Zellen für 24 h mit SN50 (2-20 μM) mit oder ohne der CpG-Sequenz ODN 2006 inkubiert und danach die Replikationsrate über die Expression von p24 im Durchflusszytometer gemessen.

Diesmal konnte kein Effekt auf die Reaktivierungsrate von HIV beobachtet werden (Abb.5.2.5). Die Verringerung der p24-Expression bei einer SN50-Konzentration von 10 μM dürfte wohl auf einem Messfehler beruhen, da der Fehlerbalken größer ist, und der Effekt sonst bei keiner anderen Konzentration zu beobachten ist.

Der Versuch, die Reaktivierung von HIV in chronisch-infizierten Zellen durch eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF κ B zu blockieren ist also fehlgeschlagen, obwohl NF κ B nachweislich durch CpG-ODNs aktiviert wird [103]. Es wäre denkbar, dass HIV durch andere Transkriptionsfaktoren zusätzlich reaktiviert wird. So wurde bei der Reaktivierung von HIV durch PMA die Bedeutung von AP-1 erkannt [104].

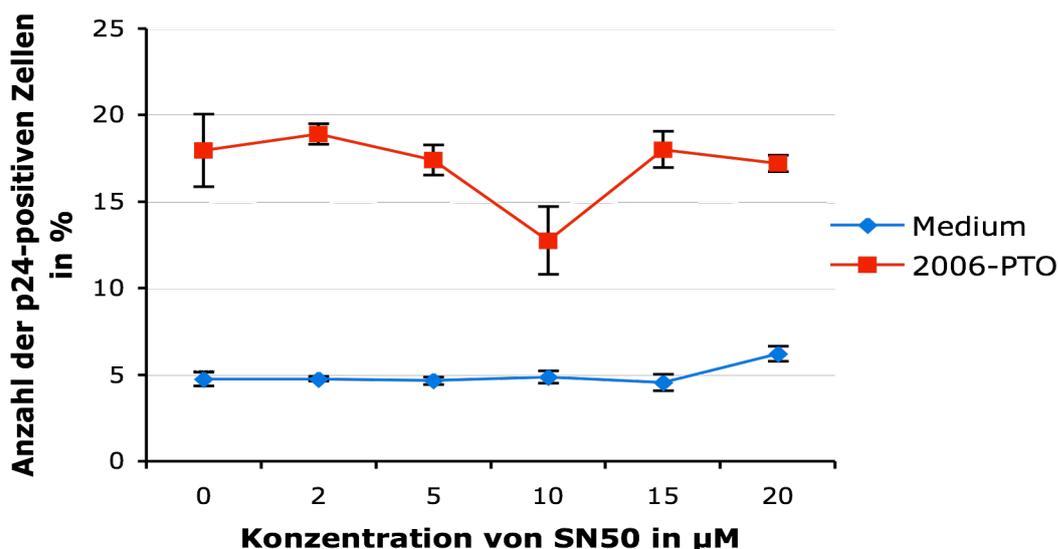


Abb. 5.2.5: SN50 zeigt keine Wirkung auf die durch CpG-ODNs hervorgerufene Reaktivierung von HIV in ACH-2 Zellen. Die chronisch-infizierten Zellen wurden für 24 h mit SN50, mit oder ohne die CpG-Sequenz ODN 2006 behandelt. Die Expression von p24 wurde nach Färbung mit anti-mAkp24 und FITC markiertem anti-Maus-Antiserum im Durchflusszytometer bestimmt.

5.2.6 Die Hemmung des ERK/MAPK Signalweges durch UO126 hat keinen Einfluss auf die Reaktivierung von HIV

Da die Inhibition der Reaktivierung von HIV durch NF κ B-Inhibitoren keinen Erfolg erzielt hat, sollte nun versucht werden, auf den Transkriptionsfaktor AP-1 einzuwirken. Dieser wird über die MAP-Kinase-Kaskade aktiviert, die etwa durch UO126 gehemmt wird [105]. Bei Experimenten, in welchen CD40/CD40L zur Reaktivierung von HIV in

chronisch-infizierten Zelllinien benutzt wurde, konnte der Effekt durch UO126 blockiert werden [99].

ACH-2 Zellen wurden 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an UO126 inkubiert (0-40 μM). Es konnte kein Einfluss auf die Reaktivierung von HIV festgestellt werden.

CpG-Sequenzen stimulieren die HIV-Replikation also nicht über den ERK/MAPK-Signalweg. Da AP-1 fast ausschließlich über diese Kinasekaskade aktiviert wird, ist es fraglich, ob dieser Transkriptionsfaktor zur Reaktivierung von HIV durch CpG-ODNs beiträgt.

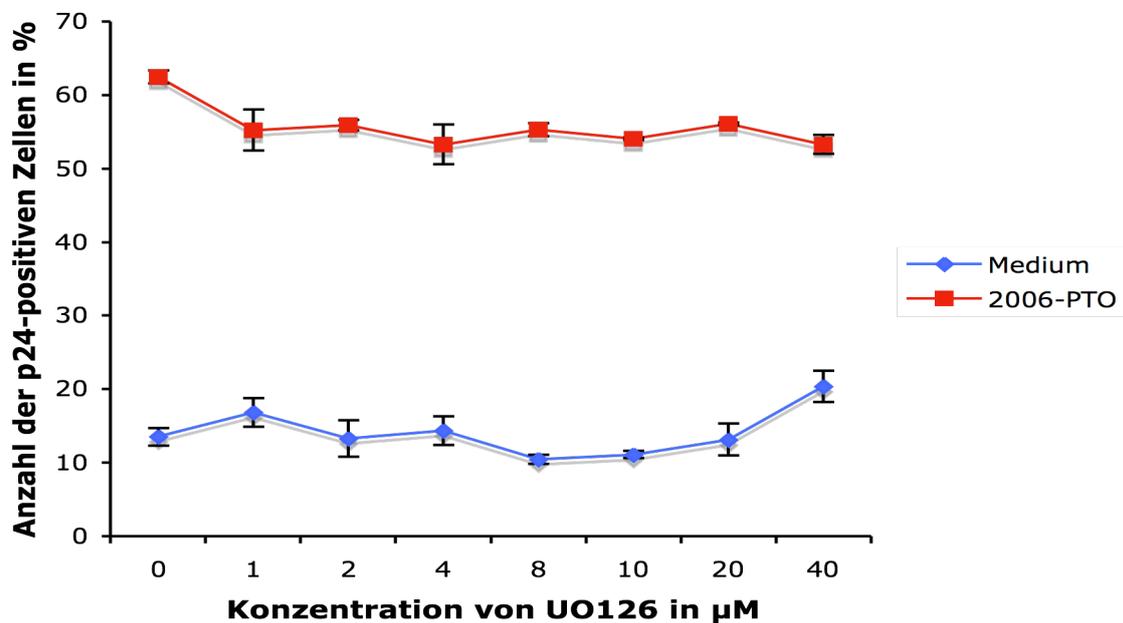


Abb. 5.2.6: *UO126 kann die Reaktivierung von HIV durch CpG ODNs nicht blockieren.* ACH-2 Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an UO126 behandelt, in An- oder Abwesenheit von CpG-ODN. Die Reaktivierungsrate wurde im Durchflusszytometer bestimmt.

6. Diskussion

6.1 Die Wirkung von Antioxidantien auf den Verlauf der Apoptose in verschiedenen Zellmodellen

Entgegen der früheren Annahme, Apoptose sei ein klar strukturierter Mechanismus, der über die Aktivierung verschiedener Caspasen zur DNA-Fragmentation und zum nichtinflammatorischen Zelltod führt, während Nekrose das Gewebe schädigende Pendant dazu darstellt, wird heute die Existenz vieler verschiedener zur Apoptose führender Wege in Betracht gezogen [6].

In dieser Arbeit haben die Antioxidantien NAC und BHA unterschiedliche Wirkungen auf Apoptose und Phosphatidylserin-Flipflop in den verwendeten Zelllinien erzielt: obwohl alle Zellen mit CD95L stimuliert wurden, konnte man unter dem Einfluss von BHA bei A3.01 und PBMCs eine Verstärkung, bei E6-1 eine Hemmung des Phosphatidylserin-Flipflops beobachten. NAC dagegen hemmte den Phosphatidylserin-Flipflop bei beiden Zelllinien gleichermaßen. Das Auslösen des Phosphatidylserin-Flipflops wurde dabei als Apoptosezeichen gewertet.

Daraus lassen sich zwei Denkansätze ableiten:

- a) NAC und BHA müssen unterschiedliche Reaktionswege im Ablauf der Apoptose angreifen.
- b) Die Zelllinien müssen voneinander verschiedene Signalwege zur Vermittlung der Apoptose besitzen.

In den folgenden Unterpunkten sollen diese Zusammenhänge näher betrachtet und erläutert werden.

6.1.1 Hypothesen über den durch BHA beeinflussbaren Signalweg bei A3.01

Schon in früheren Studien wurde neben der CD95 vermittelten Caspase-abhängigen Apoptose von A3.01 T-Lymphoblasten ein zweiter Signalweg vermutet [90]. Nach Stimulation von CD95 und der Zugabe des Caspaseinhibitors zVAD-fmk wurde die Apoptose erwartungsgemäß inhibiert. Gleichzeitig aber konnte noch eine Nekrose

beobachtet werden. Es wurde vermutet, dass beide Signalwege, die Apoptose und die Nekrose, unter normalen Umständen nebeneinander ablaufen, bei dem Ausschalten des einen (durch zVAD.fmk), der andere, nämlich in diesem Fall die Nekrose, verstärkt wird. Interessanterweise hängt das Reaktionsmuster der A3.01-Zellen dabei auch von der Art des Apoptosestimulus ab: Apoptoseinduktion mit den DNA-Topoisomerase-Inhibitoren Camptothecin und Etoposid unter Inhibition der Caspase führte zur Nekrose, während es nach Behandlung mit dem Serpase-Inhibitor TPCK nicht zur Nekrose kam [106]. Weitergeführt wurde dieses Experiment durch die Stimulation von CD95 und dem Zusatz von zVAD-fmk und dem Radikalfänger BHA [90]. BHA zusammen mit zVAD-fmk hemmte nun nach Apoptoseinduktion, neben der Apoptose (Hemmung durch zVAD-fmk), auch noch die Nekrose (Hemmung durch BHA) [90]. Weiterhin ist BHA bekannt für die Hemmung der Lipidperoxidation [107] und des Cytochroms P450 [108], sowie für eine Aktivierung der GSH-Transferase [109]. Resultat ist die verminderte Bildung von ROS. Daneben wird noch der Einfluss von ROS auf die Aktivität der Bcl-2 Proteinfamilie diskutiert [21]. So wäre es auch möglich, dass BHA direkt auf diese mitochondrialen Proteine Einfluss nimmt.

Interessanterweise wird mit der vorliegenden Arbeit eine Verstärkung der Apoptose nach CD95-Stimulation und Behandlung mit BHA beschrieben. In Übertragung auf die mit zVAD-fmk gemachte Beobachtung kann man davon ausgehen, dass durch die Hemmung der Nekrose die Apoptose forciert wird. Abb. 5.1.1 zeigt einen Überblick der Theorie.

Da Experimente mit menschlichen PBMC ähnliche Ergebnisse brachten [90], und in dieser Arbeit nach Zugabe von BHA auf CD95 stimulierte PBMC ebenfalls die Apoptoserate stieg, muss von vergleichbaren Verhältnissen bei primären humanen T-Zellen ausgegangen werden: Auch bei ihnen läuft ein nekrotischer neben einem apoptotischen Signalweg ab.

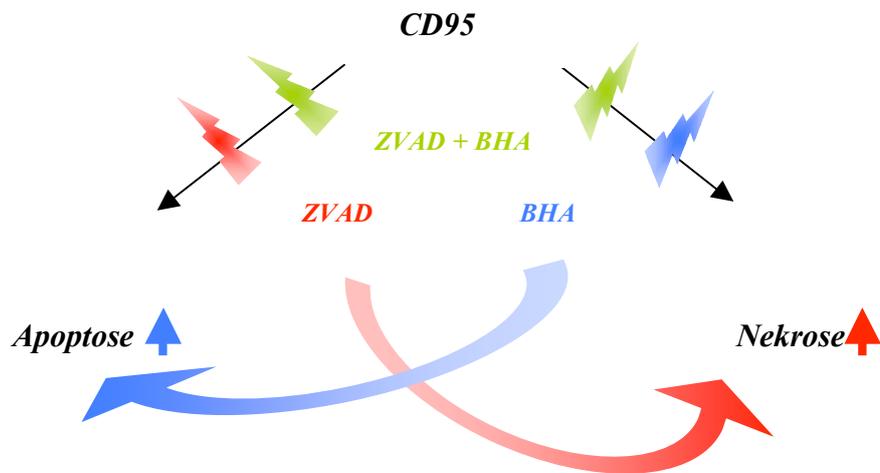


Abb. 6.1.1: ZVAD verstärkt die Nekrose, BHA die Apoptose, unter jeweiliger Hemmung des anderen Signalweges bei A3.01 T-Lymphozyten.

6.1.2 Auch E6-1 Jurkat-Zellen könnten einen alternativen Signalweg aufweisen

Im Gegensatz zu der A3.01 Zelllinie *hemmt* BHA die Apoptose in E6-1 Jurkat-Zellen. Die durch CD95 induzierte Apoptose bei E6-1 Jurkat-Zellen wird durch Caspaseinhibitoren vollständig blockiert [90]: Es konnte keine sekundäre Nekrose beobachtet werden. So ist man davon ausgegangen, dass diese Zelllinie nur über den Caspase-abhängigen Signalweg verfügt.

Es stellt sich also die Frage, warum BHA, das bestimmt nicht die Caspasekaskade hemmt, überhaupt eine Wirkung (und noch dazu eine anti-apoptotische) bei E6-1 Jurkat-Zellen zeigt, wenn kein anderer Signalweg existiert.

Aufgrund dieser Tatsache und verschiedenen Studien, in welchen E6-1 Jurkat-Zellen trotz der Blockierung der Caspase 8 apoptotisch wurden [9], drängt sich nun immer mehr die Vorstellung eines zweiten Signalweges bei E6-1 Jurkat-Zellen auf: da die hemmende Wirkung von BHA in dieser Arbeit belegt ist, wird es sich wahrscheinlich

um einen redox- vermittelten Signalweg handeln, der eventuell über die Mitochondrien vermittelt wird.

Dieser zweite Signalweg kann alleine, ohne mithilfe der Caspasen, die Apoptose nicht auslösen, sonst könnte zVAD-fmk die Apoptose nicht komplett inhibieren. Es muss sich also um eine Signalvermittlung handeln, die nicht auf Caspasen beruht, isoliert nicht zur Apoptose führt, aber essentiell für die Ausführung der Apoptose ist:

Ohne ihn (z.B. wenn er durch BHA inhibiert wird) kann keine Apoptose stattfinden.

Klarer wird diese Beobachtung durch ein Zellmodell, das einige Arbeitsgruppen favorisieren [19, 110]. Dieses soll im folgenden Kapitel näher beschrieben werden.

6.1.3 Erklärung der unterschiedlichen Wirkung von BHA mithilfe der Einteilung in Zellen in zwei unterschiedliche Zelltypen

Neben verschiedenen anderen Versuchen, die verwirrende Vielfalt von nebeneinander ablaufenden Signalwegen während der Apoptose zu klassifizieren, existiert die Aufteilung von Zellen in zwei verschiedene Gruppen: Typ 1 und Typ 2 Zellen.

Die Zellen vom Typ 1, worunter beispielsweise T-Lymphozyten fallen, führen die Apoptose über den altbekannten Weg der Caspasen aus [110]. Eine Beeinflussung der mitochondrialen Funktion durch anti-apoptotische Bcl-2 Proteine kann hier die Apoptose nicht verhindern [19]. Dazu sind lediglich Caspaseinhibitoren fähig.

Die phylogenetisch älteren Zellen vom Typ 2 (zum Beispiel Hepatozyten), sind dagegen noch auf andere Signalwege angewiesen: für die Exekution der Apoptose wird bei ihnen zusätzlich noch eine mitochondriale Verstärkung benötigt. Wird diese Unterstützung durch die Mitochondrien zum Beispiel durch anti-apoptotische Bcl-2 Proteine unterbunden, kann trotz CD95 Stimulation keine Apoptose stattfinden [111, 112].

Dieser mitochondriale Weg wurde schon in 1.1.3 zum Großteil beschrieben. Dort wurde er dem apoptose-ähnlichen PCD, zum Teil aber auch dem klassischen PCD zugeordnet: die Caspase 8 aktiviert BH3-only Proteine der Bcl-2 Superfamilie. Diese wiederum aktivieren entweder die pro-apoptotischen Proteine der Familie (wie Bax und Bak), oder inhibieren die anti-apoptotischen Proteine (z.B. Bcl-2, Bcl-x_L). Durch die Vermittlung von Bax und Bak kommt es schließlich zur Freisetzung von Cytochrom c, AIF,

SMAC/Diablo und IAPs, die alle entweder direkt, oder über die Bildung von Apoptosomen zum Zelltod führen. Abb. 5.1.3 gibt einen schematischen Überblick über beide Zellmodelle.

Es kann nun die Hypothese aufgestellt werden, dass zu den Zellen Typ 1, zu denen T-Lymphozyten gehören, auch humane PBMCs, und die Zelllinie A3.01 gezählt werden können: Obwohl natürlich die spezifische Wirkung von BHA auf die mitochondrialen Signalwege nicht bewiesen ist, kann eine Einflussnahme auf sie nicht ausgeschlossen werden. Schließlich ist BHA ein Radikalfänger und die Aktivität der Mitochondrien ist stark vom Redoxpotential der Zelle abhängig. Zudem wurde schon in früheren Studien eine Hemmung der BCL-2-Aktivität durch reaktive Sauerstoffspezies berichtet [21]. BHA könnte diesen Vorgang inhibieren. Wenn also bei PBMCs und A3.01 Zellen versucht wird, durch BHA Einfluss auf die Mitochondrien zu nehmen, hat dies keine hemmende Wirkung auf die Apoptose, da sie *nicht abhängig* von dem durch BHA inhibierbaren Nekroseweg ist. Die darüber hinausgehende Verstärkung der Apoptose liegt dann wohl an dem Wegfall des beschriebenen Nekrosewegs.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob es sich bei diesem Signalweg wirklich um echte Nekrose handelt, oder um einen nekroseähnlichen PCD, der aktiv abläuft und durch Bcl-2, Proteinase, u.a. aufgehalten werden kann [11]. Leider sind hierzu noch keine Studien bekannt, Nekrose und nekroseähnlicher PCD sind morphologisch nicht zu unterscheiden. Dennoch würde diese Überlegung gut zu der vermuteten Wirkung von BHA passen.

E6-1 Zellen dagegen scheinen sich gut in das Bild der Typ 2 Zellen einfügen zu lassen: durch die oben vermutete Wirkung von BHA auf die Mitochondrien würde also der Bax/Bak vermittelte pro-apoptotische Effekt gehemmt werden. Daraus resultiert dann die in 4.1.3 beschriebene Hemmung der Apoptose, da in Typ 2 Zellen die mitochondriale Verstärkung notwendig für eine erfolgreiche Ausführung der Apoptose ist.

Gegen diese eigentlich logischen Vermutungen stehen zwei andere Versuchsergebnisse: So berichtet eine Forschergruppe von einer durch BHA induzierten Apoptose in Rattenhepatozyten [94]. Eine andere beschreibt die Hemmung der Apoptose in mit BHA behandelten Thymuszellen von Ratten [93]. Es werden also genau gegenteilige Ergebnisse beschrieben: In Hepatozyten, welche zum Typ 2 gehören, soll die Apoptose verstärkt ablaufen, statt wie bei den Jurkat-Zellen gehemmt werden. Noch dazu wird

eine Hemmung in Thymozyten, den Vorläufern von T-Lymphozyten, beschrieben, obwohl diese eindeutig zu Typ 1 zugeordnet werden können.

Es ergeben sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten für diese Diskrepanz:

- 1) Rattenzellen reagieren anders als humane Zelllinien;
- 2) BHA hat doch keinen Einfluss auf die Mitochondrien, sondern wirkt über andere Mechanismen;

Allerdings wurden Jurkat-Zellen schon früher den Typ 2 Zellen zugeordnet. PBMC gehören als Lymphozyten eindeutig den Typ 1 Zellen an. Des Weiteren verhält sich die Theorie stimmig zu den Versuchsergebnissen, die Erklärung anhand des Modells ist in sich schlüssig. Deshalb wird in dieser Arbeit die mitochondriale Einflussnahme von BHA mit den beschriebenen Vorgängen als logische Folge davon favorisiert.

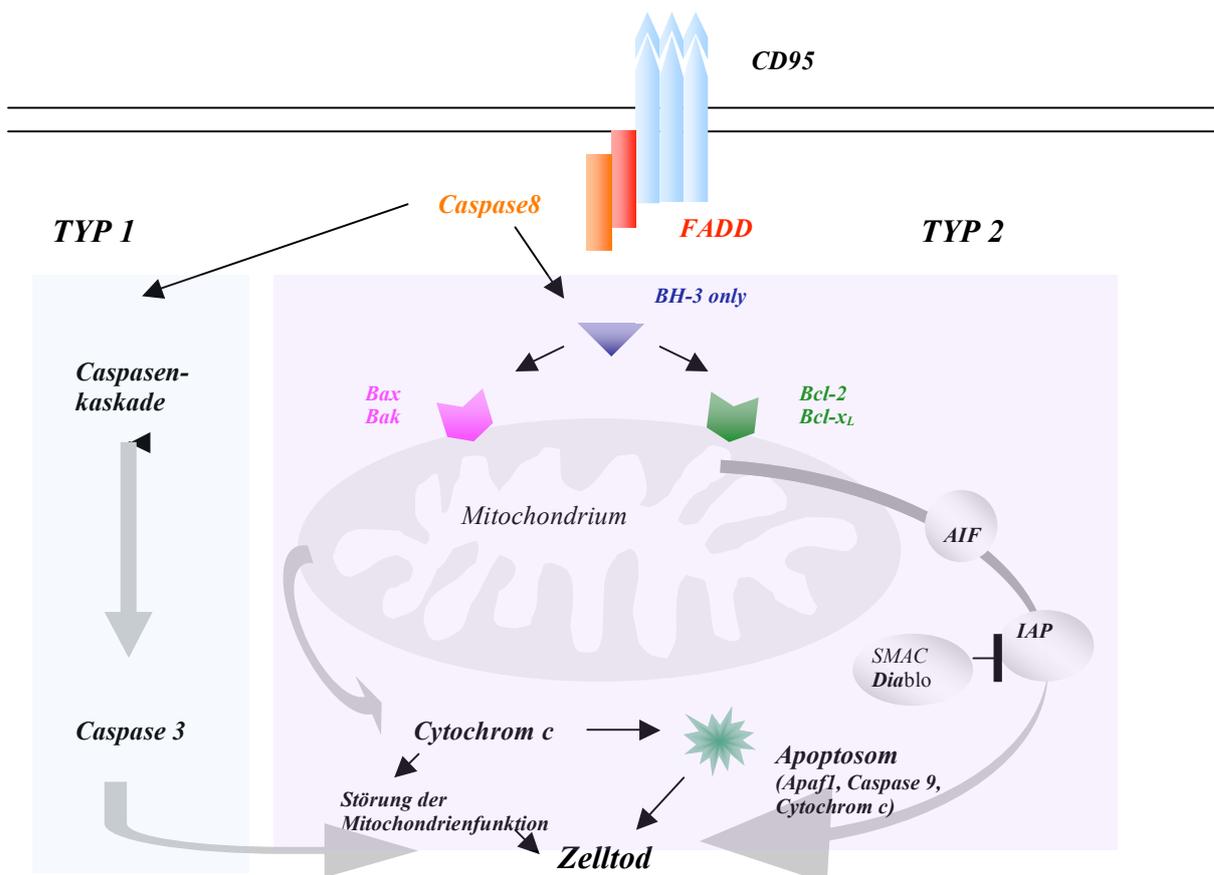


Abb. 6.1.2: Schematische Übersicht der Signalwege in Typ1 und Typ 2 Zellen (mod. nach [113]).

6.1.4 Mechanismus der durch NAC vermittelten Hemmung der Apoptose

NAC verhält sich ganz anders als das Antioxidans BHA. Sowohl in der A3.01 Zelllinie, als auch in der E6-1 Zelllinie wird durch NAC die Apoptose gehemmt.

Daraus lässt sich zumindest schließen, dass NAC nicht den Nekroseweg bei A3.01 Zellen hemmt. Gleichwohl löst die Hemmung der Apoptose in A3.01 auch nicht den alternativen Nekroseweg aus. Es muss folglich ein anderer Mechanismus hinter der inhibitorischen Wirkung vermutet werden.

NAC scheint beinahe wie eine Kombination von ZVAD und BHA zu wirken, woraus man schlussfolgern könnte, dass die Apoptose eventuell in einem früheren Stadium, also nicht während der Exekution, sondern schon während der Initiation gehemmt werden muss.

Tatsächlich wurde in einigen Studien die Rolle von NAC in der Regulation von Transkriptionsfaktoren beschrieben: So wurde gezeigt, dass Thiole, zu welchen auch NAC gehört, in die redoxvermittelte Regulation des Transkriptionsfaktors NFκB eingreifen. Durch Hemmung des Transkriptionsfaktors wird die Expression verschiedener Proteine, darunter auch CD95L verhindert [29].

Allerdings wurde in dem in dieser Arbeit besprochenen Versuch CD95L, bzw. der mkA7C11 im Überschuss dazugegeben, eine Expression durch die Zellen war hier also nicht nötig.

In einer weiteren Versuchsreihe jedoch wird eine durch NFκB induzierte Expression von CD95, also dem Rezeptormolekül vermutet [30].

Die Theorie der Hemmung von NFκB passt also bestens zu den Beobachtungen in dieser Arbeit.

6.1.5 Die Abhängigkeit des Phosphatidylserin-Flipflops von der Apoptose

Der Wechsel von Phosphatidylserin von der Membraninnenseite auf die Außenseite (Flipflop) wird allgemein als Apoptosezeichen anerkannt. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde das Erscheinen von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche als Apoptosezeichen genutzt (s. Material und Methode).

Phosphatidylserine werden auf der Innenseite der Plasmamembran gebildet. Eine spezifische Aminophospholipid-Translokase sorgt dafür, dass keine Phosphatidylserine auf die Außenseite gelangen [91].

Andere Gruppen zeigten, dass neben der redoxsensiblen Translokase noch andere Faktoren eine Rolle spielen [114]: die Inhibition der Translokase alleine reichte nicht aus, um den Flipflop zu verhindern. Dafür wurde die Abhängigkeit von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gezeigt; unter Ca^{2+} Mangel trat kein Phosphatidylserin-Flipflop auf, trotz eindeutiger Apoptosezeichen. Interessanterweise war bei dieser Arbeit der Versuch, die Aktivität der Translokase durch Antioxidantien zu erhalten, nicht erfolgreich.

In dieser Arbeit dagegen konnte gezeigt werden, dass NAC den Flipflop in beiden ausgetesteten Zelllinien sehr wohl verhindert. Es wäre also durchaus denkbar, dass NAC den Flipflop über eine Inhibition von Transkriptionsfaktoren hemmt.

Auch eine Beeinflussung der Ca^{2+} -Konzentration über einen Bcl-2 gesteuerten mitochondrialen Weg wäre denkbar. So könnte die Wirkung von BHA erklärt werden: in Jurkat-Zellen würde über eine Hemmung des mitochondrialen Weges die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration geändert, in A3.01 Zellen wäre die verstärkte Anwesenheit von Phosphatidylserin auf der äußeren Membranseite mit einem Wegfall des nekrotischen Weges und einer vermehrten Apoptoseaktivität zu erklären.

Dennoch bleibt die Beeinflussung des Flipflops durch Antioxidantien hier eine reine Spekulation, da die Quantifizierung der Anwesenheit von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche verknüpft war mit der Erhebung der Apoptoserate. Darüber hinaus konnte die Apoptose nur qualitativ mittels der erhöhten Granularität im SSC des Durchflusszytometers bestimmt werden.

6.2 Die Reaktivierung von HIV in chronisch infizierten Zellen durch CpG-ODNs

Die immunstimulatorische Wirkung von CpG-ODNs ist intensiver Forschungsgegenstand: Die Mechanismen, welche zur Zellaktivierung und Cytokinfreisetzung führen, sind zwar noch nicht bis ins Detail geklärt, aber es konnte ein Überblick über die Bindungspartner und Effekte der CpG-Motive gewonnen werden (Übersichtsartikel [89]).

Vollkommen ununtersucht ist die Fähigkeit bakterieller DNA-Sequenzen, in ruhenden, HIV-infizierten T-Zellen die Transkriptionsrate von HIV *in vitro* zu stimulieren. In dieser Arbeit konnten einige Ergebnisse dazu gesammelt werden, trotzdem bleiben viele Fragen offen:

Es konnte gezeigt werden, dass CpG-ODNs spezifisch HIV reaktivieren, unabhängig von der aktivierenden Wirkung des Phosphotioatgerüsts. Gut in den derzeitigen Forschungsstand einfügen lässt sich auch die fehlende CD69-Aktivierung durch CpG-ODNs, trotz gleichzeitiger HIV Expression (s.6.2.2).

Ungewiss bleibt, welche Transkriptionsfaktoren für die Reaktivierung des Virusgenoms durch CpG-ODNs verantwortlich sind.

In den nachfolgenden Punkten soll versucht werden, die gewonnenen Daten in den derzeitigen Forschungsstand einzuordnen, und Modelle für den CpG-Mechanismus zu entwickeln.

6.2.1 CpG-ODNs reaktivieren HIV direkt

Es gibt Hinweise darauf, dass CpG-Sequenzen zu einer Erhöhung der Virusreplikation in chronisch infizierten Zellen führen. So zeigte eine Gruppe kürzlich, dass CpG-ODNs die HIV-Replikation in für HIV transgenetischen Milzzellen von Mäusen stimuliert [115]. Hierbei ist aber unklar, ob es sich um einen direkten oder indirekten Effekt der CpG-Sequenzen handelt.

Das Modell der ACH-2 Zellen erlaubt es dagegen, direkte Effekte der CpG-Sequenzen nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass CpG-ODNs in der latent infizierten Zelllinie zu einer direkten Reaktivierung von HIV führen. Dabei handelt es sich um eine

CpG-spezifische Reaktivierung, bei der das Phosphothioat-Gerüst der ODNs keine Rolle spielt.

Weiterhin ist der durch CpG-ODNs erzielte Effekt konzentrationsabhängig, wie Mitglieder unserer Forschungsgruppe herausfanden. Zudem beobachteten sie einen stimulatorischen Effekt von methylierten CpG-Motiven auf die Reaktivierung von HIV (nicht publizierte Daten). Damit wären bisherige Vermutungen widerlegt, dass bakterielle CpG-Motive das Immunsystem aufgrund der fehlenden Methylierung aktivieren. Vielmehr wird dadurch die These gestärkt, dass CpG-Motive in Vertebraten supprimiert werden.

Mehrere Faktoren lassen auf eine Wirkung von CpG-Sequenzen *in vivo* hoffen:

In HIV-positiven Patienten lässt sich während opportunistischen bakteriellen Infektionen eine Erhöhung der Viruslast im Blut feststellen [116, 117]. Des Weiteren vermutet die Gruppe um Agrawal, welche von einem Anstieg der Viruslast bei der Therapie HIV infizierter Individuen mit HIV-Gag Antisense ODNs berichtet, einen Zusammenhang mit CpG-Motiven innerhalb der verwendeten Sequenzen [118].

6.2.2 Der stimulatorische Effekt von CpG-Motiven ist in T-Zellen nicht stark genug für eine Aktivierung der Zellen

Bei der Reaktivierung von HIV in chronisch-infizierten T-Zellen durch Substanzen wie IL-6, TNF α oder PMA wird meist gleichzeitig auch die Zelle aktiviert (Abb.5.2.2, 5.2.3). Auf den Stimulus von CpG-Motiven reagierten aber weder ACH-2 Zellen noch CD3⁺ PBMCs mit einer CD69-Aktivierung.

Diese Beobachtung entspricht auch der Beobachtung vieler Forschungsgruppen, welche sich mit der Zellaktivierung durch CpG-ODNs beschäftigen:

Demnach aktivieren CpG-Sequenzen hauptsächlich B-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen, da diese TLR9 (Toll-like receptor 9; s. 1.2.6) tragen, mit dem CpG-Motive spezifisch reagieren. T-Zellen dagegen, die kein TLR9 aufweisen, sollen nicht direkt stimuliert werden, sondern erst nach Tagen, im Rahmen der adaptiven Immunantwort auf die Cytokinfreisetzung der B-/DC-Zellen aktiviert werden (Übersichtsartikel [89]).

ACH-2 Zellen und CD3+ PBMCs werden also als T-Zellen nicht von CpG-ODNs aktiviert, während die CD3- PBMCs (B-Zellen) durch CpG-Motive stimuliert werden konnten (Abb.5.2.3).

Wie aber kann die HIV-Replikation durch CpGs in ruhenden Zellen aktiviert werden, obwohl der Bindungspartner TLR9 nicht vorhanden ist und die Zellen selbst nicht aktiviert werden? Und wie lässt sich die beobachtete Aktivierung von NFκB [103], ein Transkriptionsfaktor, der von CpGs durch die Bindung an TLR9 stimuliert wird, erklären?

Entgegen der vorher angeführten Behauptung, T-Zellen würden kein TLR9 exprimieren, wurde entdeckt, dass sie doch, wenn auch sehr schwach, TLR9 aufweisen [119]. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass auch in T-Zellen die CpG-Sequenzen an TLR9 Rezeptoren binden. Da die Anzahl dieser Rezeptoren aber begrenzt ist, kommt es nur zu einer schwachen Erhöhung der Cytokinfreisetzung und zu einer geringfügigen Aktivierung von NFκB. Diese Effekte reichen zwar nicht aus, um die Zelle aus ihrem inaktiven Zustand herauszuführen, aber die HI-Virus Replikation könnte durch diesen geringen Stimulus schon angestoßen werden.

Weiterhin wurde berichtet, dass CpG-Motive kostimulatorische Wirkung haben könnten. So beobachtete eine Gruppe eine CD69-Aktivierung ruhender Zellen nach Behandlung mit CpGs und Interleukinen. Es zeigte sich jedoch, dass dieser Effekt auf den Poly-Guanosin Sequenzen innerhalb der CpG ODNs beruhte und außerdem nur CD8+ Zellen betraf [120].

6.2.3 Die Rolle von NFκB in der Reaktivierung von HIV durch CpG-ODNs

Die Reaktivierung von HIV-1 in chronisch infizierten Zellen durch Cytokine erfolgt vor allem durch den Transkriptionsfaktors NFκB [121]. NFκB liegt in ruhenden T-Zellen im Cytoplasma vor, sequestriert durch den physiologischen Inhibitor IκB (Übersichtsartikel [122]). Nach der Aktivierung durch Mitogene wie PMA, wird NFκB aufgrund der Phosphorylierung und Degradierung von IκB freigesetzt. Daraufhin wandert NFκB in den Nukleus, um dort eine Vielzahl von Promotern zu aktivieren, unter ihnen auch die LTR-Sequenz des HIV-Genoms [123]. Der HIV-LTR weist zwei

Bindungsstellen für NFκB auf. Es gibt Hinweise, dass NFκB in latent infizierten T-Zellen durch die Rekrutierung von Acetylasen das störende Nukleosom (Nuc-1) rupturiert und so die Transkription möglich wird (Abb.6.2.1) [124].

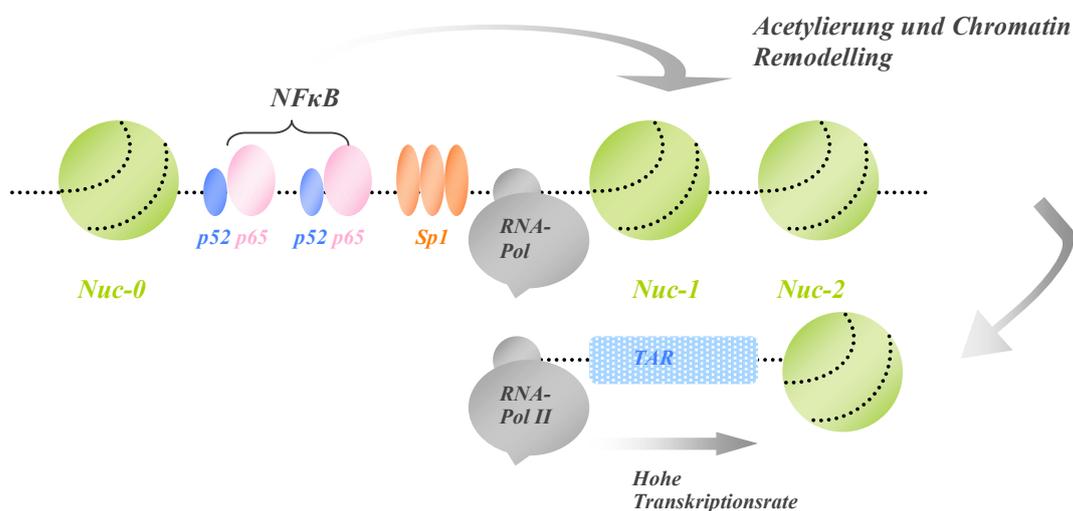


Abb.6.2.1: NFκB hebt die Sperrung der Transkription in ruhenden T-Zellen durch die Aktivierung von Acetylasen auf (mod nach [125]).

Es wurde gezeigt, dass die Reaktivierung von HIV durch CpG-ODNs mit einer erhöhten Aktivität von NFκB einhergeht [103]. Außerdem ist bekannt, dass die Aktivierung von TLR9 in Antigen-Präsentierenden Zellen NFκB aktiviert [86, 87]. In der vorliegenden Arbeit konnten NFκB-Inhibitoren die durch CpG-ODN stimulierte Reaktivierung von HIV nicht hemmen.

Im Gegenteil, der Inhibitor CAPE weist sogar selbst HIV-reaktivierende Potenz auf. Diese Tatsache könnte allerdings auf eine intrinsische Aktivität von CAPE zurückzuführen sein. CAPE hemmt die Translokation des p65 Proteins von NFκB in den Nukleus, nicht aber die Degradierung und Phosphorylierung von IκB. Zudem stört es die Resynthese von IκB in Folge einer Aktivierung durch Mitogene wie PMA [102]. Man könnte also schlussfolgern, dass CAPE innerhalb bestimmter Konzentrationen (hier von 10-30 µg/ml) durch die Hemmung der Resynthese von IκB die Konzentration

an freiem NFkB erhöht, und so positiv auf die Reaktivierung von HIV einwirkt. Bei höheren Konzentrationen schließlich könnte der hemmende Effekt auf die NFkB-Aktivierung einsetzen, und die in dieser Arbeit beobachtete leichte Inhibition der HIV Reaktivierung bei Konzentrationen über 30 µg /ml auslösen. Es muss aber beachtet werden, dass die NFkB-Aktivierung in dieser Arbeit von CpG-ODNs ausgelöst wurde und somit eventuell auch andere, unbekannte Mechanismen für die von CAPE ausgelösten Effekte in Frage kommen könnten.

SN50 dagegen inhibiert das NFkB Protein p50 und hemmt direkt die Degradierung von IκB. So blockiert es die Translokation von p50 in den Nukleus. In der vorliegenden Arbeit zeigt SN50 keinen Einfluss auf die durch CpG-ODNs vermittelte Reaktivierung von HIV in ruhenden T-Zellen, auch wenn die Erhöhung von NFkB gezeigt wurde [103]. Dies könnte verschiedene Ursachen haben:

1) NFkB ist nicht der einzige Transkriptionsfaktor, der für die Reaktivierung von HIV zuständig ist; seine Gegenwart ist nicht essentiell für die Replikation

2) NFkB kann durch Signalwege aktiviert werden, die nicht anfällig für SN50 sind

Tatsächlich wurde im Zusammenhang mit der Reaktivierung von HIV durch andere Substanzen die Beteiligung von weiteren Transkriptionsfaktoren beobachtet: Der Transkriptionsfaktor NFAT verstärkt die HIV-Expression in primären CD4+ T-Zellen [126]. Außerdem soll NFAT neben der NFkB Bindestellen in der U3-LTR Region mit den Untergruppen NFATc1 und NFATc2 eine Bindungsstelle in der Region U5 des HIV-LTRs aufweisen [127].

Aber auch der Transkriptionsfaktor AP-1, welcher über die MAP-Kinase-Kaskade aktiviert wird, kann die durch Cytokine stimulierte HIV Reaktivierung in chronisch infizierten Zellen regulieren [104].

Es wäre also durchaus möglich, dass diese verschiedenen Transkriptionsfaktoren bei der in dieser Arbeit beobachteten Reaktivierung von HIV durch CpG-Motive eine Rolle spielen.

6.2.4 Die Rolle des ERK-MAP-Kinase-Signalweges bei der Reaktivierung von HIV

Die ERK1/2 Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) ist bekannt für ihre Interaktion in Cytokin- und Mitogen-vermittelten Signalwegen [128]. MAK wird dabei durch die Phosphorylierung von Threonin und Thyrosinresten von der MAP-Kinase (MEK) über die Raf/MEK/ERK Kaskade aktiviert. Die so aktivierte ERK-MAP-Kinase ist unter anderem für die Stimulierung einiger Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 oder Elk-1 zuständig [128]. Auch bei der Reaktivierung von HIV in latent infizierten Zellen wurde eine Aktivierung der MAPK beobachtet [104]: nach der Stimulation der HIV-Replikation in U1 Zellen durch Cytokine und Mitogene berichten Yang et al. von einer notwendigen Beteiligung der MAPK, die den Transkriptionsfaktor AP-1 stimuliert: wird die MAPK durch Inhibitoren wie PC98059 gehemmt, sinkt die Expression von HIV.

Folglich könnte man vermuten, dass auch die HIV-Replikation durch CpG-Motive über ähnliche Signalwege gesteuert werden könnte. Jedoch zeigte die Hemmung der ERK-MAPK durch UO126 keinen Effekt auf die HIV-Expression. Entweder wird also die CpG-vermittelte Reaktivierung von HIV gänzlich unabhängig von der MAPK Kaskade geregelt, oder die MAPK ist zwar Bestandteil bei der Aktivierung von HIV, aber nicht unbedingt notwendig.

6.2.5 Modell der Reaktivierung von HIV durch das Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren

Wie aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ersichtlich ist, konnte die Replikation von HIV weder von NFκB-Inhibitoren, noch von Hemmern der MAPK-Kinase entscheidend blockiert werden, obwohl eine Involvierung von NFκB hier sehr wahrscheinlich ist [103]. Hilfreich könnte bei dieser Überlegung das von Yang et al. postulierte Modell einer kooperativen Interaktion zwischen AP-1 und NFκB bei einer durch Cytokine induzierten Reaktivierung von HIV sein [104]: NFκB wird sowohl von MAPK als auch von der IκB Kinase aktiviert, und aktiviert zusammen mit AP-1 die HIV Transkription (Abb.6.2.5). Die alleinige Aktivierung von NFκB aber reicht hier

nicht für eine Reaktivierung von HIV aus [104]. In der vorliegenden Arbeit konnte UO126 die Reaktivierung nicht reduzieren. Auch NFκB-Inhibitoren zeigten keinen reduzierenden Einfluss auf die Reaktivierung der HIV-Replikation. Dies wäre darauf zurückzuführen, dass bei der Blockierung des MAPK-Signalweges, im Gegensatz zu den Beobachtungen von Yang, die Reaktivierung durch NFκB ausreichen würde, während bei Blockierung von NFκB der MAPK-Signalweg die Aktivierung von AP-1 und NFκB übernehmen würde. Es sollte also an Experimente gedacht werden, welche die Inhibitoren beider Signalwege gleichzeitig austesten.

Genauso gut könnte auch eine Mitbeteiligung von NFAT eine Rolle spielen, oder AP-1 könnte in diesem Reaktivierungsmechanismus unwichtig sein. Da über die Vermittlung von CpG-ODNs jedoch ebenfalls Cytokine wie IL-6 und TNFα gebildet werden, erscheint der Vergleich mit diesem Zellmodell durchaus sinnvoll.

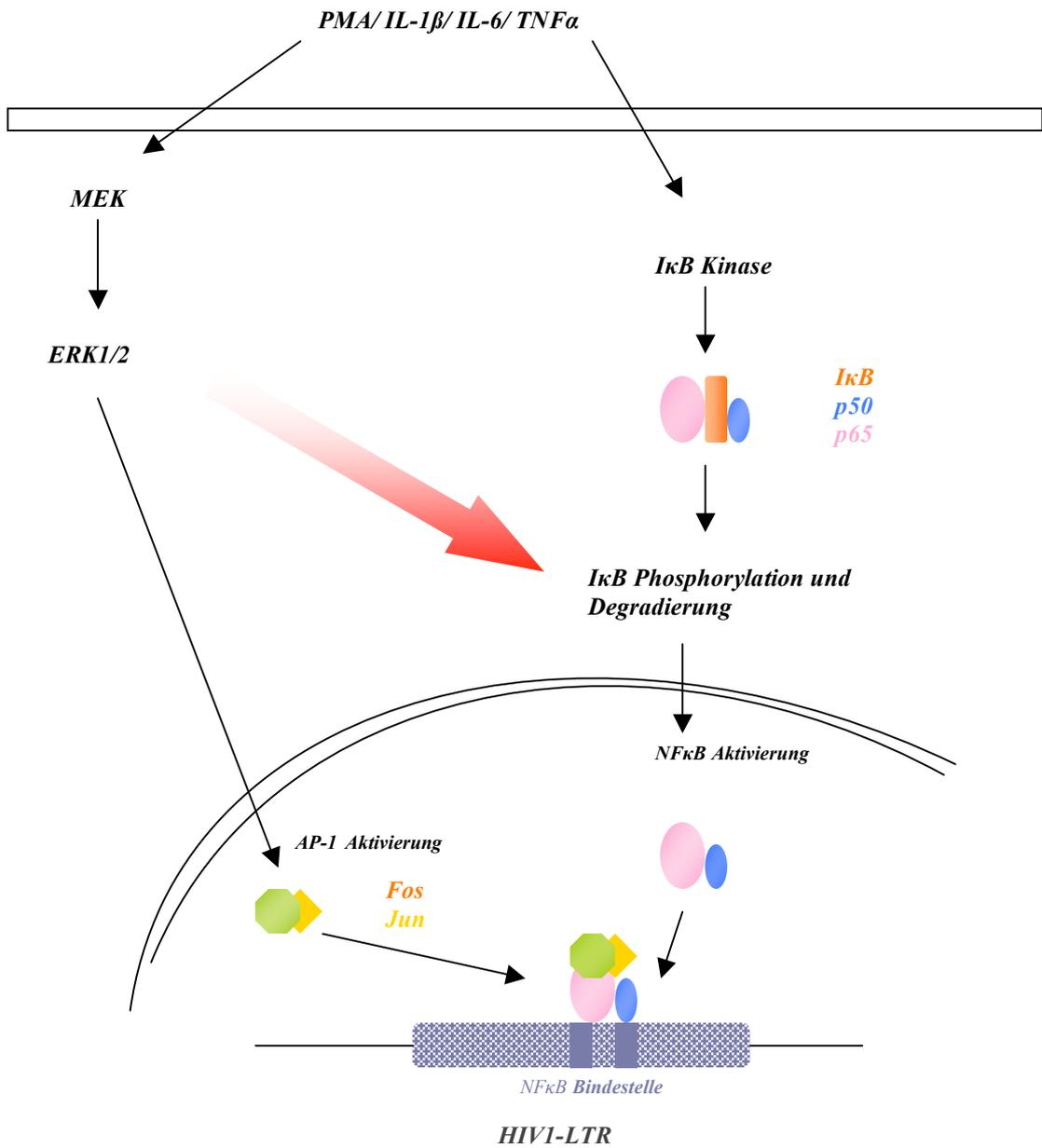


Abb.6.2.2: Die Induktion der HIV-Expression durch das Zusammenspiel von AP-1 und *NFκB* (modifiziert nach [104]).

6.2.6 Die Bedeutung der Reaktivierung von HIV durch CpG-ODNs im Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten

In der vorliegenden Arbeit konnte die Spezifität von CpG-ODNs in Bezug auf die Reaktivierung von HIV in chronisch-infizierten Zellen *in vitro* gezeigt werden. Könnten ähnliche spezifische Effekte *in vivo* bei HIV-positiven Patienten ausgelöst werden, so wäre das ein Schritt mehr in Richtung der vollständigen Eliminierung des Virus aus dem infizierten Organismus. Durch diese Methode könnten die Virusreservoirs in ruhenden T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen reaktiviert werden und wären so einer effizienten Therapie mit HAART zugänglich.

Mehrere Studien bestärken die Wahrscheinlichkeit einer HIV-Reaktivierung durch CpG-ODNs *in vivo*, auch wenn die Effekte nicht nachweislich auf CpG-Motive zurückzuführen sind:

HIV-Patienten, welche mit HIV-Gag-Antisense-ODNs behandelt wurden, zeigten einen unerwarteten Anstieg der Viruslast im Blut [118]. Dies könnte auf einen Effekt der CpG-Motive innerhalb der benutzten Sequenz hindeuten. Zudem wurde in dem Friend-Maus-Modell gezeigt, dass CpG-ODNs als Post-Expositionsprophylaxe nach einer Infektion mit Retroviren vor einer Erkrankung schützt [129]. Interessanterweise war dabei der Zeitpunkt der Behandlung wichtig für den Therapieerfolg: nur die Therapie nach Viruskontakt war erfolgreich, während eine Verabreichung vor der Infektion eine beschleunigt Entwicklung der virusbedingten Erythroleukämie zur Folge hatte [130].

Auch bei der Entwicklung von HIV-Vaccinen wird große Hoffnung in die Wirkung von CpG-Motiven gesetzt. In einem Maus-Modell führte die Immunisation mit einem HIV-1-Immunogen und inkompletten Freund-Adjuvants (HIV-IFA) zusammen mit der CpG-Sequenz HYB2055 zu einer starken, HIV-spezifischen Immunantwort [131]. Experimente mit nicht-humanen Primaten zeigten einen deutlichen Anstieg der HIV-spezifischen CD8-T-Zellantwort nach Behandlung mit dem HIV-Gag Antigen in Kombination mit TLR7, TLR8 und TLR9 Rezeptor-Agonisten [132]. Dabei waren auch CpG-Sequenzen als TLR9-Agonisten beteiligt.

Weitere Experimente sollten also die Fähigkeit von CpG-Motiven, HIV *in vivo* zu reaktivieren, untersuchen.

7. Zusammenfassung

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Wirkung von Antioxidantien auf die Apoptose. Dabei sollte vor allem die Abhängigkeit der Apoptosereaktion von der verwendeten Zelllinie geprüft werden. Zwei verschiedene Zellmodelle kamen zum Einsatz, A3.01 T-Zelllymphoblasten und E6-1 Jurkat-Zellen. Als Antioxidantien wurden das natürlich vorkommende N-Acetylcystein und das synthetische Antioxidans BHA ausgewählt. Die Zellen wurden mit CD95L stimuliert, und mit den entsprechenden Antioxidantien behandelt. Nach der Inkubation wurden sie mit AnnexinV und 7AAD gefärbt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, 7AAD an den Nukleus. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert. Zellen, die nur Annexin V positiv waren, wurden als apoptotisch gezählt, während Zellen die für AnnexinV und 7AAD positiv waren (also einen Membranstörungen aufwiesen) als nekrotisch betrachtet wurden. Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten lässt sich schließen, dass die Apoptose in verschiedenen Zelllinien über unterschiedliche Signalwege vermittelt wird. A3.01 Zellen waren bereits für die Existenz eines nekrose-ähnlichen Zelltodes unter Caspaseinhibition bekannt. BHA konnte diesen nekrose-ähnlichen Zelltod verhindern. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BHA nach Apoptoseinduktion ohne Caspaseinhibitoren eine stärkere Apoptose induziert als ein CD95-Ligand alleine. Dieselbe Reaktion konnte bei peripheren Blutmonozyten (PBMC) beobachtet werden. Bei E6-1Jurkat-Zellen, die nach Inhibition der Caspase keinen nekrotischen Zelltod erleiden, kam es nach der Behandlung mit BHA und CD95 zu einer Abnahme der Apoptose. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die verwendeten Zelllinien unterschiedlichen Zelltypen angehören: A3.01 Zellen und PBMC könnten den Typ 1 Zellen zugeordnet werden, die für die Durchführung der Apoptose auf Caspasen angewiesen sind, E6-1 Zellen könnten Typ 2 Zellen verkörpern, die zusätzlich noch auf mitochondriale Stimulation angewiesen sind, um apoptotisch zu werden. Diese mitochondriale Stimulation könnte durch BHA verhindert werden und so bei E6-1 Jurkat-Zellen Apoptose verhindern. NAC hingegen zeigte in der vorliegenden Arbeit einen anti-apoptotischen Effekt sowohl bei der A3.01 Zelllinie, als auch bei E6-1 Jurkat-Zellen. Hieraus könnte geschlossen werden, dass NAC bereits zu einem früheren Zeitpunkt in den Ablauf der Apoptose eingreift.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Reaktivierung von HIV in der chronisch-infizierten T-Zelllinie ACH-2 durch bakterielle CpG-Sequenzen. Auch hier wurden die Zellen mithilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Die HIV-Replikationsrate wurde quantitativ mit einem p24-Antikörper gemessen. Es wurde gezeigt, dass CpG-Motive in dieser Zelllinie *in vitro* eine Reaktivierung der HIV-Replikation bewirken. Dieser Effekt wurde nicht durch die PTO-Modifikation der CpG-ODN hervorgerufen, sondern war spezifisch für die CpG-Sequenzen. Eine Behandlung mit ODNs ohne CpG-Sequenzen führte nicht zu einer Induktion der HIV-Replikation in ACH-2-Zellen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die verwendeten CpG-Sequenzen die latent-infizierte T-Zelllinie ACH-2 nicht aktivieren, sondern nur die Virusreplikation anstoßen. Versuche mit humanen nicht-infizierten PBMCs zeigten, dass CD3-positive Zellen, ähnlich wie ACH-2-Zellen, durch CpG-ODNs nicht aktiviert werden, CD3-negative PBMCs dagegen konnten durch die Behandlung mit CpG-ODNs aktiviert werden. Die Reaktivierung von HIV konnte durch die Inhibition verschiedener Transkriptionsfaktoren nicht wesentlich beeinflusst werden. Die NFkB-Inhibitoren CAPE und SN50 und der ERK-MAP-Kinase-Inhibitor UO126 verhinderten die durch CpG-ODNs induzierte HIV-Replikation in ACH-2 Zellen nicht. Unter dem Einfluss von CAPE wurde sogar ein geringfügiger Anstieg der Virusreplikation beobachtet. Dieser Effekt ist wahrscheinlich aber durch die intrinsische Aktivität von CAPE erklärbar. Die Frage nach den distalen Faktoren in den aktivierten Signalwegen muss also unbeantwortet bleiben. Könnten die in dieser Arbeit *in vitro* beobachteten spezifischen Effekte der CpG-ODNs *in vivo* bei HIV-positiven Patienten ausgelöst werden, so wäre das ein Schritt mehr in Richtung der vollständigen Eliminierung des Virus aus dem infizierten Organismus. Durch diese Methode könnten die Virusreservoirs in ruhenden T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen reaktiviert werden und wären so einer effizienten Therapie mit HAART zugänglich.

Als nächster Schritt in diesem Bereich der Forschung sollten deswegen Versuche zu der Wirkung von CpG-Sequenzen auf chronisch-infizierte Zellen HIV-positiver Patienten unternommen werden, um die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse *ex vivo* zu untersuchen.

8. Literaturverzeichnis

1. Borgerson, K.L., J.D. Bretz, and J.R. Baker, Jr., *The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease*. *Autoimmunity*, 1999. **30**(4): p. 251-64.
2. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
3. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. *J Immunol*, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
4. Kinloch, R.A., et al., *The pharmacology of apoptosis*. *Trends Pharmacol Sci*, 1999. **20**(1): p. 35-42.
5. McConkey, D.J., *Biochemical determinants of apoptosis and necrosis*. *Toxicol Lett*, 1998. **99**(3): p. 157-68.
6. Leist, M. and M. Jaattela, *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(8): p. 589-98.
7. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, *Caspase-independent cell deaths*. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. **14**(6): p. 727-33.
8. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. *Nature*, 1999. **397**(6718): p. 441-6.
9. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(6): p. 489-95.
10. Vercammen, D., et al., *Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways*. *J Exp Med*, 1998. **188**(5): p. 919-30.
11. Saeki, K., et al., *Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells*. *Cell Death Differ*, 2000. **7**(12): p. 1263-9.
12. Denecker, G., et al., *Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria*. *Cell Death Differ*, 2001. **8**(8): p. 829-40.
13. Jaattela, M. and J. Tschopp, *Caspase-independent cell death in T lymphocytes*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(5): p. 416-23.
14. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(1): p. 19-26.
15. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. *Embo J*, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
16. Salvesen, G.S. and V.M. Dixit, *Caspase activation: the induced-proximity model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(20): p. 10964-7.
17. Arscott, P.L. and J.R. Baker, Jr., *Apoptosis and thyroiditis*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1998. **87**(3): p. 207-17.
18. Ferri, K.F. and G. Kroemer, *Organelle-specific initiation of cell death pathways*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(11): p. E255-63.

19. Strasser, A., et al., *Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis*. *Embo J*, 1995. **14**(24): p. 6136-47.
20. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. *Nature*, 2001. **412**(6842): p. 95-9.
21. Hildeman, D.A., et al., *Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis*. *Immunity*, 1999. **10**(6): p. 735-44.
22. Roberg, K., *Relocalization of cathepsin D and cytochrome c early in apoptosis revealed by immunoelectron microscopy*. *Lab Invest*, 2001. **81**(2): p. 149-58.
23. Foghsgaard, L., et al., *Cathepsin B mediates tumor necrosis factor-induced arachidonic acid release in tumor cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39499-506.
24. Wang, K.K., *Calpain and caspase: can you tell the difference?* *Trends Neurosci*, 2000. **23**(1): p. 20-6.
25. Green, D.R. and D.W. Scott, *Activation-induced apoptosis in lymphocytes*. *Curr Opin Immunol*, 1994. **6**(3): p. 476-87.
26. Brunner, T., et al., *Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas*. *Nature*, 1995. **373**(6513): p. 441-4.
27. Dhein, J., et al., *Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95)*. *Nature*, 1995. **373**(6513): p. 438-41.
28. Hildeman, D.A., et al., *Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim*. *Immunity*, 2002. **16**(6): p. 759-67.
29. Bauer, M.K., et al., *Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(14): p. 8048-55.
30. Delneste, Y., et al., *Thiols prevent Fas (CD95)-mediated T cell apoptosis by down-regulating membrane Fas expression*. *Eur J Immunol*, 1996. **26**(12): p. 2981-8.
31. Hockenbery, D.M., et al., *Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis*. *Cell*, 1993. **75**(2): p. 241-51.
32. Schulze-Osthoff, K., M. Los, and P.A. Baeuerle, *Redox signalling by transcription factors NF-kappa B and AP-1 in lymphocytes*. *Biochem Pharmacol*, 1995. **50**(6): p. 735-41.
33. Takahashi, T., et al., *Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity*. *Int Immunol*, 1994. **6**(10): p. 1567-74.
34. Control, C.f.D., *Pneumocystis pneumoniae-Los Angeles*. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 1981. **30**: p. 250-252.
35. Varmus, H., *Retroviruses*. *Science*, 1988. **240**(4858): p. 1427-35.
36. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. *Science*, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
37. Alizon, M., et al., *Molecular cloning of lymphadenopathy-associated virus*. *Nature*, 1984. **312**(5996): p. 757-60.
38. D'Souza, M.P. and V.A. Harden, *Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research*. *Nat Med*, 1996. **2**(12): p. 1293-300.
39. Gulick, R.M., et al., *Indinavir, nevirapine, stavudine, and lamivudine for human immunodeficiency virus-infected, amprenavir-experienced subjects: AIDS Clinical Trials Group protocol 373*. *J Infect Dis*, 2001. **183**(5): p. 715-21.

40. Calleja, J.M., et al., *Status of the HIV/AIDS epidemic and methods to monitor it in the Latin America and Caribbean region*. *Aids*, 2002. **16 Suppl 3**: p. S3-12.
41. Carael, M. and K.K. Holmes, *Dynamics of HIV epidemics in sub-Saharan Africa: introduction*. *Aids*, 2001. **15 Suppl 4**: p. S1-4.
42. Ghys, P.D., et al., *The epidemics of injecting drug use and HIV in Asia*. *Aids*, 2001. **15 Suppl 5**: p. S91-9.
43. Jemmott, J.B., 3rd, L.S. Jemmott, and G.T. Fong, *Abstinence and safer sex HIV risk-reduction interventions for African American adolescents: a randomized controlled trial*. *Jama*, 1998. **279**(19): p. 1529-36.
44. Wei, X., et al., *Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection*. *Nature*, 1995. **373**(6510): p. 117-22.
45. Kestler, H.W., 3rd, et al., *Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS*. *Cell*, 1991. **65**(4): p. 651-62.
46. Bomsel, M., *Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier*. *Nat Med*, 1997. **3**(1): p. 42-7.
47. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. *Nature*, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
48. Alkhatib, G., et al., *CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1*. *Science*, 1996. **272**(5270): p. 1955-8.
49. Berger, E.A., et al., *A new classification for HIV-1*. *Nature*, 1998. **391**(6664): p. 240.
50. Schuitemaker, H., et al., *Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytoprotropic to T-cell-tropic virus population*. *J Virol*, 1992. **66**(3): p. 1354-60.
51. Dean, M., et al., *Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study*. *Science*, 1996. **273**(5283): p. 1856-62.
52. Wagner, L., et al., *Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans*. *Nature*, 1998. **391**(6670): p. 908-11.
53. Finzi, D., et al., *Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy*. *Science*, 1997. **278**(5341): p. 1295-300.
54. Wei, P., et al., *A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA*. *Cell*, 1998. **92**(4): p. 451-62.
55. Schnittman, S.M., et al., *The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4*. *Science*, 1989. **245**(4915): p. 305-8.
56. Zack, J.A., et al., *HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure*. *Cell*, 1990. **61**(2): p. 213-22.
57. Spina, C.A., et al., *The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes*. *J Exp Med*, 1994. **179**(1): p. 115-23.
58. Swingler, S., et al., *HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection*. *Nature*, 2003. **424**(6945): p. 213-9.

59. Bagasra, O., et al., *Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by in situ polymerase chain reaction*. N Engl J Med, 1992. **326**(21): p. 1385-91.
60. LaBonte, J.A., et al., *Importance of membrane fusion mediated by human immunodeficiency virus envelope glycoproteins for lysis of primary CD4-positive T cells*. J Virol, 2000. **74**(22): p. 10690-8.
61. Fermin, C.D. and R.F. Garry, *Membrane alterations linked to early interactions of HIV with the cell surface*. Virology, 1992. **191**(2): p. 941-6.
62. Somasundaran, M., et al., *Evidence for a cytopathogenicity determinant in HIV-1 Vpr*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(14): p. 9503-8.
63. Weinhold, K.J., et al., *Cellular anti-GP120 cytolytic reactivities in HIV-1 seropositive individuals*. Lancet, 1988. **1**(8591): p. 902-5.
64. Lifson, J.D., et al., *Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein*. Nature, 1986. **323**(6090): p. 725-8.
65. Geleziunas, R., et al., *HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell*. Nature, 2001. **410**(6830): p. 834-8.
66. Clerici, M., et al., *Exposure to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 indicated by HIV-specific T helper cell responses before detection of infection by polymerase chain reaction and serum antibodies [corrected]*. J Infect Dis, 1991. **164**(1): p. 178-82.
67. Moore, J.P., et al., *Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120*. J Virol, 1995. **69**(1): p. 101-9.
68. Reitter, J.N., R.E. Means, and R.C. Desrosiers, *A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS*. Nat Med, 1998. **4**(6): p. 679-84.
69. Mascola, J.R., et al., *Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 207-10.
70. Walker, C.M., et al., *CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication*. Science, 1986. **234**(4783): p. 1563-6.
71. Koenig, S., et al., *Group-specific, major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic responses to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope proteins by cloned peripheral blood T cells from an HIV-1-infected individual*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(22): p. 8638-42.
72. Kaslow, R.A., et al., *Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection*. Nat Med, 1996. **2**(4): p. 405-11.
73. Lalezari, J.P., et al., *Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America*. N Engl J Med, 2003. **348**(22): p. 2175-85.
74. Boyer, J.D., et al., *Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines*. J Infect Dis, 2000. **181**(2): p. 476-83.
75. Cao, H., et al., *Immunogenicity of a recombinant human immunodeficiency virus (HIV)-canarypox vaccine in HIV-seronegative Ugandan volunteers: results of*

- the HIV Network for Prevention Trials 007 Vaccine Study*. J Infect Dis, 2003. **187**(6): p. 887-95.
76. Kulkosky, J., et al., *Intensification and stimulation therapy for human immunodeficiency virus type 1 reservoirs in infected persons receiving virally suppressive highly active antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2002. **186**(10): p. 1403-11.
 77. Coley, W.B., *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893*. Clin Orthop, 1991(262): p. 3-11.
 78. Tokunaga, T., S. Yamamoto, and K. Namba, *A synthetic single-stranded DNA, poly(dG,dC), induces interferon-alpha/beta and -gamma, augments natural killer activity, and suppresses tumor growth*. Jpn J Cancer Res, 1988. **79**(6): p. 682-6.
 79. Krieg, A.M., et al., *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. Nature, 1995. **374**(6522): p. 546-9.
 80. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. Nature, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
 81. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
 82. Ahmad-Nejad, P., et al., *Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments*. Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 1958-68.
 83. Krieg, A.M., *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 709-60.
 84. Kline, J.N., et al., *Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma*. J Immunol, 1998. **160**(6): p. 2555-9.
 85. Lipford, G.B., et al., *CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants*. Eur J Immunol, 1997. **27**(9): p. 2340-4.
 86. Yi, A.K., et al., *Lipopolysaccharide and CpG DNA synergize for tumor necrosis factor-alpha production through activation of NF-kappaB*. Int Immunol, 2001. **13**(11): p. 1391-404.
 87. Yi, A.K., et al., *CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NFkappaB and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine-sensitive pathway*. Int Immunol, 1999. **11**(12): p. 2015-24.
 88. Griffin, G.E., et al., *Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 70-3.
 89. Krieg, A.M., *CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?* Nat Med, 2003. **9**(7): p. 831-5.
 90. Scheller, C., et al., *Caspase inhibitors induce a switch from apoptotic to proinflammatory signaling in CD95-stimulated T lymphocytes*. Eur J Immunol, 2002. **32**(9): p. 2471-80.
 91. Verhoven, B., R.A. Schlegel, and P. Williamson, *Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1597-601.

92. Bevers, E.M., et al., *Exposure of endogenous phosphatidylserine at the outer surface of stimulated platelets is reversed by restoration of aminophospholipid translocase activity*. *Biochemistry*, 1989. **28**(6): p. 2382-7.
93. Salgo, M.G. and W.A. Pryor, *Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **333**(2): p. 482-8.
94. Yu, R., S. Mandlekar, and A.T. Kong, *Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c*. *Mol Pharmacol*, 2000. **58**(2): p. 431-7.
95. Biswas, P., et al., *Interferon gamma induces the expression of human immunodeficiency virus in persistently infected promonocytic cells (U1) and redirects the production of virions to intracytoplasmic vacuoles in phorbol myristate acetate-differentiated U1 cells*. *J Exp Med*, 1992. **176**(3): p. 739-50.
96. Folks, T.M., et al., *Characterization of a promonocyte clone chronically infected with HIV and inducible by 13-phorbol-12-myristate acetate*. *J Immunol*, 1988. **140**(4): p. 1117-22.
97. Korin, Y.D., et al., *Effects of prostratin on T-cell activation and human immunodeficiency virus latency*. *J Virol*, 2002. **76**(16): p. 8118-23.
98. Sheridan, P.L., et al., *Histone acetyltransferases regulate HIV-1 enhancer activity in vitro*. *Genes Dev*, 1997. **11**(24): p. 3327-40.
99. Kutsch, O., et al., *CD154-CD40-induced reactivation of latent HIV-1 infection*. *Virology*, 2003. **314**(1): p. 261-70.
100. Wahl, S.M. and J.M. Orenstein, *Immune stimulation and HIV-1 viral replication*. *J Leukoc Biol*, 1997. **62**(1): p. 67-71.
101. Blanchard, A., L. Montagnier, and M.L. Gougeon, *Influence of microbial infections on the progression of HIV disease*. *Trends Microbiol*, 1997. **5**(8): p. 326-31.
102. Natarajan, K., et al., *Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(17): p. 9090-5.
103. Scheller, C., et al., *CpG-oligodeoxynucleotides activate HIV replication in latently infected human T cells*. unpublished, 2004. (-): p. -.
104. Yang, X., Y. Chen, and D. Gabuzda, *ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF-kappaB*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(39): p. 27981-8.
105. DeSilva, D.R., et al., *Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy*. *J Immunol*, 1998. **160**(9): p. 4175-81.
106. Scheller, C., et al., *Caspase inhibition in apoptotic T cells triggers necrotic cell death depending on the cell type and the proapoptotic stimulus*. *J Cell Biochem*, 2006. **97**(6): p. 1350-61.
107. Kahl, R., *Synthetic antioxidants: biochemical actions and interference with radiation, toxic compounds, chemical mutagens and chemical carcinogens*. *Toxicology*, 1984. **33**(3-4): p. 185-228.
108. Benson, A.M., M.J. Hunkeler, and P. Talalay, *Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(9): p. 5216-20.

109. Cummings, S.W. and R.A. Prough, *Butylated hydroxyanisole-stimulated NADPH oxidase activity in rat liver microsomal fractions*. J Biol Chem, 1983. **258**(20): p. 12315-9.
110. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. Embo J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.
111. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
112. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
113. Opferman, J.T. and S.J. Korsmeyer, *Apoptosis in the development and maintenance of the immune system*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 410-5.
114. Bratton, D.L., et al., *Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase*. J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26159-65.
115. Equils, O., et al., *Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR9 signaling results in HIV-long terminal repeat trans-activation and HIV replication in HIV-1 transgenic mouse spleen cells: implications of simultaneous activation of TLRs on HIV replication*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5159-64.
116. Sulkowski, M.S., et al., *The effect of acute infectious illnesses on plasma human immunodeficiency virus (HIV) type 1 load and the expression of serologic markers of immune activation among HIV-infected adults*. J Infect Dis, 1998. **178**(6): p. 1642-8.
117. Rotchford, K., A.W. Strum, and D. Wilkinson, *Effect of coinfection with STDs and of STD treatment on HIV shedding in genital-tract secretions: systematic review and data synthesis*. Sex Transm Dis, 2000. **27**(5): p. 243-8.
118. Agrawal, S. and R.R. Martin, *Was induction of HIV-1 through TLR9? J Immunol*, 2003. **171**(4): p. 1621; author reply 1621-2.
119. Hornung, V., et al., *Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4531-7.
120. Lipford, G.B., et al., *Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines*. Immunology, 2000. **101**(1): p. 46-52.
121. Nabel, G. and D. Baltimore, *An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells*. Nature, 1987. **326**(6114): p. 711-3.
122. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 141-79.
123. Perkins, N.D., et al., *A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation*. Embo J, 1993. **12**(9): p. 3551-8.
124. Van Lint, C., et al., *Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation*. Embo J, 1996. **15**(5): p. 1112-20.
125. Karn, J., *Tackling Tat*. J Mol Biol, 1999. **293**(2): p. 235-54.
126. Cron, R.Q., et al., *NFAT1 enhances HIV-1 gene expression in primary human CD4 T cells*. Clin Immunol, 2000. **94**(3): p. 179-91.

127. Romanchikova, N., et al., *NFAT transcription factors control HIV-1 expression through a binding site downstream of TAR region*. Immunobiology, 2003. **208**(4): p. 361-5.
128. Davis, R.J., *The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 14553-6.
129. Olbrich, A.R., et al., *Effective postexposure treatment of retrovirus-induced disease with immunostimulatory DNA containing CpG motifs*. J Virol, 2002. **76**(22): p. 11397-404.
130. Olbrich, A.R., S. Schimmer, and U. Dittmer, *Preinfection treatment of resistant mice with CpG oligodeoxynucleotides renders them susceptible to friend retrovirus-induced leukemia*. J Virol, 2003. **77**(19): p. 10658-62.
131. Trabattoni, D., et al., *Immunization with gp120-depleted whole killed HIV immunogen and a second-generation CpG DNA elicits strong HIV-specific responses in mice*. Vaccine, 2006. **24**(9): p. 1470-7.
132. Wille-Reece, U., et al., *Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1249-58.

Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Carsten Scheller für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Erstgutachtens dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei Herrn PD C. Scheller für die vorzügliche Betreuung der Arbeit, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die ständige Hilfsbereitschaft bei thematischen Fragen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Klein danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. A. Rethwilm für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. Eleni Koutsilieri für die Unterstützung im Labor und für angeregte Diskussionen zu wissenschaftlichen Fragestellungen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Sieghardt Sopper danke ich für die Unterstützung im Umgang mit dem FACS-Gerät.

Vielen Dank an Ingeborg Euler-König für technische Unterstützung, die Einweisung in die Arbeit mit Zellkulturen und die Gestaltung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Für die gute Zusammenarbeit im Labor und die angenehme Arbeitsatmosphäre danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Scheller, besonders Ingeborg Euler-König, Barbara Hefele und Johannes Prottengeier.

Ich danke meinen Eltern herzlich für die stete Unterstützung meiner beruflichen Laufbahn. Ihr Vorbild hat meine Arbeitseinstellung maßgeblich geprägt und hat mir sehr dabei geholfen, meine akademischen Ziele zu erreichen.

- 1990-1999 Besuch des Katharinengymnasiums in Ingolstadt, Bayern
- 1986-1990 Besuch der Grundschule Hitzhofen

FAMULATUREN UND PJ

- Juli, August 2000 Interdisciplinary Care Unit, Klinikum Ingolstadt
- Juli 2002 Methodenpraktikum am Institut für klinische Biochemie
Uni Würzburg
- September 2002 Neurologische Praxis, Dr. Zdenka Badal, Ingolstadt
- April 2003 – März 2004 Virologisches Institut, Uni Würzburg
- März, April 2004 Allgemeinchirurgie, KKH Kösching, Prof. Dr. Wischhöfer
- August, 2004 Kinderheilkunde, Karlsuniversität Prag, CZ
- April 2005 – August 2005 PJ Wahlterial Neurologie, Uni Würzburg, Prof. Dr. Toyka
- August 2005 – November 2005 PJ Chirurgie, ZOM, Uni Würzburg,
- Januar 2006 – März 2006 PJ Innere Medizin, University of Rochester, NY, USA
- April 2006 Praktikum Neurochirurgie Klinikum Ingolstadt

PUBLIKATIONEN UND DISSERTATION

Meine Dissertation mit dem Titel „Die Wirkung von Antioxidantien auf die Apoptose und die Reaktivierung von HIV in chronisch infizierten Zellen durch bakterielle CpG-ODN Sequenzen“ wurde am Institut für Virologie der Uni Würzburg unter Betreuung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Carsten Scheller angefertigt.

Scheller C, **Knöferle J**, Ulbrich A, Prottengeier J, Racek T, Sopper S, Jassoy J, Rethwilm A, Koutsilieri E: **Caspase inhibition in apoptotic T cells triggers necrotic cell death depending on the cell type and the proapoptotic stimulus.** J Cell Biochem. 2006 April 19; PMID: 16365881

Scheller C, Ullrich A, McPherson K, Hefele B, **Knöferle J**, Lamla S, Olbrich A, Stocker H, Arasteh K, ter Meulen V, Rethwilm A, Koutsilieri E, Dittmer U: **CpG oligodeoxynucleotides activate HIV replication in latently infected human T cells.** J. Biol. Chem., Vol. 279, Issue 21, 21897-21902, May 21, 2004

SPRACHEN

Deutsch (Muttersprache), Englisch (fließend), Tschechisch (gut), Französisch, Italienisch, Spanisch (Grundkenntnisse)

Göttingen, den 02.01.2007

Johanna M. Knöferle