
HIV-1 Persistenz
in humanen neuronalen Progenitorpopulationen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ina Rothenaigner
München im Mai 2008

Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Institut für Virologie

1. Gutachter: Prof. Dr. Ruth Brack-Werner

2. Gutachter: Prof. Dr. Benedikt Grothe

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2008

*In Erinnerung an meinen Vater
Für meine Mutter und Michi*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Das HI-Virus	4
Das HIV-1 Genom und seine Proteine	4
Replikationszyklus von HIV-1	5
Infektionsverlauf und Therapie	7
1.2 Virale latente Reservoir - HIV Persistenz	7
1.3 Die HIV-Infektion des Zentralen Nervensystems	10
Neuropathogenese von HIV	11
Viruseintritt in das ZNS	12
Zelltypen und Virusreplikation im ZNS	13
Die HIV-Infektion von Astrozyten	15
1.4 Neurale Vorläuferzellen im ZNS	16
Humane neurale Progenitorzelllinien und die Zelllinie HNSC.100	20
Induktion der Astrogenese mittels des Zytokins CNTF	22
1.5 Zelluläre neurale Marker	23
1.6 HIV-Infektion von humanen neuronalen Progenitorzellen	26
1.7 Zielsetzung	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	27
2.1.2 Puffer und Lösungen	29
2.1.3 Verwendete Kits	30
2.1.4 Medien	30
2.1.5 Antikörper (AK)	32
2.1.6 Oligonukleotid-Primer	33
2.1.7 Plasmide	35
2.1.8 Zelllinien	38
2.1.9 Bakterien	39
2.1.10 Software und Geräte	39
2.2 Methoden	40
2.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien	40
2.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen	41
2.2.3 Etablierung der Zellpopulation HNSC.pGfa2-EGFP	41
2.2.4 Etablierung der Zellpopulationen HNSC.FV.Gfa2-EGFP und HNSC.FV.U3-EGFP mittels foamyviraler Transduktion	42
2.2.5 HIV-Infektion der HNSC.100-Zellen und p24-ELISA	43
2.2.6 Verwendte Fluoreszenzfarbstoffe und fluoreszierenden Proteine	44
2.2.7 Mikroskopie	44
2.2.8 Immunzytochemie	44
2.2.9 Analyse der Zellmorphologie	45

2.2.10 Bestimmung der NF- κ B Aktivierung mittels Lokalisationsveränderung von NF- κ B	46
2.2.11 Quantifizierung der Lokalisation von fluoreszierenden Proteinen in der Zelle: Rev-Lokalisation	47
2.2.12 FACS-Analysen	48
2.2.13 Rev-Aktivitätsanalysen	50
2.2.14 CFSE-Proliferationsassay	52
2.2.15 Isolierung von Plasmid-DNA	53
2.2.16 Klonierungsmethoden	54
2.2.17 Klonierung von pGfa2-EGFP	56
2.2.18 Klonierung von pFVGfa2-EGFP	56
2.2.19 Präparation genomischer DNA	57
2.2.20 RNA-Methoden	57
2.2.21 PCR-Analysen	58
2.2.22 Proteinanalytik	60
2.2.23 Statistische Auswertung	62
3 Ergebnisse	63
3.1 Charakterisierung der Zelllinie HNSC.100	63
3.1.1 Analyse der Markerexpression	63
3.1.2 Analyse der Zellmorphologie	70
3.1.3 Analyse des Proliferationsverhaltens	72
3.2 Differenzierungsabhängige Expression eines Reportergens	74
3.3 Rev-Lokalisation und -Aktivität	78
3.3.1 Rev-Lokalisation	78
3.3.2 Rev-Aktivität	80
3.3.3 Analyse der Expression von zellulären Rev-interagierenden Faktoren	81
3.4 Neuronale Differenzierung der Zelllinie HNSC.100	82
3.5 Analyse der Expression möglicher HIV-Rezeptoren	84
3.6 Kurzzeit-Infektion der HNSC.100-Progenitorzellen und -Astrozyten	87
3.7 Langzeit-Infektion der HNSC.100-Progenitorpopulation	90
3.7 Einfluss der Astrogenese auf die HIV-Infektion	91
3.8 Einfluss der Zytokine CNTF und TNF-α auf die HIV-Infektion	93
3.9 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB	95
3.10 Analyse der Expression viraler Transkripte	97
3.11 Charakterisierung der infizierten Progenitorpopulation	99
3.11.1 Analyse der Markerexpression	99
3.11.2 Analyse der Zellmorphologie	103
3.11.3 Analyse des Proliferationsverhaltens	105
3.11.4 Neuronendifferenzierung	107

4 Diskussion	109
4.1 Die Erforschung der Neurobiologie von HIV bleibt weiterhin notwendig	109
4.2 Untersuchung der HIV-Infektion von neuronalen Progenitorzellen mittels einer Zelllinie	110
4.3 Gezielte Differenzierung der HNSC.100-Zellen in Astrozyten	112
4.4 Die Etablierung einer differenzierungsabhängigen Reporterpopulation mittels foamyviraler Vektoren	114
4.5 HIV-Persistenz in der neuronalen Progenitorpopulation	116
4.6 Reaktivierung der Virusproduktion von latent infizierten Progenitorzellen	118
4.7 Vergleich der HIV-Infektion von neuronalen Progenitorzellen und Astrozyten	122
4.7.1 Chemokinexpression	122
4.7.2 Infektionsrate	123
4.7.3 Verlauf der Virusproduktion und Virusreaktivierung	124
4.7.4 Biologische Eigenschaften des HIV-Proteins Rev	125
4.8 Zelluläre Veränderungen der HIV-infizierten Progenitorpopulation	126
4.9 Hat die HIV Infektion einen Einfluss auf die Migration der Progenitorzellen?	131
4.10 Auswirkungen der beeinträchtigten Neurogenese	133
4.11 Auswirkungen auf die Entwicklung des Gehirns bei HIV-infizierten Kindern	135
5 Zusammenfassung	136
6 Literaturverzeichnis	137
7 Abkürzungsverzeichnis	155
Lebenslauf	157
Veröffentlichungen	158
Danksagung	159

1 Einleitung

1.1 Das HI-Virus

Im Jahr 1981 wurde bei einer Gruppe homosexueller Männer mit schweren opportunistischen Infektionen erstmals Symptome der erworbenen Immunschwäche AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) beschrieben (Gottlieb et al., 1981). Erst zwei Jahre später konnten das dafür verantwortliche Retrovirus unabhängig von zwei Arbeitsgruppen identifiziert werden: von Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris als LAV (Lymphadenopathie-assoziiertes Virus) (Barre-Sinoussi et al., 1983) und von Robert Gallo am National Cancer Institute in Bethesda als HTLV-III (humanes T-Zell-Leukämie-Virus III) (Gallo et al., 1983). 1986 wurde für das Retrovirus die einheitliche Bezeichnung HIV (*human immunodeficiency virus*) eingeführt.

Die HIV-Epidemie hat sich weltweit ausgebreitet und sich insbesondere in Ländern der Dritten Welt zu einer Pandemie entwickelt (Hayes and Weiss, 2006). Ende 2007 waren weltweit etwa 33,2 Millionen Menschen mit HIV infiziert, davon leben rund 68% in Afrika. Die Zahl der Neuinfektionen wurde für 2007 auf 2,5 Millionen geschätzt, täglich werden also 6.800 Menschen mit dem Virus infiziert. Letztes Jahr starben allein 2,1 Millionen Menschen an AIDS, 290.000 davon waren Kinder (<http://www.unaids.org>).

Das HIV-1 Genom und seine Proteine

HIV-1 ist ein exogenes Retrovirus, das zum Genus der Lentiviren gehört. Infektionen mit Lentiviren verlaufen charakteristischerweise chronisch, zeigen eine lange klinische Latenzphase, eine persistierende Virämie sowie eine Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS). Wie alle Retroviren besitzt das HI-Virus die Fähigkeit, mit Hilfe der viruseigenen, RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, eine doppelsträngige DNA-Kopie ihres einzelsträngigen RNA-Genoms (9.200 bp) in das Genom der Wirtszelle zu integrieren (Provirus) und so bei der Zellteilung an Tochterzellen weiterzugeben.

Das Genom des HI-Virus ist deutlich komplexer als das anderer Retroviren (Abb. 1.1). Neben den für infektiöse Retroviren üblichen drei Sequenzbereichen für Gag- (gruppenspezifische Antigene), Pol- (enzymatische Aktivitäten) und Env- (Glykoproteine) Vorläuferproteine, kodiert das Virus sechs zusätzliche Gene: die regulatorischen Gene *tat* und *rev*, und die akzessorischen Gene *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu*

(Frankel and Young, 1998; Freed, 2001; Seelamgari et al., 2004). Die Gene *gag* und *env* kodieren das Nukleokapsid und die Glykoproteine der Virushülle, das *pol*-Gen kodiert für die Reverse Transkriptase und weitere Enzyme. Die kodierenden Regionen werden am 5'-und 3'-Ende des Genoms von regulatorisch wichtigen Kontrollsequenzen flankiert, die für die reverse Transkription sowie die Integration der viralen Erbinformation essenziell sind. Das integrierte provirale Genom besitzt an den Enden identische Sequenzfolgen, die man als long terminal repeats (LTR) bezeichnet. Sie enthalten Promotor- und Enhancer-Elemente, welche die retrovirale Genexpression kontrollieren.

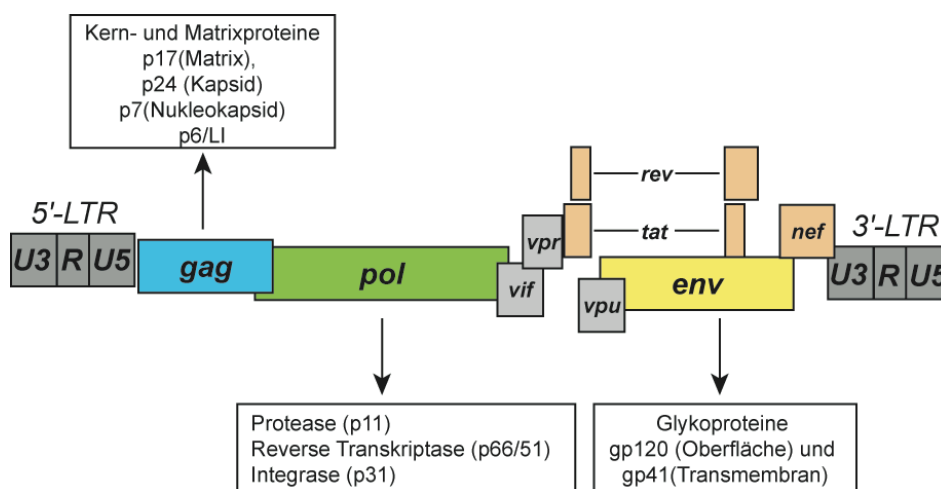


Abb. 1.1 Genomstruktur von HIV-1. An den Enden des integrierten proviralen Genoms befinden sich die 5'- und 3'-LTRs. Die Größen der Genabschnitte wurden schematisch dargestellt und nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. In den Kästen wurden die kodierten Proteine angegeben. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden.

Replikationszyklus von HIV-1

Die Infektion von Zielzellen erfolgt über einen rezeptor-vermittelten Mechanismus, bei dem die Glykoproteine der Virushülle mit den Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren. Das HI-Virus benötigt Wirtszellen, die den CD4-Rezeptor auf der Oberfläche tragen (wie z.B. T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen). Neben dem CD4-Rezeptor fungieren Chemokinrezeptoren als Korezeptoren für den Eintritt in die Zelle (makrophagentrophe HIV-1-Stämme benötigen den Chemokinrezeptor CCR5 als Korezeptor, T-Zell-trophe Stämme den Rezeptor CXCR4) (Berger et al., 1999; Doms, 2001; Moore et al., 2004; Zaitseva et al., 2003). Anschließend fusioniert die Virushülle mit der Plasmamembran, so dass

das Viruskapsid in das Zellinnere gelangt. Im Zytoplasma der Wirtszelle schreibt die reverse Transkriptase von HIV-1 das einzelsträngige RNA-Genom in eine doppelsträngige DNA-Kopie um. Das DNA-Molekül wird - verbunden mit viralen Proteinkomponenten (Vpr, p17, Integrase) - als Präintegrationskomplex aktiv in den Zellkern transportiert. So kann HIV-1 auch ruhende Zellen infizieren. Im Zellkern werden eine oder wenige HIV-1-DNA-Kopien in das Genom der Wirtszelle integriert, oftmals in aktiv transkribierte Gene (Schroder et al., 2002). Dieser Vorgang wird von der viralen Integrase vermittelt und verändert das Zellgenom, so dass zelluläre Gene zerstört oder deren Transkription aktiviert werden kann. Die Integration ist Voraussetzung für die Vermehrung des Virus. Zelluläre Transkriptionsfaktoren wie NF-kappaB (NF- κ B, *nuclear factor-kappaB*) binden an cis-aktive Sequenzen der HIV-LTR und initiieren somit die Transkription viraler mRNAs durch die zelluläre RNA-Polymerase II. In der frühen Infektionsphase entstehen überwiegend mehrfach gespleißte RNA Transkripte, welche für die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef kodieren. Nach der Translation im Zytoplasma werden Tat und Rev in den Zellkern transportiert (Nekhai and Jeang, 2006). Tat bindet an das TAR Element (*trans-activation response*) in der LTR und steigert so die Transkriptionsrate um ein Vielfaches. Rev bewirkt die Umschaltung von der frühen zur späten Zyklusphase. Es bindet an das RRE (*rev response element*), einer RNA-Sekundärstruktur in allen intronhaltigen HIV-Transkripten, und fördert u.a. den Transport der einfach und nicht gespleißten Transkripte in das Zytoplasma, wo sie translatiert oder als RNA-Genom in die Viruspartikel verpackt werden (Balvay et al., 2007; Kjems and Askjaer, 2000). Die Synthese fast aller Virusproteine erfolgt an freien Ribosomen im Zytoplasma, nur die Synthese der Env- und Vpu-Proteine verläuft an der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Nach der Translation der strukturellen und enzymatischen viralen Proteine erfolgen posttranslationale Modifizierungen der Vorläuferproteine (Phosphorylierungen, Myristylierungen und Glykosylierungen). Anschließend lagern sich an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle die viralen Proteinkomponenten (virale Strukturproteine und akzessorische Polypeptide) mit dem Virusgenom zusammen. Es kommt zur Knospung unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche. Nach der Freisetzung erfolgt die Reifung zu infektiösen Viren über die Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease und durch strukturelle Umlagerungen (zusammengefasst in (Freed, 2001; Simon et al., 2006)).

Infektionsverlauf und Therapie

Das HI-Virus wird durch die Samen- und Vaginalflüssigkeit bei sexuellen Kontakten oder durch kontaminiertes Blut übertragen. Außerdem kann das Virus durch die HIV-infizierte Mutter auf ihr Kind übertragen werden (vertikale Übertragung) – dies kann sowohl pränatal während der Schwangerschaft, bei der Geburt oder auch beim Stillen erfolgen (Modrow et al., 2003). Das Virus gelangt bei der Infektion entweder direkt oder über Verletzungen der Schleimhautbereiche ins Blut. In den Lymphknoten findet der HIV-Erreger die wichtigsten Zielzellen für seine Vermehrung: dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten. Mit Hilfe monozytärer Zellen, die aus den Lymphknoten auswandern, gelangt das Virus von dort aus in andere Kompartimente des Körpers, wie beispielsweise das Gehirn.

CD4-positive T-Zellen stellen die wichtigsten Zielzellen für das Virus dar, etwa 99% der viralen Replikation findet in aktivierten und produktiv infizierten CD4-positiven T-Zellen statt (Simon et al., 2006). Durch eine fortschreitende Schädigung der Populationen der CD4-T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen und den damit verbundenen Ausfall immunologischer Funktionen kommt es nach einer unterschiedlich langen, meist mehrjährigen Inkubationszeit zu AIDS. Die unheilbare Immunschwächekrankheit, ausgelöst durch die Suppression des Immunsystems durch das HI-Virus, führt - ohne antiretrovirale Medikamente - meist zum Tod durch opportunistische Sekundärinfektionen oder maligne Tumore.

Mit Einführung der hochwirksamen antiretroviralen Therapie (HAART, „high active antiretroviral therapy“) hat sich der Verlauf der HIV-Infektion grundlegend geändert. Viele HIV-infizierte Menschen können über Jahre ein relativ gesundes Leben führen (Pomerantz and Horn, 2003). Der individuelle Verlauf der Erkrankung wird dabei durch virale Faktoren und durch Wirtsfaktoren bestimmt. In westlichen Ländern ist deshalb durch HAART die Zahl der AIDS-Todesfälle stark gesunken.

1.2 Virale latente Reservoirs - HIV Persistenz

Eine Eradikation von HIV, d.h. die Entfernung sämtlicher Viren aus dem Körper, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch immer unrealistisch. Ein Grund dafür ist, dass es durch die HAART-Therapie zu keiner kompletten Inhibition der Virusreplikation kommt. Die Viruslast sinkt nur "unter die Nachweisgrenze", d.h. eine Viruslast unter 50 Kopien/ml. Auch bei einer kompletten Inhibition der Virusreplikation würde es aber nicht zur Eradikation von HIV kommen (Strain et al., 2003). Ein wesentlicher Grund

dafür sind latent HIV-infizierte Zellen, die lebenslang bestehende Reservoirs für das Virus bilden und somit eine chronische HIV-Infektion etablieren (Geeraert et al., 2008; Han et al., 2007; Saxena and Potter, 2003). Ein Charakteristikum solcher Reservoirs ist, dass die Virusproduktion durch äußere Einflüsse reaktiviert werden kann und somit das HI-Virus wieder verbreitet wird.

Zahlreiche Interaktionen zwischen dem Virus und der Wirtszelle spielen bei der HIV-Replikation eine Rolle (Goff, 2007). Das intrazelluläre Umfeld hat einen entscheidenden Einfluss auf die Virusproduktion. Infizierte Zellen können deshalb stark in der Menge an produzierten Viruspartikeln variieren. Die beiden Begriffe „produktive Infektion“ und „restringierte Infektion“ werden verwendet, um zwischen hoher oder kaum bis nicht vorhandener Virusproduktion zu unterscheiden. Eine produktive Infektion führt meist zum Tod der Zelle, während Zellen, die restringiert infiziert sind, die Infektion überleben und mit dem Virus weiterleben. Diese Zellen etablieren Virusreservoirs, in denen replikations-kompetente virale Genome in einem stabilen Zustand überdauern. Die Hemmung des viralen Replikationszykluses findet in diesen Zellreservoirs an verschiedensten Stellen statt.

Virale Zellreservoirs entstehen in frühen Infektionsphasen, oft bevor die Infektion überhaupt erkannt wird. Auch eine frühzeitige Behandlung mit antiretroviralen Medikamenten kann ihre Entstehung nicht verhindern (Chun et al., 1998; Persaud et al., 2007). Die latent infizierten Reservoirs bestehen aus sehr heterogenen Zellpopulationen. Zellen verschiedener Körperkompartimente bilden virale Reservoirs (Blankson et al., 2002): ruhende CD4⁺ T-Zellen, naive T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Zellen der Lymphknoten (Popovic et al., 2005), Zellen des Thymus (Brooks et al., 2001) und Zellen des Leber-Epitheliums (Marras et al., 2002). Das Virus versteckt sich auch in Regionen des Körpers, die immunologisch privilegiert sind und deshalb eine Barriere zum Blut besitzen, so dass das Eindringen von Erregern, Immunzellen und auch von antiviralen Medikamenten verhindert wird bzw. nur begrenzt möglich ist. Diese schwer zugänglichen Bereiche, die virale Reservoirs bilden, sind das Auge (Pomerantz et al., 1987), die Hoden (Nunnari et al., 2002; Zhang et al., 1998) und das Gehirn (Kramer-Hammerle et al., 2005c; Persidsky and Poluektova, 2006).

Als wichtiges HIV-Reservoir werden ruhende CD4⁺ T-Zellen im Blut angesehen (Chun et al., 2005; Siliciano et al., 2003). Eine kleine Population aktivierter infizierter (<0,05%) CD4⁺ T-Zellen tritt in einen ruhenden Zustand ein und wird zu

Gedächtniszellen. Diese Zellen erlauben keine Virusreplikation. So persistiert das Virus als Provirus während der gesamten Lebensspanne der Zelle, die Jahre lang überleben, da sie die Basis für das immunologische Gedächtnis darstellen. Wenn diese ruhenden Zellen wieder aktiviert werden (z.B. durch Antigenkontakt bei einer gewöhnlichen opportunistischen Infektion), wird auch die Virusproduktion wieder reaktiviert. Während die Gedächtniszelle gegen einen anderen Krankheitserreger vorgehen will, beginnt sie, neue HI-Viren freizusetzen, welche wiederum andere Zellen infizieren können.

Insgesamt treten langlebige HIV-Reservoire nur mit einer geringen Frequenz im Körper auf: pro Individuum existieren beispielsweise etwa 10^6 - 10^7 latent infizierte CD4+ T-Zellen (Chun et al., 1997). Das bedeutet aber nicht, dass sie deshalb nicht von Bedeutung sind. Es gibt Studien, die berechnet haben, wie lange es dauern würde, bis die letzten latent infizierten Zellen aus dem Körper entfernt sind. Mit einer Eradikation der latent infizierten ruhenden CD4-T-Zellen ist erst nach 73,3 Jahren zu rechnen (Finzi et al., 1999; Siliciano et al., 2003). Die ernüchternde Erkenntnis ist also, dass HIV auch nach langfristiger Suppression durch latent infizierte Zellen vorhanden bleibt.

Das Problem beim Kampf gegen virale Zellreservoire ist, dass latent infizierte Zellen nicht von uninfizierten Zellen zu unterscheiden sind (Han et al., 2007). Deshalb erscheint es die beste Strategie, die Zellen durch äußere Einflüsse zur Virusproduktion anzuregen (z.B. durch proinflammatorische Zytokine) und die Zellen so durch zytotoxisch virale Effekte zu vernichten. Natürlich muss dabei gleichzeitig die Neuinfektion anderer Zellen durch die dabei freigesetzten HI-Viren verhindert werden. Dieser Ansatz ist jedoch nur vernünftig für Zellen, die schnell nachgebildet werden. Die Vernichtung langlebiger Reservoirzellen wie etwa Gehirnzellen ist jedoch wenig sinnvoll.

In den letzten Jahren gab es einige klinische Studien, die versuchten die latenten Reservoire mit verschiedenen Methoden (IL-2, IFN- γ , Cyclophosphamide, Valproinsäure, Hydroxyurea oder anti-CD3 mAB-OKT3) auszuwaschen - bislang ohne Erfolg (Geeraert et al., 2008). Neueste Studien versuchen nun den HIV-Provirus wieder auf dem zellulären Genom auszuschneiden, eine Strategie, die für langlebige Zellen sinnvoller erscheint (Engelman, 2007; Sarkar et al., 2007).

1.3 Die HIV-Infektion des Zentralen Nervensystems

HIV ist ein neurotropes Virus: Es infiziert Zellen des Gehirns. Die HIV-Infektion des ZNS kann zu einer Vielzahl von neurologischen Problemen führen (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005; Jones and Power, 2006). Zum Krankheitsbild von Neuro-AIDS zählen psychiatrische und neurologische Störungen wie Konzentrationsschwäche, Depressionen, Verhaltensveränderungen, Antriebs-, Gedächtnis- und Bewegungsstörungen (Koutsilieri et al., 2002; McArthur et al., 2005; McArthur et al., 2003) Die neurologischen Symptome schreiten meist langsam fort und treten in unterschiedlichsten Stärken auf (Cherner et al., 2007). In ihren milderen Formen spricht man von MCMD („minor cognitive/motor disorders“). Die Symptome können sich im Laufe der Zeit aber auch bis zur HIV-assoziierten Demenz entwickeln (HAD „HIV associated dementia“ oder auch ADC „AIDS-dementia complex“) (McArthur et al., 2003; Price et al., 1988). Die Entwicklung des Krankheitsbildes korreliert dabei aber nicht immer mit einer hohen viralen Genexpression im Gehirn (Glass et al., 1995; Koutsilieri et al., 2002).

Vor dem Einsatz antiviraler Therapien litten etwa 20-30% der Patienten im späten AIDS-Stadium unter der HAD (Kandaneeratchi et al., 2003). Antivirale Medikamente konnten zu einer deutlichen Besserung der HIV-induzierten neurologischen Symptome führen (Nath and Sacktor, 2006). Durch die Einführung von HAART wurde deshalb die Inzidenz (Anzahl an Neuerkrankungen pro Jahr pro Populationsgruppe) von HAD um 50% reduziert werden (Dore et al., 1999; Gartner, 2000; Langford et al., 2003; Lawrence and Major, 2002; Sacktor et al., 2001). In den Industrieländern leiden aber noch immer 30% der HIV-infizierten Patienten an milderen Formen und 10-15% an HAD (Sacktor, 2002; Sacktor et al., 2007). Deshalb bleiben HIV-assoziierte neurologische Störungen in langzeitinfizierten Patienten eines der wichtigsten klinischen Probleme. Die Prävalenz (Prozentsatz einer Population, die von einer bestimmten Krankheit zu einem bestimmten Zeitpunkt betroffen ist) von HIV-assoziierten neurologischen Krankheitsbildern ist seit HAART sogar gestiegen (McArthur et al., 2003). HAD ist weiterhin die Hauptursache für Demenz bei Patienten unter 40 Jahren (Kaul et al., 2001; Sacktor et al., 2005).

Neuropathogenese von HIV

Die HIV-Enzephalopathie ist die pathologische Manifestation einer produktiven HIV-Infektion im Gehirn. Charakteristische Kennzeichen der HIV-Enzephalopathie sind Folgende: der Verlust spezifischer neuronaler Zellpopulationen, die Zerstörung von Synapsen, Dendriten und der Myelinschicht, Schädigung der Axone, Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten, Einwanderung von Makrophagen und Lymphozyten aus dem Blut, Gehirnatropie und die Bildung von Riesenzellen ("giant cells") durch virus-induzierte Fusionen von Mikroglia-Zellen (Bell, 2004; Ellis et al., 2007; Jones and Power, 2006; Kaul et al., 2001; Kolson, 2002; Lawrence and Major, 2002; Minagar et al., 2002).

Die zellulären Mechanismen und die Basis der HIV-1 Neuropathogenese sind sehr komplex und immer noch nicht vollständig bekannt (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005; Jones and Power, 2006). Die neuronalen Schädigungen entstehen nicht allein durch die im Gehirn stattfindende Virusproduktion (siehe Abb. 1.2). Das Gehirn antwortet auf Verletzungen mit der Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten, um gegen Angreifer vorzugehen und den entstandenen Schaden zu reparieren. Die HIV-assoziierten Verletzungen des ZNS entstehen vermutlich deshalb vor allem durch zahlreiche Faktoren, die von glialen infizierten und/oder aktivierten Zellen ausgeschüttet werden. Dies sind sowohl virale als auch zelluläre Faktoren (Ellis et al., 2007; Kaul and Lipton, 2004; Mattson et al., 2005). Manche Faktoren verursachen direkt den Zelltod von Neuronen durch Interaktion mit Rezeptoren auf der neuronalen Membran (neurotoxische Faktoren). Andere Faktoren wiederum wirken indirekt. Sie regen Astrozyten zu zellulären Veränderungen an. So können diese ihre Funktionen nicht aufrechterhalten und es kommt zu damit verbundenen Störungen des Gleichgewichts in der zellulären Umgebung der Nervenzellen (Brack-Werner, 1999; Garden, 2002; Kramer-Hammerle et al., 2005c). Zusätzlich können freigesetzte Faktoren wiederum Zellen zur Produktion inflammatorischer und neurotoxischer Faktoren aktivieren. Ausgeschüttete chemotaktische Substanzen fördern die Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten und schädigen damit weiter das ZNS (Garden, 2002; Kaul et al., 2001; Lawrence and Major, 2002). Zusätzlich tragen auch opportunistische Erkrankungen und Infektionen zu den neurologischen Störungen bei (Hult et al., 2008).

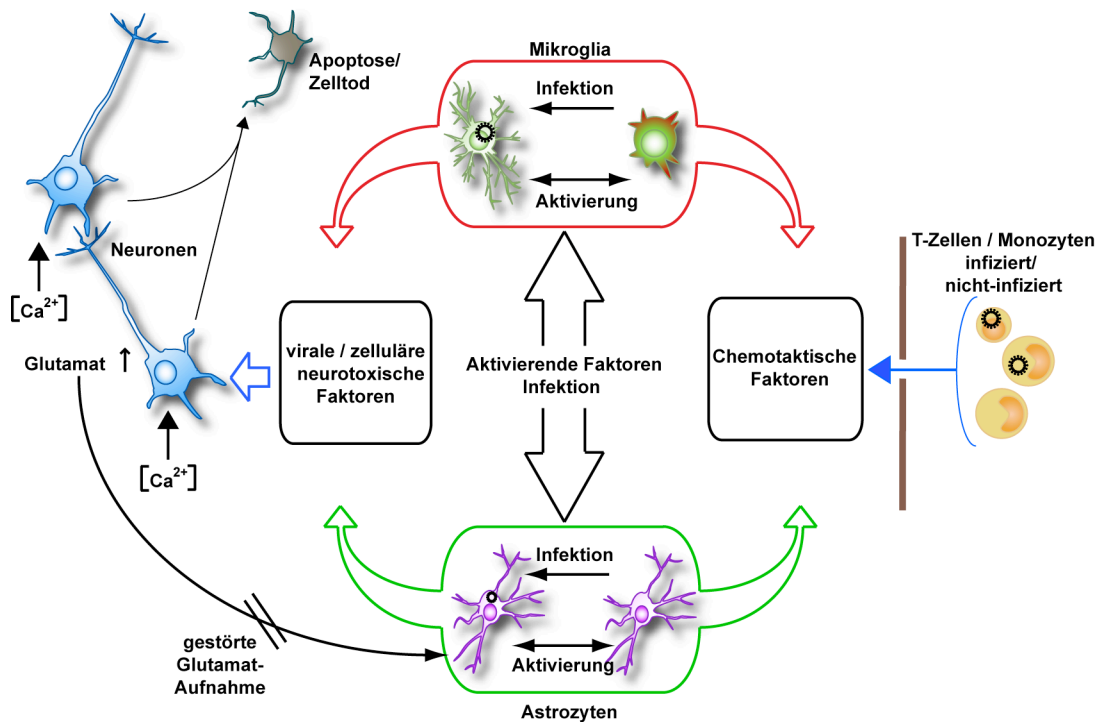


Abbildung 1.2 Vereinfachte Darstellung der Mechanismen der Neuropathogenese von HIV (nach (Kramer-Hammerle et al., 2005c)). Infizierte und/oder aktivierte Astrozyten und Mikroglia-Zellen schütten eine Vielzahl an Faktoren aus, die zur Verletzung des ZNS beitragen. Zu den Faktoren zählen sowohl virale als auch zelluläre neurotoxische Substanzen, sowie chemotaktische Faktoren. Zusätzlich sind infizierte Astrozyten nicht mehr in der Lage den Neurotransmitter Glutamat aus der Mikroumgebung der Neuronen zu entfernen. All diese Mechanismen führen zur Schädigung von Neuronen. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Viruseintritt in das ZNS

Das HI-Virus gelangt sehr früh nach der initialen systemischen Infektion in das Gehirn und verbleibt dort über Jahrzehnte (An et al., 1996; Davis et al., 1992). Die Frage, wie das Virus in das Gehirn gelangt, welches eigentlich durch die Blut-Hirn-Schranke vor Giften und Krankheitserregern geschützt wird, konnte bisher noch nicht im Detail geklärt werden. Verschiedene Mechanismen werden diskutiert (siehe Abb. 1.3) (Bell, 2004; Kaul et al., 2001; Kramer-Hammerle et al., 2005c).

Die zur Zeit bevorzugte Hypothese ist die Migration infizierter Zellen des Immunsystems (Lymphozyten oder Monozyten/Makrophagen) durch die Blut-Hirn-Schranke (Trojan horse-Hypothese, Abb. 1.3, Variante 1) (Albright et al., 2003). Diese Zellen können dann das Virus im ZNS freisetzen. Eine weitere Möglichkeit ist das Eindringen von zellfreien Viruspartikeln aus dem Blut durch die Blut-Hirn-Schranke (Abb. 1.3, Variante 2). Außerdem ist denkbar, dass eine direkte Infektion der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke stattfindet und diese Virus in das Gehirn freisetzen (Abb. 1.3, Variante 3). Diese Zellen stellen auch ein mögliches Reservoir

für HIV da. Weiter könnte die Infektion des Gehirns über den Plexus choroideus stattfinden, der die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) aus Blut bildet.

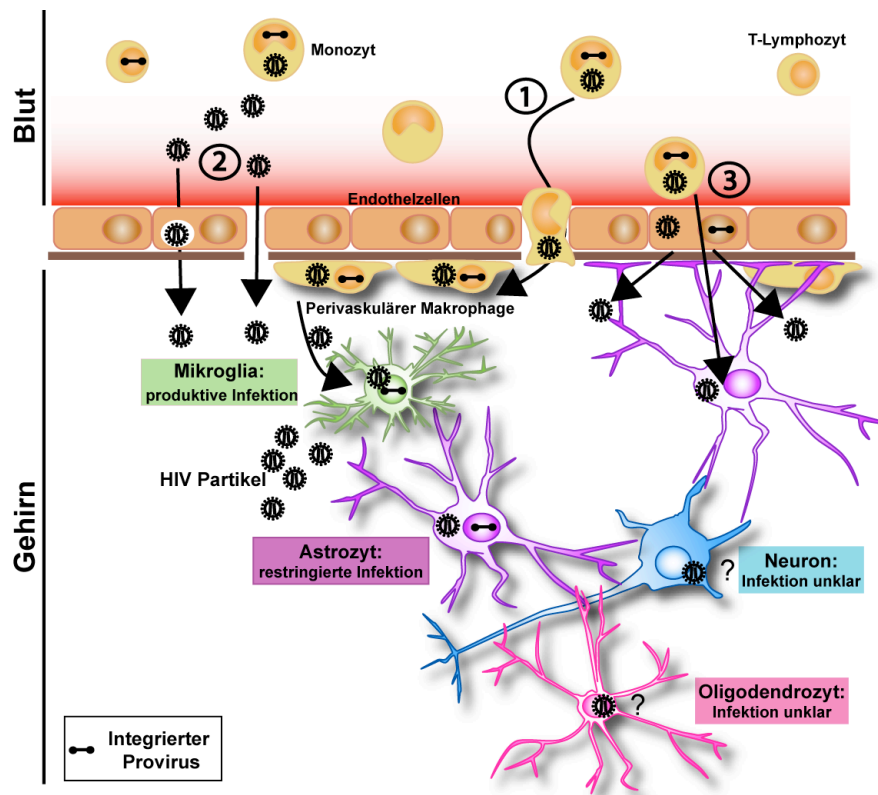


Abbildung 1.3 Modelle für die Invasion des Gehirns durch HIV und virale Zielzellen im ZNS (nach (Kramer-Hammerle et al., 2005c)). Drei mögliche Wege werden für den Eintritt von HIV-1 durch die Blut-Hirnschranke ins ZNS diskutiert. Im ZNS findet sowohl eine produktive als auch restringierte Infektion von Zellen statt. Mikroglia-Zellen stellen die Hauptproduzenten von HIV im Gehirn dar, während Astrozyten die virale Virusproduktion restringieren und deshalb HIV als Reservoir im Gehirn dienen. Die Infektion von Neuronen und Oligodendrozyten wird kontrovers diskutiert. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Zelltypen und Virusreplikation im ZNS

Das ZNS besteht aus folgenden Zelltypen: Neuronen, Gliazellen (Mikroglia und Makroglia) und Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke. Mikrogliazellen entstehen im Gegensatz zu allen anderen Gliazellen aus Vorläuferzellen des Blutbildenden Systems (mesodermal) und haben im ZNS eine ähnliche Funktion wie Makrophagen in anderen Geweben. Sie antworten auf Eindringlinge und auf Gehirnschäden. Zu den Makrogliazellen zählen Astrozyten und Oligodendrozyten. Sie sind zusammen mit Neuronen neuroektodermalen Ursprungs.

Im menschlichen Gehirn es gibt rund 100 Milliarden Neuronen (Greenfield, 2003). Neuronen sind die funktionelle Einheit des Gehirns und brauchen die Unterstützung von Oligodendrozyten und Astrozyten um arbeiten zu können. Jede Nervenzelle

kann mit bis zu 100.000 anderen Nervenzellen Kontakt aufnehmen, wodurch ein weit verzweigtes neuronales Netzwerk entsteht, das Information austauscht, speichert und auch neu generiert (Greenfield, 2003). Oligodendrozyten umhüllen die Axone der Nervenzellen mit einer Myelinschicht, die als elektrischer Isolator fungiert und so die schnelle Weiterleitung von elektrischen Signalen ermöglicht. Eine Oligodendrozytenzelle kann in etwa 30-40 Axone myelinisieren (Jessen, 2004).

Im ZNS findet sowohl eine produktive als auch restringierte Infektion von Zellen statt (siehe Abb. 1.3). Mikrogliazellen sind die Hauptproduzenten von HIV in Gehirnen von HIV-infizierten Patienten (D'Aversa et al., 2005; Garden, 2002). In diesen Zellen findet eine produktive Virusreplikation mit der charakteristischen Expression viraler Strukturproteine statt (Garden, 2002). Die Infektion erfolgt durch makrophagentrophe HIV-Stämme über die beiden Rezeptoren CD4 und CCR5 (Bajetto et al., 2002; Martin-Garcia et al., 2002).

Verschiedene *in vivo*- und Zellkultur-Studien zeigen, dass auch Gehirnzellen neuroektodermalen Ursprungs, insbesondere Astrozyten, infiziert werden können. Diese Zellen restringieren die virale Virusproduktion und dienen deshalb dem HIV als Reservoir im Gehirn (Kramer-Hammerle et al., 2005c).

Kennzeichen der HIV-Infektion des ZNS sind die Verletzung und Zerstörung von Neuronen und der Abbau der schützenden Myelinschicht. Ob aber Neuronen und Oligodendrozyten selbst durch das Virus infiziert werden, ist umstritten. *In vivo* konnte die Infektion von Neuronen und Oligodendrozyten in wenigen Studien beschrieben werden (An et al., 1999; Bagasra et al., 1996; Nuovo et al., 1994; Torres-Munoz et al., 2001; Trillo-Pazos et al., 2003). Viele andere *in vivo*-Untersuchungen konnten jedoch keine HIV-Nukleinsäure oder -Proteine in diesen Zellen nachweisen (An et al., 1999; Enam et al., 2004; Takahashi et al., 1996; Wiley et al., 1999). Vielleicht ist auch der Nachweis infizierter Neuronen nicht möglich, da infizierte Populationen durch die Infektion verloren gehen (Masliah et al., 1995).

Und auch Zellkulturstudien brachten kontroverser Ergebnisse (Albright et al., 1996; Alvarez Losada et al., 2002; Ensoli et al., 1995; Ensoli et al., 1997; Kanmogne et al., 2000; Mizrachi et al., 1994; Obregon et al., 1999; Truckenmiller et al., 1993). Deshalb wird die direkte Infektion von Neuronen und Oligodendrozyten mit dem Virus noch diskutiert. Wenn sie infiziert werden, scheint das Virus aber nicht effizient zu replizieren.

Die HIV-Infektion von Astrozyten

Im ZNS sind Astrozyten der am meisten auftretende Zelltyp: das Verhältnis von Astrozyten zu Neuronen ist etwa 10-50 zu 1 (Hult et al., 2008). Früher wurden die Zellen nur als Kitt oder Stütze zwischen den Nervenzellen angesehen (daher der Name, Glia=Klebstoff), es zeigte sich aber, dass die Zellen vielfältige Funktionen besitzen und auch aktiv an der Zellkommunikation im Gehirn beteiligt sind (Seifert et al., 2006; Volterra and Meldolesi, 2005). Astrozyten verbinden also die Zellen des Gehirns zu einem komplexen Netzwerk und übernehmen vielfältige Schutzfunktionen. Sie formen zusammen mit Endothelzellen die Blut-Hirn-Schranke, die das Eintreten von Fremdstoffen in das Gehirn verhindert. Weiter kontrollieren Astrozyten die Mikroumgebung von Neuronen und sorgen für ein definiertes Milieu, von dem die Funktionen der Neuronen abhängt (Speicherung und Abgabe von Ionen und Neurotransmitter wie Kalium, Glutamat und γ -Aminobuttersäure). Die Astrozyten sorgen darüber hinaus für ein gerichtetes Wachstum und Migration von Neuronen während der Gehirnentwicklung und sie kontrollieren die Formation und Funktion von Synapsen sowie die adulte Neurogenese (Sanai et al., 2004; Song et al., 2002; Volterra and Meldolesi, 2005). Außerdem spielen Astrozyten eine wichtige Rolle bei entzündlichen und regenerativen Prozessen im Gehirn und sie übernehmen zudem verschiedene immunologische Funktionen wie die Produktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen (um andere Zellen zu verletzten Gehirnarealen zu locken) (Chen and Swanson, 2003). Durch die HIV-Infektion an sich bzw. sekretierte Zytokine und virale Proteine können all diese Aufgaben von Astrozyten im HIV-infizierten Gehirn beeinflusst werden.

Die Infektion von Astrozyten mit HIV konnte mittels *in vivo*-Studien gezeigt werden. Sowohl HIV-spezifische Nukleinsäure als auch strukturelle und akzessorische HIV-Proteine wie Nef konnten in Astrozyten nachgewiesen werden (Anderson et al., 2003; Bagasra et al., 1996; Brack-Werner, 1999; Takahashi et al., 1996; Thompson et al., 2004; Trillo-Pazos et al., 2003). Zahlreiche Zellkultursysteme (Zelllinien und primäre Zellen) und auch Virusisolate (makrophagen- und T-Zell-trophe Viren) wurden verwendet, um die Infektion von Astrozyten zu untersuchen. Die Infektion von Astrozyten ist unabhängig von CD4 und anderen Chemokinrezeptoren (Sabri et al., 1999; Schweighardt et al., 2001).

Astrozyten tolerieren eine chronische Langzeit-Infektion mit HIV-1 und bilden so ein Zellreservoir für das Virus im Gehirn. Bei der Infektion von Astrozyten sind meist

keine zytopathischen Effekte zu beobachten (Nath et al., 1995). Infizierte Astrozyten zeigen eine initiale transiente Virusproduktion, wobei die Virusproduktion 2-7 Tagen nach der Infektion am höchsten ist (Brack-Werner et al., 1992; McCarthy et al., 1998; Sabri et al., 1999). Nach dieser anfänglichen Phase sinkt die Virusproduktion auf sehr geringe oder nicht feststellbare Mengen ab und eine persistente Infektion wird etabliert. Persistent infizierte Astrozyten können durch Kokultivierung mit T-Zellen und Monozyten oder auch durch Aktivierung mit inflammatorischen Zytokinen wieder zur transienten Virusproduktion angeregt werden (Sabri et al., 1999).

Astrozyten zeichnen sich also dadurch aus, dass sie durch Restriktion der viralen Genexpression von HIV-1 nur eine begrenzte Virusreplikation zeigen (Brack-Werner, 1999; Messam and Major, 2000). In Astrozyten lassen sich vorwiegend provirale DNA, mRNA für regulatorische Proteine und frühe virale Proteine nachweisen, wogegen mRNA Moleküle, die Strukturproteine verschlüsseln, und Strukturproteine selbst vermindert vorhanden sind (Bagasra et al., 1996; Neumann et al., 1995; Takahashi et al., 1996). Im HIV-1 Replikationszyklus werden diese strukturellen Proteine durch Translation von unvollständig gespleißten bzw. ungespleißten mRNAs gebildet, deren Transport aus dem Nukleus - wie schon beschrieben - Rev-abhängig ist. Es konnte gezeigt werden, dass als Ursache für die verminderte HIV-1 Replikation in Astrozyten zumindest teilweise eine verminderte Funktionalität dieses viralen posttranskriptionellen Stimulationsfaktors anzusehen ist (Ludwig et al., 1999; Neumann et al., 2001). Zusätzlich zur Hemmung der Aktivität des viralen Faktors Rev sind einige andere Prozesse der HIV Replikation in Astrozyten blockiert (Gorry et al., 2003). Die HIV-Genexpression wird also in Astrozyten zellabhängig moduliert. Astrozyten stellen somit ein Virusreservoir im Gehirn und eine Virusquelle für HIV-permissive Zellen wie Mikrogliazellen dar (Brack-Werner, 1999).

1.4 Neurale Vorläuferzellen im ZNS

Das Nervensystem ist eines der sich am frühesten entwickelnden Organsysteme. Ungefähr ab der vierten Woche bildet sich das Neuralrohr, aus dem das Nervensystem entsteht. Die Entwicklung des Gehirns geht sehr lange weiter, durch die gesamte Embryogenese und sie ist auch zu späten postnatalen Zeitpunkten noch nicht vollständig abgeschlossen. Die Myelinisierung der Neuronen schreitet sogar bis zum Alter von 15 Jahren fort. Lange Zeit aber galt das scheinbar unumstößliche

Dogma, dass im adulten Gehirn von Säugetieren keine Neurogenese stattfindet, d.h. es existiert keine Bildung neuer Nervenzellen (Rakic, 1985). Die Identifizierung der ersten gewebespezifischen Vorläuferzellen im ZNS von Mäusen und die Charakterisierung deren Fähigkeit, sich in Neuronen und Astrozyten differenzieren zu können (Price and Thurlow, 1988; Reynolds and Weiss, 1992; Ryder et al., 1990; Weiss et al., 1996), warf die Frage auf, ob auch im humanen Gehirn eine Zellneubildung im Erwachsenenalter stattfinden kann. Nur kurze Zeit später wurden auch im humanen ZNS multipotente neurale Stammzellen identifiziert und damit der Beweis geliefert, dass auch das Hirn eine Reparaturfähigkeit besitzt und postnatale Neurogenese stattfindet (Buc-Caron, 1995; Svendsen et al., 1999; Svendsen et al., 1996). Neurale Stammzellen wurden sowohl im embryonalen als auch im adulten humanen ZNS identifiziert und werden jetzt *in vivo* und *in vitro* charakterisiert. Trotzdem gibt es aber noch immer Wissenschaftler, welche die adulte Neurogenese im humanen Gehirn anzweifeln.

Ebenso wie embryonale Stammzellen weisen neurale Stammzellen das Potential der Selbsterneuerung und einer unbeschränkten Lebenszeit auf. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ist das Differenzierungspotential von neuronalen Stammzellen jedoch auf die Differenzierung in die neuronalen Zellpopulationen des Gehirns beschränkt. Neurale Stammzellen werden definiert als sich teilende und selbst erhaltende multipotente Zellen im Gehirn, die in der Lage sind, sich in die drei neuronalen Zelltypen Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten mit unterschiedlichen, spezifischen Funktionen zu differenzieren (siehe Abb. 1.4) (Gage, 2000; Goldman and Sim, 2005; McKay, 1997).

Da das Forschungsgebiet sich derzeit extrem dynamisch entwickelt, ist die Nomenklatur ebenfalls noch im Fluss. Neben der Bezeichnung „neurale Stammzellen“ existieren die Bezeichnungen „neurale Progenitorzellen“ und „neurale Vorläuferzellen“ („*precursor cells*“) (Emsley et al., 2005). Der Ausdruck „Vorläuferzelle“ wird als Oberbegriff für mitotisch- und differenzierungskompetente Zellen verwendet (Martinez-Serrano et al., 2001; McKay, 1997). Die Unterscheidung von neuronalen Stammzellen und neuronalen Progenitorzellen ist sehr schwer. Neurale Stammzellen entwickeln sich nicht direkt zu vollständig differenzierten Zellen, sondern sie bilden intermediäre oder schon festgelegte Progenitorpopulationen, welche dann zu postmitotischen Zellen reifen (Rao, 1999). Neurogene oder gliogene Progenitorzellen besitzen also auch mitotische Kapazität, entwickeln sich aber zu

festgelegten Zellpopulationen (Gage, 2000). Da aber festgestellt wurde, dass neurale Progenitorzellen unter bestimmten Kulturbedingungen wieder multipotent werden können, ist eine klare Unterscheidung von neuronalen Stammzellen und neuronalen Progenitorzellen nicht möglich. Studien zeigen weiter, dass adulte neurale Stammzellen die Charakteristika von Gliazellen besitzen können bzw. dass gliale Zellen als Stammzellen fungieren können (Alvarez-Buylla et al., 2001; Berninger et al., 2007; Buffo et al., 2008; Doetsch, 2003; Fajerson et al., 2006; Garcia et al., 2004; Goldman, 2003; Sanai et al., 2004; Seri et al., 2001). Sie besitzen die Fähigkeit, sich zu voll funktionsfähigen Nervenzellen auszudifferenzieren, auch wenn *in vivo* wohl nur sehr wenige gliale Zellen tatsächlich zu Neuronen differenzieren. Es existieren wohl *in vivo* inhibitorische Signale (z.B. Notch), welche die neuronale Differenzierung verhindern (Liu and Rao, 2004). Diese Eigenschaft der glialen Zellen geht jedoch mit späteren Entwicklungsstadien verloren (Doetsch et al., 1999). Auch radiale Gliazellen, von denen ursprünglich angenommen wurde, dass sie spezifische Vorläufer für Astrozyten darstellen und Neuronen bei der Wanderung helfen, können als neurale Vorläuferzellen fungieren, sich teilen und Neuronen bilden (Malatesta et al., 2003; Merkle et al., 2004; Ventura and Goldman, 2007). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die genaue Identität von neuronalen Vorläuferzellen, Stammzellen bzw. Progenitorzellen noch nicht geklärt ist.

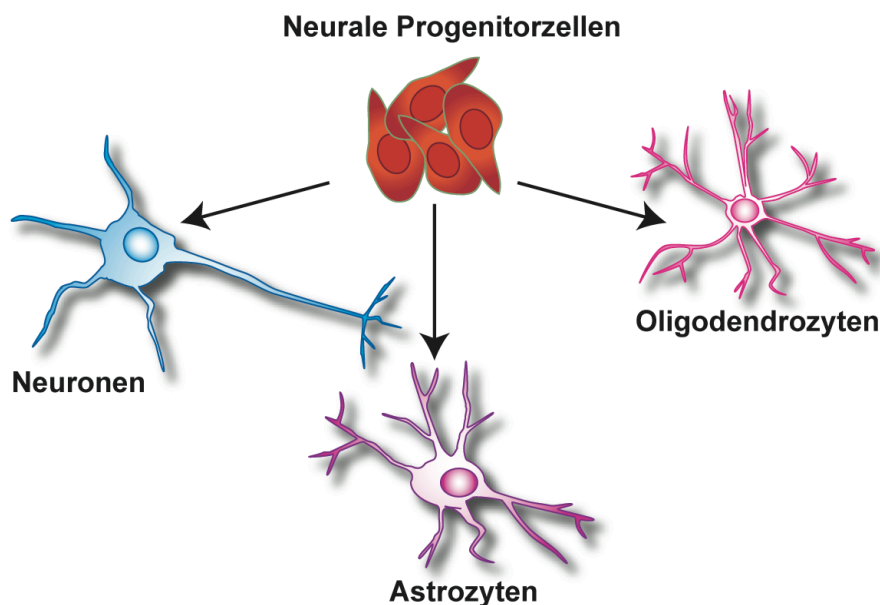


Abbildung 1.4 Differenzierungskapazität von neuronalen Progenitorzellen. Die multipotenten, neuronalen Zellen sind der Lage, sich sowohl in Neuronen, Astrozyten als auch Oligodendrozyten zu differenzieren.

Während der embryonalen Entwicklung des Gehirns findet zuerst vermehrt Neurogenese statt (Alvarez-Buylla et al., 2001). Während dieser Zeit kann die Differenzierung der neuralen Progenitorzellen in Astrozyten auch durch starke Glia-induzierende Faktoren nicht induziert werden (Sauvageot and Stiles, 2002). Der Wechsel zur Astrogenese wird durch externe und zellinterne Signale ausgelöst. Während der Gehirnentwicklung entstehen im gesamten Gehirn Neuronen und Astrozyten, im adulten Säugergehirn existieren jedoch nur noch zwei Regionen, in denen Neurogenese zeitlebens fortgesetzt wird. Neurogene Vorläuferzellen sind zum einen in der subventrikulären Zone, die die lateralen Ventrikel im Vorderhirn umgibt, und zum anderen in der subgranulären Schicht des Gyrus dentatus im Hippocampus lokalisiert (Abrous et al., 2005; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Curtis et al., 2007; Elder et al., 2006; Emsley et al., 2005; Lie et al., 2004; Lledo et al., 2006; Ming and Song, 2005; Quinones-Hinojosa et al., 2006; Taupin and Gage, 2002). Es wird geschätzt, dass etwa eine von 300 Zellen in den Ventrikeln eine neurale Stammzelle ist (Cassidy and Frisen, 2001). Von dort aus wandern die neuronalen Progenitorzellen entlang bestimmter Routen heraus und bilden neue Neurone (Curtis et al., 2007; Ghashghaei et al., 2007). Im Rattengehirn wurde gezeigt, dass täglich mehr als 30.000 neuronale Progenitorzellen die subventrikuläre Zone über den rostralen migratorischen Strom Richtung Riechkolben verlassen (Lledo et al., 2006). Auch die adulte Neurogenese wird durch interne und externe Signale kontrolliert (Abrous et al., 2005; Ming and Song, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Astrozyten die adulte Neurogenese regulieren (Ma et al., 2005; Song et al., 2002).

Über die Funktion der Neurogenese beim Erwachsenen ist man sich nicht sicher, obwohl es eindeutige Hinweise darauf gibt, dass die postnatale Neurogenese im Hippocampus wichtig für das Lernen und Gedächtnis ist (Abrous et al., 2005; Aimone et al., 2006; Emsley et al., 2005; Shors et al., 2001; Shors et al., 2002; Snyder et al., 2005).

Während im unverletzten Gehirn die neuronalen Progenitorzellen nur in den beiden speziellen Regionen zu finden sind, ändert sich die Situation bei Verletzung des Gehirns. Die neuronalen Progenitorzellen werden durch eine Vielzahl an pathologischen Veränderungen aktiviert, wandern zu den verletzten Gehirnregionen und ersetzen dort bestimmte Zellpopulationen (Picard-Riera et al., 2004). Sie können dabei sogar von einer Gehirnhemisphäre zur anderen wandern (Imitola et al., 2004).

Die vorwiegende Antwort bei Verletzungen des Gehirns geht aber von glialen Progenitorzellen aus; sie sind die vorherrschend proliferierende Population bei Verletzungen. Sie helfen beim Wiederaufbau der Blut-Hirn-Schranke und bei der Remyelinisierung (Liu and Rao, 2004). Während neuronalen Progenitorzellen im adulten Gehirn nur in bestimmten Gehirnregionen angesiedelt sind, findet man gliale Progenitorzellen im gesamten Gehirnparenchym. Dort ersetzen sie gliale Zellpopulationen ein Leben lang (Elder et al., 2006; Goldman, 2003; Liu and Rao, 2004; Steiner et al., 2004). Sie stellen in der weißen adulten Gehirnschicht etwa 4% der Zellpopulation dar und können in der Zellkultur auch Neuronen bilden (Goldman and Sim, 2005).

Insgesamt findet aber die endogene Reparatur mit neuronalen Progenitorzellen nur sehr limitiert statt (Han et al., 2004; Jin et al., 2002). Zurzeit ist es bei der Behandlung von Krankheiten des ZNS wie Multiple Sklerose oder der Parkinsonsche Krankheit das Ziel, die Funktion derjenigen Nervenzellen, welche im Verlauf der Krankheit sterben, mit Hilfe von Medikamenten zu ersetzen. Mit den neuronalen Progenitorzellen ergibt sich ein weiterer Therapieansatz: die fehlende Zelle selbst wird durch eine Gesunde ersetzt. Dies könnte entweder durch Anregung körpereigener Progenitorzellen durch differenzierungs- und migrationsfördernde Faktoren oder durch die Transplantation von Progenitorzellen in das erkrankte Gehirngewebe erfolgen (Cao et al., 2002; Goldman, 2005; Keirstead, 2001; Kim, 2007; Lindvall and Kokaia, 2006; Martino and Pluchino, 2006; Muller et al., 2006).

Humane neurale Progenitorzelllinien und die Zelllinie HNSC.100

Um uneingeschränkte Mengen an neuronalen Progenitorzellen für die Erforschung der Zellen selbst und neuer Therapieansätze zur Hand zu haben, wurden epigenetische sowie genetische Methoden für ihre langfristige Vermehrung in Zellkulturen entwickelt (Übersichten: (Martinez-Serrano et al., 2001; Svendsen et al., 1999; Villa et al., 2001). Bei epigenetischen Methoden werden dem Zellkulturmedium bestimmte Mitogene zugesetzt, welche die Proliferation der Zellen unterstützen (Carpenter et al., 1999; Palmer et al., 2001; Vescovi et al., 1999). Die beiden Wachstumsfaktoren EGF (*epidermal growth factor*) und FGF-2 (*basic fibroblast growth factor*, b-FGF/FGF-2) spielen bei der Proliferation von neuronalen Progenitorzellen eine wichtige Rolle (Tureyen et al., 2005). Jedoch scheinen mit epigenetischen Methoden etablierte Zellen, aufgrund der Verkürzung der chromosomalen Telomer-Enden mit

jeder Teilung, nach längerer Kultivierung ihr Proliferationspotential zu verlieren. In genetisch etablierten Zelllinien scheint Telomeraseaktivität vorhanden zu sein, so dass die kurzen Telomer-Enden stabil bleiben (Cacci et al., 2007; Villa et al., 2004). Bei genetischen Methoden werden die Zellen mit immortalisierenden Genen (wie z.B. das Onkogen *v-myc*) transduziert (Cacci et al., 2007; De Filippis et al., 2007; Flax et al., 1998; Pollock et al., 2006; Sah et al., 1997; Villa et al., 2002; Villa et al., 2000).

Die Vorläuferzellen wurden aus dem embryonalen und adulten humanen Gehirn aus verschiedenen Regionen isoliert. Die etablierten humanen neuronalen Zellkulturen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht voneinander (Übersicht: (Villa et al., 2001)): die Isolierung der Zellen, die Art der Zellkultur (adhärente Zellen oder Zellsuspensionen/Neurosphären), die Homogenität bzw. Heterogenität der Zellen, die Art der Mitogenstimulation und ihr Entwicklungspotential.

Die Transplantation humaner neuronaler Progenitorzelllinien ins Nagergehirn konnte gezeigt werden. Die Stammzellen überlebten, wanderten und integrierten in das fremde Gehirn und differenzierten in alle drei neuronalen Zelltypen des Gehirns (Behrstock et al., 2006; Flax et al., 1998; Fricker et al., 1999; Kelly et al., 2004; Kim et al., 2006; Lee et al., 2007; McBride et al., 2004; Rubio et al., 2000; Uchida et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde mit der humanen neuronalen Stammzelllinie HNSC.100 (HNSC „*human neural stem cells*“) gearbeitet, welche von Villa et al. etabliert wurde (Villa et al., 2000). Die neuronalen Progenitorzellen wurden aus dem Vorderhirn eines humanen embryonalen Aborts isoliert. Mit Hilfe epigenetischer und genetischer Methoden wurde die monoklonale und homogene Zelllinie HNSC.100 entwickelt. Zuerst wurden Zellen daraufhin selektioniert, dass sie sich in Medium mit Wachstumsfaktoren teilen. Anschließend wurden die Zellen durch retrovirale Transduktion mit dem Onkogen *v-myc* immortalisiert, so dass sie sich unbegrenzt teilen können (Martinez-Serrano et al., 2001; Villa et al., 2002; Villa et al., 2004). Unter dem Einfluss der beiden Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 bleibt diese Zelllinie multipotent und zeigt Selbsterneuerungspotential (Villa et al., 2000). Entzieht man den HNSC.100-Zellen diese beiden Wachstumsfaktoren, beginnen sie spontan zu differenzieren. Es entsteht eine gemischte Kultur aus Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten. Der überwiegende Anteil (etwa 60%) der Zellen differenziert dabei jedoch zu Astrozyten (Liste et al., 2007; Villa et al., 2000). In dieser Arbeit wurde deshalb entschieden mit

der Bezeichnung "Progenitorzelle" zu arbeiten, da die verwendeten HNSC.100-Zellen bevorzugt in einen bestimmten Zelltyp (Astrozyten) differenzieren.

Der Vorteil bei der Verwendung einer Zelllinie anstatt primärer Zellen lag darin, dass sie deutlich länger in Kultur gehalten werden kann und dadurch einerseits Langzeitstudien möglich waren und andererseits auch die Möglichkeit bestand, die Zellen genetisch zu manipulieren, d.h. fremde Gene in den Zellen stabil zu exprimieren. In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass sich die Progenitorzelllinie HNSC.100 genetisch verändern lässt (Liste et al., 2007; Liste et al., 2004a; Liste et al., 2004b; Navarro-Galve et al., 2005).

Induktion der Astrogenese mittels des Zytokins CNTF

In der vorliegenden Arbeit sollten Differenzierungsbedingungen für die Zelllinie HNSC.100 etabliert werden, welche eine gezielte Differenzierung der Progenitorzellen in Astrozyten fördern, so dass eine reine Astrozytenkultur entsteht. Es wurde der Einfluss des Zytokins CNTF („*ciliary neurotrophic factor*“) auf die Differenzierung der HNSC.100-Zellen untersucht, da in verschiedenen Studien mit murinen neuronalen Progenitorzellen bereits gezeigt werden konnte, dass es die Astrozytendifferenzierung induziert (Aberg et al., 2001; Angelastro et al., 2005; Bonni et al., 1997; Brunet et al., 2004; Johe et al., 1996). CNTF induzierte dabei schnell (48h) und effizient (>90%) die Differenzierung in Astrozyten (Johe et al., 1996). Das Zytokin aktiviert verschiedene zelluläre Mechanismen, die zur Differenzierung in Astrozyten führen. Einerseits stimuliert CNTF den STAT-JAK-Signaltransduktionsweg („*janus kinases and signal transducer and activator of transcription proteins*“). CNTF bindet an den Rezeptor CNTFR. Dies führt zur Aktivierung von assoziierten JAK-Tyrosin-Kinasen, was wiederum die Phosphorylierung verschiedener STAT-Proteine nach sich zieht. Die phosphorylierten STAT-Proteine STAT1 und 3 findet man hauptsächlich im Kern von CNTF-behandelten Zellen, wo sie die Transkription direkt aktivieren (Bonni et al., 1997). Neben diesen optimal untersuchten Weg wird durch CNTF noch der MAPK-Signalweg („*mitogen-activated protein kinase*“) induziert. Dieser im Gegensatz zum JAK-STAT-Weg nur transient aktivierte Signalweg ist wohl am Beginn des Differenzierungsprozesses von Bedeutung. Die Hemmung des MAPK-Weges führt nur zu einer verzögerten Initiierung der Differenzierung, während die Inhibierung von STAT3 die Astrozytendifferenzierung verhindert (Aberg et al., 2001; Rajan and

McKay, 1998). Drittens wurde gezeigt, dass die Stimulierung von neuronalen Stammzellen mit CNTF in einer Phosphatidyl-Inositol-3-OH Kinase/Akt1 abhängigen Phosphorylierung von N-CoR („*nuclear receptor co-repressor*“), einem Transkriptionsrepressor, resultiert. N-CoR reprimiert den astrozytenspezifischen GFAP-Promotor. N-CoR lokalisiert durch die CNTF-induzierte Phosphorylierung zeitweilig im Zytoplasma der Zellen und wird dort wahrscheinlich teilweise degradiert (Hermanson et al., 2002).

Die Induktion der Differenzierung der neuronalen Progenitorzellen durch CNTF ist entwicklungsabhängig (Bonni et al., 1997; Molne et al., 2000; Sauvageot and Stiles, 2002). Die Empfänglichkeit von fetalen neuronalen Vorläuferzellen für CNTF steigt mit dem Alter der Zellen. Dies passt zur Embryonalentwicklung des Gehirns, bei der zuerst vor allem Neuronen entstehen und erst in späteren Phasen Astrozyten. Während der Entwicklung wirken unterschiedliche Mechanismen, um die gliale Differenzierung zu regulieren. Der Repressor N-CoR ist zum Beispiel nur in frühen Entwicklungsstadien von Bedeutung, in späteren Stadien erfolgt die Regulation über epigenetische Mechanismen wie Methylierung des GFAP-Promotors oder hohe Level an neurogenen Transkriptionsfaktoren (Fan et al., 2005; Song and Ghosh, 2004; Takizawa et al., 2001).

1.5 Zelluläre neurale Marker

Zur Unterscheidung und Charakterisierung der verschiedenen neuronalen Zellpopulationen wurde in dieser Arbeit die Expression und Produktion von zellulären Markern untersucht (Übersicht: (Nakano and Kornblum, 2003)). Da die Annahme, dass ein spezifischer Zellmarker für eine spezielle Zellart existiert, meist nicht zutrifft, wurde je Zellpopulation meist mehrere Marker untersucht. Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht über die zur Charakterisierung verwendeten zellulären Antigene. Neuronale Progenitorzellen werden in der Literatur hauptsächlich über die Expression des 220 kD großen Intermediärfilaments Nestin charakterisiert (Dahlstrand et al., 1995; Lendahl et al., 1990; Messam et al., 2002; Messam et al., 2000; Michalczyk and Ziman, 2005). Bei der Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen nimmt die Expression von Nestin ab und wird durch andere intermediäre Filamente wie GFAP in Astrozyten oder Neurofilamente in Neuronen ersetzt (Bazan et al., 2004; Messam et al., 2000). Nestin kolokalisiert immer mit anderen intermediären Filamentproteinen,

da es nicht in der Lage ist, Filamente mit sich selbst zu bilden (Eliasson et al., 1999). Trotz Untersuchungen, die zeigen, dass Nestin nicht alle Stammzellen des ZNS kennzeichnet und der Kenntnis, dass Nestin auch in Zellen exprimiert wird, die keine Progenitorzellen darstellen, wird Nestin auch weiterhin noch in der Literatur als der Marker für neurale Progenitorzellen verwendet (Bazan et al., 2004).

Zellmarker	überwiegend exprimiert in...
Nestin	neurale Progenitorzellen
Sox1	neurale Progenitorzellen
Vimentin	gliale Progenitorzellen
GFAP	Astrozyten
S100 β	Astrozyten
Aquaporin 4	Astrozyten
CNPase	Oligodendrozyten
β Tubulin III	Neuronen (generell)
Synapsin	Neuronen (reife Neuronen)

Tabelle 1.1 Übersicht über die untersuchten Marker und ihre Zellspezifität. Es wurden Zellmarker spezifisch für neurale Progenitorzellen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen untersucht. Literaturzitate sind im Text angegeben.

Als weiterer zellulärer Marker wurde die Expression des Intermediärfilaments Vimentin untersucht. Es bildet in unreifen Progenitorzellen mit Nestin eine Partnerschaft, wird aber auch in proliferierenden Astrozyten, sowie radialen Gliazellen exprimiert (Eliasson et al., 1999; Pekny and Pekna, 2004; Yoshida, 2001). Vimentin mRNA Level werden durch Wachstumsfaktoren und Differenzierung reguliert (Ferrari et al., 1986).

Neben den beiden Intermediärfilamenten wurde die Expression des Transkriptionsfaktors Sox1 zur Identifizierung von neuronalen Progenitorzellen untersucht. Sox1 gehört zur Sox-Genfamilie, die bei der Erhaltung der Multipotenz von Stammzellen in verschiedenen Geweben beteiligt sind (Bazan et al., 2004; Wegner, 1999). Sox1 ist einer der frühesten Marker für neurale Progenitorzellen in Säugern. Er wird bereits während der Entwicklung des Neuralrohrs exprimiert (Aubert et al., 2003; Bazan et al., 2004; Li et al., 1998; Wegner and Stolt, 2005). Während der fötalen Entwicklung wird Sox1 spezifisch von proliferierenden Progenitorzellen im gesamten ZNS exprimiert und auch im adulten Gehirn konnte die Expression gezeigt werden (Aubert et al., 2003; Li et al., 1998; Ying et al., 2003).

Beim Austritt aus der Mitose und Differenzierung wird der Faktor Sox1 herabreguliert (Bazan et al., 2004).

Der typische Zellmarker, der zur Identifizierung von Astrozyten verwendet wird, ist das Intermediärfilament GFAP (*“glial fibrillary acidic protein”*) (Eng et al., 2000). Problem dieses häufig verwendeten Markers ist, dass nicht alle Astrozyten GFAP-positiv sind. Die Funktion von GFAP wurde bislang nicht vollständig geklärt, vermutlich kontrolliert es die Zellform und ermöglicht die Beweglichkeit der Astrozyten. Bei der Aktivierung von Astrozyten z.B. im verletzten Gehirn wird die Expression von GFAP hochreguliert.

Zur Charakterisierung von Astrozyten wurde die Expression zweier weiterer Marker untersucht. Einmal das Calcium-bindende Protein S100 β (Nardin et al., 2007; Sen and Belli, 2007; Steiner et al., 2007) und zum anderen das Aquaporin 4 (AQP4). S100 β gehört zu einer Gruppe von Proteine, die Calcium-abhängig als regulatorische Proteine wirken und die Aktivität andere Effektorproteine beeinflussen. Es spielt eine Rolle in Signaltransduktionswegen und ist im Calciumhaushalt der Zellen involviert. Aquaporine bilden Kanäle in der Zellmembran, durch die spezifisch Wassermoleküle gelangen (Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003; Verkman, 2005). Aquaporin 4 wird überwiegend im Gehirn exprimiert, vor allem in der Plasmamembran von Astrozyten (Saadoun et al., 2005; Sulyok et al., 2004). Die Expression von AQP4 startet mit der Astrozytendifferenzierung, allerdings ein paar Tage später als die Expression von GFAP (Yoneda et al., 2001).

Zur Identifizierung von Oligodendrozyten wurde die 2'-3'-zyklische Nukleotidphosphodiesterase (*“2',3'-cyclic-nucleotide-phosphodiesterase”*, CNPase) verwendet. Die CNPase ist ein myelinassoziertes Protein, und somit innerhalb des Nervensystems spezifisch für myelinisierende Zellen (Lappe-Siefke et al., 2003).

Neuronen exprimieren während ihrer Reifung verschiedene Markerproteine (Kempermann et al., 2004). Ein früher Marker für unreife Neuronen ist β -Tubulin III (Draberova et al., 1998; Lee et al., 1990; Memberg and Hall, 1995). Zusätzlich zu den ubiquitären Tubulinen α und β , welche die Mikrotubuli des Zytoskeletts bilden, wird in Neuronen der β -Tubulin Isotyp III exprimiert. Es stellt eines der ersten Proteine des Zytoskeletts in Neuronen dar. Als später Marker der neuronalen Entwicklung wurde die Expression von Synapsin untersucht. Synapsinproteine regulieren die Freisetzung von Neurotransmittern über die synaptischen Vesikel an neuronalen Synapsen (Hilfiker et al., 1999).

1.6 HIV-Infektion von humanen neuronalen Progenitorzellen

Über die HIV-1 Infektion von neuronalen Progenitorzellen und über die Fähigkeit von HIV in diesen Zellen zu persistieren ist bisher nur sehr wenig bekannt. Es existieren erst wenig Studien, die sich mit der Thematik der HIV-Infektion von humanen neuronalen Progenitorpopulationen befassen haben.

Lawrence et al. waren die Ersten, die nachweisen konnten, dass primäre multipotente fötale humane neurale Progenitorzellen mit HIV-1 infiziert werden können (Lawrence et al., 2004). Infektionsstudien mit dem HIV-Stamm IIIB und Transfektionsstudien mit dem infektiösen proviralen Plasmid pNL4-3 zeigten, dass die primären Progenitorzellen anfänglich eine geringe Virusproduktion aufweisen. Nach zehn Tagen konnte jedoch keine Virusproduktion mehr detektiert werden. Die Infektion der Zellen wurde in dieser Studie nur über einen Zeitraum von maximal drei Wochen betrachtet. Zusätzlich konnten die Autoren zeigen, dass in der latenten Infektionsphase die Virusproduktion der infizierten primären Progenitorzellen wieder aktiviert werden kann (Lawrence et al., 2004).

In vivo existiert eine Studie von Schwartz et al., die HIV-1 oder virale DNA in Nestin-positiven Zellen im fetalen Gehirn von Kindern nachweist. Der Nachweis gelang in vier von sieben HIV-infizierten Kindern (Schwartz et al., 2007). Diese Untersuchung spricht dafür, dass *in vivo* tatsächlich die Infektion von neuronalen Progenitorzellen stattfinden kann.

In Gehirnen von HIV-infizierten Patienten mit HAD fand man weniger proliferierende Zellen (Krathwohl and Kaiser, 2004). Die Autoren nehmen an, dass es sich bei diesen proliferierenden Zellen um neurale Progenitorzellen handelt.

1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es nun, zu untersuchen, ob humane neurale Progenitorpopulationen ein weiteres mögliches Zellreservoir für HIV-1 im Gehirn darstellen können. Zu diesem Zweck wurde die Langzeit-HIV-1 Infektion von neuronalen Progenitorzellen analysiert. Weiter sollte der Einfluss des Virus auf die Eigenschaften der neuronalen Progenitorpopulation untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

1 kb DNA-Längenstandard	New England Biolabs, Schwalbach
2 log DNA-Längenstandard	New England Biolabs, Schwalbach
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Agar	Life Technologies, Eggenstein
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
B27-Supplement	Gibco, Karlsruhe
BDNF	Tebu-Bio, Offenbach
Bradford-Proteinbestimmungsreagenz	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
CFSE	Molecular Probes, Karlsruhe
CNTF (human rekombinant)	Tebu-Bio, Offenbach
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs, Schwalbach
EDTA	Sigma, Deisenhofen
EGF (human rekombinant)	Tebu-Bio, Offenbach
Ethidiumbromid, 1% (w/v) in a.d.	Serva, Heidelberg
Ethanol	Merck, Darmstadt
FGF (human rekombinat, FGF-b, FGF-2)	Tebu-Bio, Offenbach
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Geneticin (G418)	Gibco, Karlsruhe
GlutaMAX-I	Gibco, Karlsruhe
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
GoTaq® DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
Hepes-Puffer	Gibco, Karlsruhe
Hoechst 33342 (Bisbenzimid)	Molecular Probes, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Klenow-Fragment	New England Biolabs, Schwalbach
Mercapthoethanol	Sigma, Deisenhofen
M-MLV Reverse Transkriptase RnaseH	Promega, Madison, USA
Minus, Point Mutant	
Methanol	Merck, Darmstadt
N-2 Supplement	Gibco, Karlsruhe
Natriumbutytrat	Sigma, Deisenhofen
Nuclease-freies Wasser	Promega, Madison, USA
NuPAGE® LDS Probenpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® MES SDS Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Probenpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Sample Reduktionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Transferpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
PCR Master Mix	Promega, Madison, USA
PCR Nukleotide Mix (dNTP)	Promega, Madison, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Deisenhofen

PDGF-AB	Tebu-Bio, Offenbach
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco, Karlsruhe
Polybrene	Sigma, Deisenhofen
Polyfect	Qiagen, Hilden
Ponceau S-Rot	Sigma, Deisenhofen
Proteinaseinhibitoren-Mix	Sigma, Deisenhofen
Random Primer	Promega, Madison, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
RNaseH	Promega, Madison, USA
RNasin (Ribonucleaseinhibitor)	Promega, Madison, USA
RQ1 Rnase-freie DNase	Promega, Madison, USA
Saponin	Sigma, Deisenhofen
SDS	Merck, Darmstadt
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Proteinstandard	Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal West Pico Chemil.Substrate	Pierce, Rockford, USA
T4 DNA Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
TNF- α (human)	Sigma, Deisenhofen
Tris	Löwe Biochemika, München
Triton®X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Tween®20	Sigma, Deisenhofen

Weitere allgemeine Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

Sonstiges Verbrauchsmaterial

Filter, 0,22 μm und 0,45 μm	Nunc, Wiesbaden
Hyperfilm ECL	Amersham Bioscience, Freiburg
LightCycler Kapillaren, 20 μl	Roche Diagnostics, Mannheim
Nitrozellulosemembran (0,45 μm)	Bio Rad, München
NuPAGE® -Western Blot Fertiggele	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-D-Lysin beschichtetes Plastikmaterial	BD Falcon, Düren
Qiashredder-Säulchen	Qiagen, Hilden
Sterilfiltrierungsgefäße (0,22 μm)	Millipore, Schwalbach
Whatmann Filterpapier	Bio Rad, München
Zählkammer MD Kova Raster 10	Madaus Diagnostik, Köln

Nicht aufgeführte Verbrauchsmaterialien/Plastikwaren wurden von Corning Inc. (New York, USA), Becton Dickinson (Düren), Eppendorf (Hamburg), Gilson (Den Haag, Niederlande), Greiner Labortechnik (Frickhausen), Nunc International (Wiesbaden) und Sarstedt (Newton, USA) bezogen.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit sterilem Wasser (A.d.) hergestellt. Alle nicht aufgeführten Puffer und Lösungen sind in den Protokollen der verwendeten Kits der Herstellerfirmen beschrieben.

Name	Zusammensetzung
Blockierungspuffer (Western Blot)	1 Teil Milch 2 Teile 0,1% Tween®20 in PBS
DNA-Auftragspuffer	0,01% Bromphenolblau 0,01% Xylencyanol 15% Ficoll 5 mM EDTA
Lysepuffer	1 ml Triplexpuffer + 10 µl Proteinaseinhibitoren-Mix + 10 µl PMSF (200mM)
Paraformaldehyd (PFA) (4%) pH 7,2	4 g PFA in 100 ml PBS
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,4	140 mM NaCl 5,4 mM KCl 9,7 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 2 mM KH ₂ PO ₄
Plasmidminipräparationspuffer pH 4,8	<i>Puffer P1:</i> 25 mM Tris-Base 10 mM EDTA 50 mM Glucose pH 8,0 <i>Puffer P2:</i> 0,2 N NaOH 1% SDS <i>Puffer P3:</i> 3 M Na-Acetat
Stripping-Puffer (Western Blot) pH 2,2	0,2 M Glycin 0,1 % SDS
Triplexpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 0,02% NaN ₃ 0,1% SDS 1% NP-40 0,5% DOC

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (50%)	2 M Tris-Acetat 100 mM Na ₂ -EDTA 10 mM Tris-HCl
Waschpuffer (Western Blot)	0,1% Tween®20 in PBS

2.1.3 Verwendete Kits

Name	Hersteller
Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Staining Kit	Chemicon, Schwalbach
CellPfect Transfection Kit	Pharmacia Biotech, Freiburg
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
FuGENE™ 6/ FuGENE®HD Transfection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
HIV-1 p24-Antigen ELISA	Beckmann Coulter, Krefeld
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
NFκB activation HitKit	Cellomics, Pittsburgh, USA
Nucleobond AX 100/500 Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Extract Kit II	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Omniscript RT-Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qiaamp DNA MiniKit	Qiagen, Hilden
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
RQ1 DNase Kit	Promega, Madison, USA
SuperScript First Strand Synthesis System	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Medien

Bakterienmedien

Sämtliche Nährmedien für die Bakterienanzucht wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Wenn nötig wurde dem LB-Medium bzw. dem LB-Agar zur Selektion Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugefügt.

LB-Medium:	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml A.d., pH 7,0
LB-Agar:	LB-Medium mit 15 g/l Agar
SOC-Medium:	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 mM KCl 20 mM Glucose ad 1000 ml mit A.d., pH 7,0

Einfriermedium: 2 Teile 80% Glycerin,
1 Teil 10 mM MgCl₂

Zellkulturmedien

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) Gibco, Karlsruhe
mit Glutamax-I (L-Analyl-L-Glutamin) mit Natriumpyruvat

DMEM/F-12 1:1 Gibco, Karlsruhe
mit GlutaMAX-I

NeurobasalTM-Medium Gibco, Karlsruhe

RPMI 1640-Medium Biochrom AG, Berlin
2 g/l NaHCO₃ und Glutamin

Die Zelllinien HEK 293T, Hela, 85HG66, U138MG und U251MG wurden in DMEM-Medium mit 10% fötalen Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung kultiviert. Dies entspricht 100 Einheiten Penicillin und 100 µg Streptomycin pro ml. Die Zelllinien TH4-7-5, KE37/1-IIIB und KE37/1 wurden in RPMI-Medium mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung kultiviert. Die HNSC.100-Zellen wurden in chemisch definierten Medien (siehe unten, abgeändert nach (Villa et al., 2000)) gehalten, welches nach Herstellung steril filtriert wurde. FKS wurde für alle Zelllinien bei 56°C hitzeinaktiviert.

Einfriermedien:

Die Zellen wurden in ihrem jeweiligen Zellkulturmedium mit 20% FKS und 10% DMSO eingefroren.

HNSC.100-Medien

Proliferationsmedium:

DMEM/ F-12 + 1% BSA (Sigma Nr. A9647)
+ 1x N2-Supplement
+ 5 mM HEPES-Puffer
+ 0,5% FKS
+ 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung
+ 20 ng/ml FGF-2 (gelöst in PBS + 0,1% BSA+ 1 mM DTT)
+ 20 ng/ml EGF (gelöst in 10 mM Essigsäure + 0,1% BSA)

Astrozytendifferenzierungsmedium:

DMEM/ F-12 + 1% BSA (Sigma Nr. A9647)
+ 1x N2-Supplement
+ 5 mM Hepes-Puffer
+ 0,5% FKS
+ 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung
+ 100 ng/ml CNTF

Neuronendifferenzierungsmedium:

Neurobasalmedium + 1% BSA (Sigma Nr. A9647)
+ 1x B27-Supplement
+ 5 mM Hepes-Puffer
+ 0,5% FKS
+ 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung
+ 1x GlutaMAX
+ 10 ng/ml BDNF
+ 10 ng/ml PDGF

Die Zytokine wurden den Differenzierungsmedien bei Verwendung jeweils frisch zugesetzt.

2.1.5 Antikörper (AK)**Antikörper gegen zelluläre Antigene**

- anti-GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphatdehydrogenase)
Maus, monoklonal (Chemicon, Hampshire, UK)
1:10.000 (Western Blot)
- anti-GFAP ("*glial fibrillary acidic protein*")
Kaninchen, polyklonales Antiserum (Dako, Hamburg)
1:500 (Immunfärbung), 1:5000 (Western Blot) , 1:50 (FACS)
- anti-Nestin (Messam et al., 2000)
Kaninchen, polyklonales Antiserum (zur Verfügung gestellt von E.O. Major)
1:3000 (Western Blot), 1:30 FACS
- anti-Nestin
Maus, monoklonal (Chemicon, Hampshire, UK)
1:100 (Immunfärbung)
- anti-Tubulin, beta III Isoform
Maus, monoklonal (Chemicon, Hampshire, UK)
1:1000 (Western Blot)
- anti-Synapsin I
Kaninchen, polyklonal (Chemicon, Hampshire, UK)
1:1000 (Western Blot)
- anti-CNPase ("*2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*")
Maus, monoklonal (Chemicon, Hampshire, UK)
1:1000 (Western Blot)

- anti-Vimentin
Maus, monoklonal (Dako, Hamburg)
1:2000 (Western Blot)
- anti-GFP
Ratte, Serum (Dr. Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München)
1:50 (Western Blot)
- anti-DDX1 (DEAD Box Protein)
Maus, monoklonal (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
1:1000 (Western Blot)
- anti-Sam68 („68kDa-Scr-associated protein in mitosis“)
Maus, monoklonal (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
1:2500 (Western Blot)
- anti-Tubulin
Maus, monoklonal (Chemicon, Schwalbach)
1:200 (Immunfärbung)
- anti-CD4, APC (*“Allophycocyanin”*) -konjugiert
Maus, monoklonal (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
1:50 (FACS)
- anti-CCR5, APC-konjugiert
Maus, monoklonal (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
1:50 (FACS)
- anti-CXCR4, APC-konjugiert
Maus, monoklonal (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
1:50 (FACS)

Sekundäre Antikörper und Isotyp-Kontrollen

- anti-Kaninchen, Cy3-konjugiert
Ziege, (Dianova, Hamburg)
1:800 (Immunfärbung), 1:100 (FACS)
- anti-Maus, Meerrettichperoxidase-konjugiert
Ziege (Dianova, Hamburg)
1:10.000 (Western Blot)
- anti-Kaninchen, Meerrettichperoxidase-konjugiert
Ziege (Dianova, Hamburg)
1:10.000 (Western Blot)
- anti-Maus, Alexa488-konjugiert
Ziege (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe)
1:500 (Immunfärbung)
- anti-Kaninchen, Alexa568-konjugiert
Ziege (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe)
1:500 (Immunfärbung)
- Isotyp-Kontrolle IgG2a, \square , APC-konjugiert
Maus (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
1:50 (FACS)

2.1.6 Oligonukleotid-Primer

Die Primer wurden von Herrn Utz Linzner, Helmholtz Zentrum München oder von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Name:	Sequenz (5'-3'):
AQP4 sense	GGAATCCTCTATCTGGTCACA
AQP4 antisense	TGTTTGCTGGGCAGCTTTGCT
CCR3 sense	GCTGATACCAGAGCACTGATG
CCR3 antisense	CAACAAAGGCGTAGATCACCG
CCR5 sense	CTTCATTACACCTGCAGCTCT
CCR5 antisense	CACAGCCCTGTGCCTCTTCTT
CCR8 sense	GCAAGTTGCTCCTTGCTGTC
CCR8 antisense	CATGGGTGGCATAAGTCAGC
CD4 sense	TCAGGGAAAGAAAGTGGTGC
CD4 antisense	AAGAAGGAGCCCTGATTTCC
CXCR4 sense	TAGATATCTTACCATGGAGGGGATCAG
CXCR4 antisense	TAGCGGCGCTTAGCTGGAGTGAAAATTG
CXCR6 sense	CAGGCATCCATGAATGGGTGT
CXCR6 antisense	CAAGGCTATAACTGGAACATGCTG
D6 sense	CGTTCATGCTCAGCCCTAC
D6 antisense	CTGGAGTGCCTAGTCTAGATGC
DC-SIGN sense	GCTGACCCGGCTGAAGGC
DC-SIGN antisense	GGTGAGCCGTCCACCCATT
GPR1 sense	CCAGCTGGGAGTTGTTGTTCACT
GPR1 antisense	GCTGTTTCCAGGAGACACAG
GPR15 sense	ATGGACCCAGAAGAACTTC
GPR15 antisense	TTAGAGTGACACAGACCTC
L-SIGN sense	CAGTGGCATCAGACTTTTTTC
L-SIGN antisense	CCTGGTAGATCTCCTGCA
Nestin sense	GAGAGGGAGGACAAAGTCCC
Nestin antisense	TCCCTCAGAGACTAGCGCAT
RDC1 sense	AAGAAGATGGTACGCCGTGTCGTCTGCATCCTG
RDC1 antisense	CTGCTGTGCTTCTCCTGGTCACTGGACGCCGAG
RPII sense	GCACCACGTCCAATGACAT
RPII antisense	GTGCGGCTGCTTCCATAA
S100 β sense	GGAGACAAGCACAAGCTGAA
S100 β antisense	CCATGACTTTGTCCACCACC
Sox1 sense	AGAACCCCAAGATGCACAAC
Sox1 antisense	GCCAGCGAGTACTTGTCTT
Gfa2-promoter forward	TCTCTGTGCTGGGACTCACA
EGFP forward	AAGGGCGAGGAGCTGTTCA
EGFP reverse	TTGTACAGCTCGTCCATGCC
BSS	GGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAG
GAGA	AACTGCGAATCGTTCTAGCTCCCT
KPNA	AGAGTGGTGGTTGCTTCCCTCCACACAG
SJ4.7A	TTGGGAGGTGGGTTGCTTTGATAGAG
β -Globin sense	GGCTTCCTAGAGACCAATCA
β -Globin antisense	AACCAAGACAGCCAGTTCAC
Provirus sense (oder BK1F)	GTAATACCCATGTTTTTCAGCATTATC
Provirus antisense (oder BK1R)	TCTGGCCTGGTGCAATAGG

2.1.7 Plasmide

- pLRed(INS)₂R

In diesem Plasmid wird die Expression des *DsRed*-Gens (*Discosoma spec.*) durch die HIV-1 LTR kontrolliert. Im 3'untranslatierten mRNA-Bereich befinden sich zwei HIV-1 p17/p24 Instabilitätssequenzen (INS), die zu einer geringen Basisexpression des *DsRed*-Gens führen. Diesen Sequenzen folgt ein RRE ("rev response element"). Die Expression des *DsRed* ist so von zwei HIV-1 Proteinen abhängig: von Tat durch die LTR und von Rev durch das RRE (Wolff et al., 2003). (Horst Wolff, Helmholtz Zentrum München).

- pL3Tat

Das Tat-Gen steht in diesem Plasmid unter der Kontrolle der HIV-1 LTR und kodiert für das 72 AS-Tat-Protein. Das Polyadenylierungssignal ist in einer SV40-Sequenz enthalten (Neumann et al., 1995). (G. Pavlakis, NCI, Maryland, USA).

- pBsRev

Das Rev-Gen steht in diesem Plasmid unter der Kontrolle der HIV-1 LTR (Ludwig et al., 1999). (G. Pavlakis, NCI, Maryland, USA).

- pFRED143

Das Plasmid enthält das sg143-GFP-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors und das SV40-Polyadenylierungssignal. Sg143 ist eine humanisierte stark-fluoreszierenden GFP-Mutante („*green fluorescent protein*") (Demart et al., 2003). (Markus Neumann, Helmholtz Zentrum München).

- pCsRevsg143

Das Rev-Gen wurde aus dem Vektor pBsRev amplifiziert und in den Vektor pFred143 kloniert. Der Vektor kodiert somit unter der Kontrolle eines CMV-Promotors für ein Fusionsprotein aus sRev und GFP (sg143) (Demart et al., 2003; Ludwig et al., 1999). (Markus Neumann, Helmholtz Zentrum München).

- pCsRevNES(A)₄sg143

Für den Vektor pCsRevNES(A)₄sg143 wurde die kodierende Sequenz für die Aminosäuren 79-82 (PLER) von Rev des Plasmids pCsRevsg143, welche sich in der NES Sequenz von Rev befindet, durch die kodierenden Sequenzen für die

Aminosäuren AAAA ausgetauscht (Demart et al., 2003). (Severine Demart, Helmholtz Zentrum München).

- pCsRev Δ ARMsg143

Für den Vektor pCRev Δ ARMsg143 wurde aus dem Plasmid pCsRevsg143 die kodierende Sequenz für das Arginin-reiche Motiv (Aminosäuren 40-46) in der NLS Sequenz von Rev deletiert (Demart et al., 2003). (Severine Demart, Helmholtz Zentrum München).

- pEGFP

Promotorloser EGFP-Vektor. EGFP („*enhanced green fluorescent protein*“) ist eine Variante von GFP, welche für ein breiteres Anregungsspektrum und höhere Expression in Säugerzellen optimiert wurde. Das Plasmid besitzt zusätzlich ein G418-Resistenzgen unter der Kontrolle des SV40 Promotors. (BD Biosciences Clontech, Düren).

- pGfa2-lacZ

In diesem Plasmid wird die Expression von LacZ durch den humanen astrozytenspezifischen Gfa2-Promotor kontrolliert. Der 2,2 kb große Promotor Gfa2 stellt den Promotor des endogenen humanen GFAP-Gens dar (Besnard et al., 1991). Der verwendete Gfa-2-Promotor reicht von der Base -2163 bis +47 (relativ zum Transkriptionsstart gesehen). Das Startcodon ATG für GFAP (+15) wurde zu TTG mutiert, so dass das erste ATG im dahinter klonierten Gen als Startcodon fungieren kann (Besnard et al., 1991; Brenner et al., 1994).

- pGfa2-EGFP

In diesem Plasmid wird die Expression des EGFP-Gens durch den humanen astrozytenspezifischen Gfa2-Promotor kontrolliert. Das Plasmid besitzt zusätzlich ein G418-Resistenzgen unter dem SV40 Promotor. Klonierung siehe Methodenteil.

Foamyvirale Expressionsplasmide

- pCgag-2, pCpol-2 and pCenv-1

Die für die Verpackung, Replikation und Infektion verantwortlichen Viruskomponenten Gag, Pol und Env werden von drei unterschiedlichen Plasmiden kodiert, um die Entstehung von replikationsfähigen Foamy-Viren zu verhindern. Die

Expression der viralen strukturellen Proteine und Enzyme steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Heinkelein et al., 2002; Heinkelein et al., 1998).

- pMD9

Das Plasmid pMD9 besitzt die Genkassette, welche nach der Foamy-Virus-Infektion in das Wirtsgenom der Zielzelle integriert wird. Das Plasmid enthält für die Integration notwendigen Sequenzen der LTR-Region, jedoch ist die virale LTR transkriptionell inaktiv. Ein interner Promotor wird benötigt um die Expression des Fremdgens nach der Transduktion zu kontrollieren.

Der Vektor pMD9 besitzt folgenden Aufbau (siehe Abb. 2.1): CMV-Promotor, 5' Sequenz des Primaten-Foamyvirus bis zu Nukleotid (nt) 645 (welche das erste cis-aktive RNA-Element (CASI) umfasst), 3' pol-Sequenz von nt 3871 bis zu nt 5885 (mit der CASII), die EGFP-Expressionskassette unter der Kontrolle des konstitutiven SFFV-Promotors (U3-Promotor Region des spleen focus forming virus), den Polypurinabschnitt und die 3'LTR (die 3' U3-Region von nt 10262 bis nt 10820 wurde entfernt) (Heinkelein et al., 2002).

- pFVGfa2-EGFP

Gleicher Aufbau wie pMD9, besitzt aber anstatt des konstitutiven SFFV-U3-Promotors den astrozytenspezifischen Gfa2-Promotor (siehe Abb. 2.1). Klonierung siehe Methodenteil.

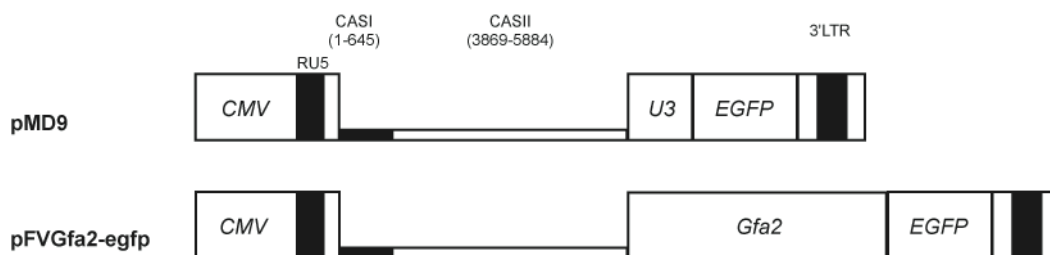


Abbildung 2.1 Schematischer Aufbau der foamyviralen Expressionsplasmide pMD9 und pFVGfa2-EGFP. Die entscheidenden Bestandteile beider Konstrukte wurden als Rechtecke dargestellt. Erklärung der Bestandteile erfolgt im Text.

2.1.8 Zelllinien**- HEK 293T**

Humane embryonale Nierenzelllinie („human embryonal kidney“). Die Zellen wurden transformiert durch humane Adenovirus 5-DNA und dem Large-T-Antigen von SV40. Die Zellen wurden von ATCC bezogen.

- HeLa

Humane epitheloide Zelllinie aus einem Cervix-Karzinom (Fibroblasten). Die Zellen wurden von ATCC bezogen.

- 85HG66

Humane CD4-negative Astrozytomzelllinie, etabliert aus einem Gehirntumor (Astrozytom) (Brack-Werner et al., 1992; Stavrou et al., 1989).

- HNSC.100

Humane neurale Stammzelllinie (Villa et al., 2000). Die Zellen wurde mit dem Onkogen v-myc immortalisiert.

- KE37/1

Humane T-Lymphomzelllinie (Popovic et al., 1984).

- KE37/1-IIIB

Permanente HIV-infizierte humane T-Lymphomzelllinie KE37/1. Die Zellen wurden mit dem HIV-1 Isolat IIIB infiziert (Brack-Werner et al., 1992).

- TH4-7-5

Permanente HIV-infizierte Astrozytomzelllinie 85HG66, die durch Kokultivierung mit den KE37/1-IIIB-Zellen und anschließender Klonierung etabliert wurde (Brack-Werner et al., 1992).

- U87

Humane Astrozytomzelllinie aus einem Tumor III-Grades (Bagasra et al., 1992). Die Zellen wurden von ATCC bezogen.

- U87 CD4

U87-Zellen, die stabil CD4 exprimieren.

- U87 CXCR4

U87-Zellen, die stabil CXCR4 exprimieren.

- U87 CCR5

U87-Zellen, die stabil CCR5 exprimieren.

- U87 CCR3

U87-Zellen, die stabil CCR3 exprimieren.

- U138MG

Humane Glioblastomzelllinie aus einem astrozytären Gliom III-Grades (Bagasra et al., 1992; Bigner et al., 1981; Chiodi et al., 1987). Die Zellen wurden von ATCC bezogen.

- U251MG

Humane GFAP-positive Astrozytomzelllinie aus einem Glioblastom (Besnard et al., 1991; Bigner et al., 1981).

2.1.9 Bakterien**XL-10 Epicuran Coli®**

E.coli Epicurian Coli® SoloPack™ Gold kompetente, superkompetente und ultrakompetente Zellen (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) wurden zur chemischen Transformation verwendet.

2.1.10 Software und Geräte**Spezialsoftware**

Adobe Photoshop 7.0
Adobe Illustrator CS2
Axiovision 4.6
CellQuest Pro
Endnote 6.0.2
Gene Construction Kit 2.5
ImageJ 1.3.3u
IPLab 4.0
LightCycler Software 3.5
Prism 4.0b for Mac
Quantity One 4.2.1.

Adobe Systems Inc., USA
Adobe Systems Inc., USA
Carl Zeiss Vision, Hallbergmoos
BD Bioscience, Düren
Niles Software, USA
Textco Inc., USA
Wayne Rasband, NIH, USA
Scanalytics, Fairfax, USA
Roche, Mannheim
GraphPad, SanDiego, USA
Biorad, München

Spezialgeräte

Cell Observer (Fluoreszenzmikroskop)
Chemidoc (Geldokumentation)
FACScalibur (FACS-Gerät)
Light Cycler
Microplate Reader Model 680
SmartSpec Plus Spektrophotometer
Trans-Blot SD SemiDry Transfer Blot
PCR-Master Cycler Eppendorf Gradient

Carl Zeiss, Jena
Biorad, München
BD Biosciences, Heidelberg
Roche, Mannheim
Biorad, München
Biorad, München
Biorad, München
Eppendorf, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 7% CO₂ kultiviert. Die Medien der jeweiligen Zelllinien sind im Materialteil beschrieben. Bei allen Kulturen (Ausnahmen: KE37/1 und KE37/1-IIIB) handelte es sich um adhärent wachsende Zellen, die zweimal pro Woche entsprechend der Dichte in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:20 geteilt wurden. Für eine Passagierung wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und durch Behandlung mit Trypsin-EDTA proteolytisch vom Boden der Kulturgefäße gelöst. Eine entsprechende Zellzahl wurde in neuem Medium weiterkultiviert. Die Suspensionskulturen KE37/1 und KE37/1-IIIB wurden einmal pro Woche in einem Verhältnis von 1:2 mit Medium geteilt. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Zellzahlbestimmung

Für Experimente, in denen Zellen in einer bestimmten Dichte eingesetzt werden sollten, erfolgten mit Hilfe einer Zählkammer Zellzahlbestimmungen.

Auftauen und Einfrieren von Zellen

Beim Auftauen von im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen wurden diese zügig mit Hilfe von warmem Wasser aufgetaut und in vorgewärmtes Medium in Zellkulturflaschen überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Medienwechsel, um abgestorbene Zellen und restliches DMSO aus dem Medium zu entfernen. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen expandiert.

Zum Einfrieren wurden die Zellen 5 Minuten bei 1500 U/min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und in Nunc-Cryo-Röhrchen überführt. Zunächst erfolgte die Lagerung in Einfrierbechern bei -80°C. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff auf -196°C gebracht.

Kultivierung und Differenzierung der Zelllinie HNSC.100

Die Kultivierung der Zelllinie HNSC.100 erfolgte auf Poly-D-Lysin beschichteten Zellkulturgefäßen (BD Bioscience). Die HNSC.100-Progenitorpopulation wurde in

Proliferationsmedium (siehe Materialteil), welches die beiden Wachstumsfaktoren EGF (20 ng/ml) und FGF-2 (20 ng/ml) enthält, gehalten.

Um die HNSC.100-Zellen zu differenzieren, wurden die HNSC.100-Progenitorzellen in Proliferationsmedium in entsprechenden Zellkulturgefäßen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und Differenzierungsmedium (siehe Materialteil) auf die Zellen gegeben. Die Differenzierungsmedien enthielten keine Wachstumsfaktoren. Ein Mediumwechsel wurde alle drei bis vier Tage durchgeführt. Die HNSC.100-Zellen wurden für mindestens sieben Tage in Astrozytendifferenzierungsmedium kultiviert, um eine Astrozytenpopulation zu generieren. Die Kultivierung der HNSC.100-Zellen in Neuronendifferenzierungsmedium erfolgte für mindestens zehn Tage.

2.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

Transfektionen eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA wurden dem Hersteller-Protokoll folgend mit dem FuGENE™ 6- bzw. mit dem FuGENE®HD-Transfektionsreagenz von Roche durchgeführt. Das Prinzip der DNA-Aufnahme der Zellen durch diese Methode ist nicht veröffentlicht. Es gibt Hinweise auf eine Veränderung der Zellmembran, wodurch diese Transfektionsart nicht geeignet ist für die Produktion von Viruspartikeln. Die Transfektionen erfolgten in 6-well-Platten, pro well wurde ein 100 µl-Ansatz pipettiert. Nach 24-48 Stunden Inkubation im Brutschrank erfolgte die Analyse der Zellen.

2.2.3 Etablierung der Zellpopulation HNSC.pGfa2-EGFP

Die stabile Zellpopulation HNSC.pGfa2-EGFP exprimiert das Reporterprotein EGFP unter der Kontrolle des astrozytenspezifischen Gfa2-Promotors. Zur Etablierung wurden HNSC.100-Zellen zweimal mit dem Plasmid pGfa-EGFP (0,5 µg) mit Hilfe von FuGENE™ 6 transfiziert. Zur Selektion stabiler Transfektanten wurden die transfizierten HNSC.100-Zellen in größere Zellkulturgefäße umgesetzt und mit G418 (500 µg/ml) behandelt. Das Plasmid pGfa-EGFP kodiert für ein G418-Resistenzgen. Probleme bei der Etablierung der Zellpopulation waren, dass nur sehr wenige Zellen transfiziert wurden und nur wenige Zellen bei der anschließenden Antibiotika-Selektion überlebten.

2.2.4 Etablierung der Zellpopulationen HNSC.FV.Gfa2-EGFP und HNSC.FV.U3-EGFP mittels foamyviraler Transduktion

Die Zellpopulationen HNSC.FV.Gfa2-EGFP und HNSC.FV.U3-EGFP wurde mit Hilfe foamyviraler Vektoren etabliert. Die Zellpopulation HNSC.FV.Gfa2-EGFP exprimiert das Reporterprotein EGFP unter der Kontrolle des astrozytenspezifischen Gfa2-Promotors, die Zellpopulation HNSC.FV.U3-EGFP exprimiert EGFP unter der Kontrolle des konstitutiven SFFV-U3-Promotors (U3-Region der LTR des Spleen-Focus-Forming-Virus).

Zur Produktion foamyviraler Viruspartikel wurden $1,6 \times 10^6$ /ml HEK 293T-Zellen in 60mm-Petrischalen in 5 ml Medium eingesät. Um optimale Transfektionseffizienzen zu erzielen, sollten die HEK 293T-Zellen nach 24 Stunden etwa 60% subkonfluent sein. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel (4ml) und die Transfektion mit Polyfect (Qiagen). Je 1,5 μ g folgender Expressionsplasmide wurden kotransfiziert: pCgag2, pCpol2, pCenv (diese Plasmide kodieren die viralen strukturellen Proteine und Enzyme unter der Kontrolle eines CMV-Promotors) (Heinkelein et al., 2002; Heinkelein et al., 1998; Heinkelein et al., 2000) und pFVGfa2-egfp (zur Etablierung der Zellpopulation HNSC.FV.Gfa2-EGFP) bzw. pMD9 (zur Etablierung der Zellpopulation HNSC.FV.U3-EGFP) (Heinkelein et al., 2002). Für die Transfektion wurde der Plasmid-Mastermix mit 100 μ l Medium (ohne Zusätze) und 30 μ l Polyfect gemischt und für 10 Sekunden gevortext. Nach fünf bis zehn minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 ml Medium dazugegeben und anschließend auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag wurde für sieben bis acht Stunden 80 μ l Natriumbutyrat (500 mM) zum Medium zugegeben, um die Virusproduktion zu induzieren. Anschließend wurde 2,5 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Zellüberstand geerntet, steril filtriert (0,45 μ m) und auf die zu infizierenden Zielzellen gegeben.

24 Stunden vor der Infektion wurden 3×10^5 HNSC.100-Progenitorzellen pro well in 6 well-Platten ausgesät. Der steril filtrierte Zellkulturüberstand mit den Viruspartikeln wurde zusätzlich auf die HNSC.100-Zellen gegeben (1ml pro well). Nach zwei Tagen wurde das Medium gewechselt und die HNSC.100-Zellen wieder in Proliferationsmedium weiterkultiviert. Der Erfolg der Infektion wurde im Fluoreszenzmikroskop und zehn Tage nach Infektion im FACS analysiert. Nach Expansion der Zellzahl wurden die grün-fluoreszierenden Zellpopulationen im FACS

aussortiert, um die stabilen Zellpopulationen HNSC.FV.Gfa2-EGFP und HNSC.FV.U3-EGFP zu etablieren.

2.2.5 HIV-Infektion der HNSC.100-Zellen und p24-ELISA

HNSC.100-Zellen wurden mittels zellfreiem Überstand der chronisch HIV-infizierten T-Lymphomzelllinie KE37/1-IIIB infiziert. Dazu wurden einen Tag vor der Infektion die Suspensionszellen KE37/1-IIIB auf eine Konzentration von 8×10^5 Zellen/ml eingestellt, um optimale Bedingungen für die Produktion von HIV zu schaffen. Auch am Tag vor der Infektion wurden die HNSC.100-Zellen in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/well in 6-well-Platten eingesät. 24 Stunden später wurden die Suspensionszellen KE37/1-IIIB abzentrifugiert, der Virus-haltige Überstand genommen und steril filtriert ($0,45 \mu\text{m}$), um alle Zellen zu entfernen. Der Virusüberstand wurde unverdünnt auf die HNSC.100-Zellen gegeben (2ml/well). Ein Aliquot des Virusüberstandes wurde mit Triton-X 100 versetzt (0,5%), um die p24-Konzentration bestimmen zu können. Die im p24-ELISA ermittelte p24-Konzentration betrug 1266 ng p24/ml. 24 Stunden nach der Infektion wurde der Überstand von den HNSC.100-Zellen genommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und wieder in ihrem jeweiligen Zellkulturmedium weiterkultiviert.

Zur Negativkontrolle wurden HNSC.100-Zellen auch mit Überstand der nicht-infizierten Zelllinie KE37/1 behandelt.

Die Replikation von HIV in den HNSC.100-Zellen wurde indirekt über die Bestimmung der Freisetzung von exogenem Virus untersucht. Es wurde die Konzentration des HIV-1 Gag (p24) Proteins im Zellkulturüberstand gemessen. Die HIV-infizierten HNSC.100-Zellen wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion zu bestimmten Konzentrationen (1 bzw. 5×10^5) in 6-well-Platten in 2 ml Medium ausgesät. 24 Stunden später wurde der Zellkulturüberstand geerntet und für 5 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert, um Zellen zu entfernen. Anschließend wurde Triton-X 100 in einer Endkonzentration von 0,5 % zugesetzt. Die Überstände wurde bis zur Bestimmung der p24-Konzentration bei -20°C gelagert.

Die quantitative Bestimmung der p24-Konzentration (in pg/ml) erfolgte mit dem p24 ELISA-Kit der Firma Beckmann Coulter. Der Test wurde nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt.

2.2.6 Verwendte Fluoreszenzfarbstoffe und fluoreszierenden Proteine

Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen und -proteinen wurden zelluläre Strukturen und Proteine sichtbar gemacht.

Folgende Fluoreszenzfarbstoffe bzw. -proteine wurden verwendet:

Hoechst 33342:	Anregung 352 nm, Emission 455 nm
EGFP:	Anregung 488 nm, Emission 507 nm
GFPsg143:	Anregung 489 nm, Emission 509 nm
Alexa488:	Anregung 488 nm, Emission 515 nm
CFSE:	Anregung 492 nm, Emission 517 nm
Cy3:	Anregung 549 nm, Emission 562 nm
Rodamine:	Anregung 551 nm, Emission 573 nm
Alexa 568	Anregung 568 nm, Emission 598 nm
APC:	Anregung 650 nm, Emission 660 nm

2.2.7 Mikroskopie

Lichtmikroskopie

Routinemäßig wurden zellbiologische Arbeitstechniken unter mikroskopischer Kontrolle am inversen Lichtmikroskop durchgeführt. Eine kontrastreiche Darstellung wurde im Auflichtmikroskop durch den Einsatz von Phasenkontrastfiltern erreicht.

Fluoreszenzmikroskopie

Für die Mikroskopie wurden Zellen fixiert, die das eigenfluoreszierende Protein GFP bzw. EGFP exprimierten oder die mittels indirekter Immunfluoreszenz markiert wurden. Die digitalen Bilder wurden mit einem Computer-gesteuerten Zeiss Axiovert 200M Research Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen) und der Software AxioVision 4.6 (Carl Zeiss Imaging Solutions, Hallbergmoos) mit Hilfe einer Zeiss AxioCam HRm CCD-Kamera aufgenommen. Zu vergleichende Bilder wurden unter den gleichen Bedingungen wie Filter, Belichtung, Belichtungszeit und Vergrößerung aufgenommen.

2.2.8 Immunzytochemie

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz wurde für den Nachweis der Expression zellulärer Antigene und Strukturen verwendet. Dazu wurden Zellen mit 4% PFA fixiert (20 min), die Zellmembranen mit 0,2% TritonX-100 in PBS permeabilisiert (15 min) und anschließend mit 2% BSA in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren (15 min). Die Färbung mit dem ersten

AK (in PBS + 1% BSA) erfolgte für zwei Stunden. Nach dem gründlichen Waschen der Zellen mit PBS folgte die Färbung mit dem sekundären Fluoreszenz-gekoppelten AK für eine Stunde. Als Kontrolle für eine unspezifische Hintergrundfärbung wurden die Zellen jeweils nur mit dem sekundären AK behandelt. Bei Doppelfärbungen erfolgte anschließend die Färbung des zweiten zellulären Antigens wiederum mit einem Erst-AK und einem Fluoreszenz-gekoppelte Zweit-AK. Es wurde darauf geachtet, dass die beiden verwendeten Fluoreszenzen im Mikroskop mittels spezifischer Filter zu unterscheiden waren. Alle Schritte nach der Fixierung erfolgten auf einem horizontalen Schüttler bei Raumtemperatur. Die angefärbten Zellen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes analysiert.

2.2.9 Analyse der Zellmorphologie

Für die Analyse der Zellmorphologie wurden die HNSC.100-Zellen in 96-well Platten kultiviert, mit 4% PFA fixiert und mit 0,1% TritonX-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden verschiedene Strukturen der Zellen angefärbt. Nach einem Blockierungsschritt mit 1% BSA in PBS wurde das Zytoskelettprotein Tubulin mit einem Antikörper gegen Tubulin (1:200 in PBS, 1h) und einem Alexa488-gekoppelten anti-Maus Zweit-AK (1:500 in PBS, 1h) angefärbt. Dann wurden das Zytoskelettfilament Aktin mit dem Gift Phalloidin (Rhodamin-gekoppelt) und die DNA und damit der Zellkern mit dem Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Phalloidin und Hoechst 33342 wurden entsprechend den Herstellerangaben des „Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Staining“ Kits eingesetzt. Von den gefärbten Zellen wurden Computer-gesteuert mehrere Bilder verschiedener wells aufgenommen. Die Bilder wurden durch das Programm „Morphology Analyst“ des ASSAYbuilder-Moduls der Software AxioVision 4.6 (Carl Zeiss Imaging Solutions, Hallbergmoos) ausgewertet. Das Programm erkennt automatisch die Zellen durch die angefärbten Zellstrukturen (Zellkern, Mikrotubuli und Aktin) und misst verschiedenste morphologische Parameter von mehreren, zufällig ausgewählten Bereichen in unterschiedlichen wells (siehe Abb. 2.2). Es wurden die Parameter von mindestens 400 individuellen Zellen analysiert. Die Daten wurden in das Programm GraphPad 4.0 exportiert und statistisch ausgewertet.

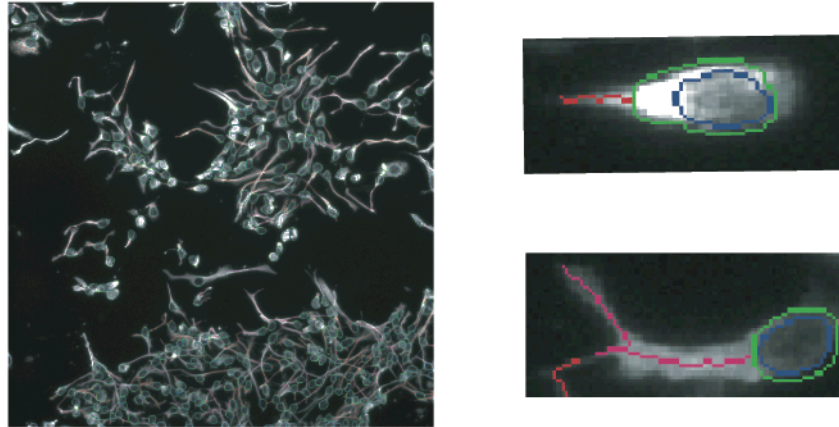


Abbildung 2.2 Analyse der Zellmorphologie mit Hilfe der AxioVision 4.6. ASSAYbuilder Analysis Software. Die *Morphology* BioApplication Software erkennt die angefärbten Zellstrukturen anhand der verschiedenen Fluoreszenzbilder und identifiziert so den Nukleus (blaue Linien), den Zellkörper (grüne Linien) und die Zellausläufer (rote und pinke Linien) individueller Zellen. So können verschiedenste morphologische Parameter für viele einzelne Zellen automatisch bestimmt werden.

2.2.10 Bestimmung der NF- κ B Aktivierung mittels Lokalisationsveränderung von NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B liegt in inaktiver Form im Zytoplasma der Zelle vor und wandert bei Aktivierung in den Zellkern. Deshalb kann der nukleäre Anteil verwendet werden, um die Aktivierung von NF- κ B zu messen. Die Aktivierung von NF- κ B wurde mit Hilfe des "NF- κ B activation HitKits" von Cellomics (Pittsburgh, USA) bestimmt.

HNSC.100 Zellen wurden in 96-well Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, ein Teil der Zellen wurde weiter in Proliferationsmedium kultiviert, der andere Teil in Astrozytendifferenzierungsmedium. Als Positivkontrolle für die Aktivierung von NF- κ B wurden ein Teil der Zellen in Proliferationsmedium mit 10 ng/ml TNF-alpha (TNF- α , *tumor necrosis factor-alpha*) behandelt. Die zu untersuchenden Zellen wurde zu definierten Zeitpunkten mit 4% PFA fixiert. NF- κ B wurde mit einem NF- κ B spezifischen Erst-AK und einem Alexa488-gekoppelten Zweit-AK, der Zellkern mit Hoechst 33342 nach Herstellerangaben gefärbt. Von den gefärbten Zellen wurden Computer-gesteuert mehrere Bilder von verschiedener wells aufgenommen und mit dem Programm Physiology BioApplication des ASSAYbuilder Modules der Software AxioVision 4.6 quantitativ analysiert. Entsprechend der Herstellerangaben wurde der Zellkern verwendet, um die Zellen automatisch zu erkennen. Damit wurde eine nukleäre

Maske generiert, die verwendet wurde, um die NF- κ B Fluoreszenz im Nukleus zu bestimmen. Weiter wurde eine ringförmige Maske um den Nukleus generiert, um die zytoplasmatische Fluoreszenz zu quantifizieren. Der Anteil der nuklären NF- κ B Fluoreszenz wurde pro Ansatz für mindestens 25 Zellen in zufällig ausgesuchten Feldern verschiedener wells bestimmt. Die Daten wurden in das Programm GraphPad 4.0 exportiert und statistisch ausgewertet.

2.2.11 Quantifizierung der Lokalisation von fluoreszierenden Proteinen in der Zelle: Rev-Lokalisation

Die Quantifizierung der Lokalisation eines GFP-gekoppelten Proteins innerhalb einer Zelle wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Demart et al., 2003; Neumann et al., 2001). Um die zelluläre Lokalisation der GFP-gekoppelten Proteine zu quantifizieren, wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen in 30mm-Petrischalen ausgesät und am nächsten Tag mit den Expressionsplasmiden (100-250 ng) transfiziert. Nach zwei Tagen Kultivierung wurde die Zellen mit 4% PFA 20 Minuten bei RT fixiert. Um die Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle bestimmen zu können, wurde der Zellkern spezifisch mit Hoechst 33342 (1:50.000 für 10 Minuten) angefärbt. Danach wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert und photographiert. Es wurden jeweils drei verschiedene Bilder von den Zellen aufgenommen: GFP-Fluoreszenz, Phasenkontrast und die Fluoreszenz der Kernfärbung (Hoechst 33342). Diese drei Bilder ermöglichen mit Hilfe des Programms IPLab von Scanalytics die Eingrenzung des Zellkerns, der gesamten Zelle und eines Kontrollhintergrundbereichs. Das Programm ermittelt mit diesen per Hand erstellten Segmenten, die auf dem GFP-Fluoreszenzbild überlagert werden, die Fluoreszenzintensitäten (mittlere Pixelintensität) der verschiedenen Flächen. Von den erhaltenen Werten für die Gesamtzelle und den Zellkern wurde jeweils die mittlere Hintergrundintensität multipliziert mit der jeweiligen Segmentfläche abgezogen. Der korrigierte Wert für den Zellkern dividiert durch den korrigierten Wert für die Gesamtzelle ergab mit 100 multipliziert schließlich den prozentualen Anteil der Kernfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz der Zelle. Für jeden Ansatz wurden nach Möglichkeit mindestens 12 Zellen quantifiziert.

Die Lokalisation folgender Proteine wurde quantifiziert: Rev-GFP, GFP, RevNES(A)₄-GFP und Rev Δ ARM-GFP. Die Lokalisationen der drei letztgenannten Proteine wurde zur Kontrolle analysiert. Es hatte sich herausgestellt, dass die GFP-

Fluoreszenzintensität nicht wie erwartet gleichverteilt im Zytoplasma und Zellkern der Zelllinien, sondern bei der verwendeten Auswertungsmethode unterschiedlich in den Zelllinien vorliegt. Das bedeutet, dass der prozentuale Anteil der Kernfluoreszenz für GFP nicht bei 50% lag. Die Unterschiede der GFP Verteilung kommen durch das unterschiedliche Kern-zu-Zytoplasma Verhältnis der verschiedenen Zelllinien zustande. Dadurch werden auch die Werte für die Verteilung von Rev-GFP in der Zelle verfälscht. Deshalb wurde versucht die angewandte Quantifizierungsmethode im Hinblick auf die unterschiedlichen Größenverhältnisse innerhalb der verwendeten Zelllinien zu standardisieren. Pro Zelllinie wurde die Lokalisation dreier Proteine bestimmt, die eine bekannte Lokalisation in den Zellen besitzen. Der ermittelte Wert von GFP wurde auf 50% Kernfluoreszenz gesetzt. Zusätzlich wurde die Lokalisation einer Export-defizienten Mutante von Rev, die ausschließlich im Zellkern lokalisiert (pCsRevNES(A)₄) (90% Kernfluoreszenz), und zweitens eine Import-defiziente Mutante von Rev, die dementsprechend nur im Zytoplasma der Zelle zu finden ist (pCsRevΔARM) (10% Kernfluoreszenz), quantifiziert. Aus den drei Werten wurde eine Standardkurve erstellt und die ermittelten Rev-GFP-Werte mittels dieser Kurven standardisiert.

2.2.12 FACS-Analysen

Mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters („fluorescence activated cell sorter“, FACS) lassen sich einzelne Zellen hinsichtlich ihrer strukturellen und fluoreszierenden Eigenschaften untersuchen. Mittels FACS wurden folgende Zellen untersucht: Zellen, die mit den Rev-Expressionsplasmiden und dem Reporterkonstrukt transfiziert wurden, Zellen, die das EGFP-Protein stabil exprimieren, CFSE-gefärbte Zellen und Zellen, die durch fluoreszierende AK angefärbt wurden.

Die FACS-Analysen wurde an einem Becton Dickinson FACSCalibur Flow Cytometer (Anregungslaser: 488 nm) durchgeführt. In den FACS-Analysen wurden 1×10^5 - 1×10^6 Zellen bei höchster Durchflussgeschwindigkeit gemessen. Dafür wurden die Zellen geerntet und in Suspension mit 2% PFA für 20 Minuten bei RT fixiert. Folgende FACS-Kanäle wurden verwendet: FL-1 für grün-fluoreszierende Zellen (GFP, EGFP), FL-3 für rot-fluoreszierende Zellen (DsRed, Cy3) und FL-4 für APC-gefärbte Zellen. Bei der Auswertung mittels der Software CellQuest™ (Becton Dickenson) können tote Zellen und Zelltrümmer über die Größe („Forward Side Scatter“ (FSC)) und

Granularität („Sideward Scatter“ (SSC)) ausgeschlossen werden (Abb. 2.3). Durch Begrenzungen („gates“) können bestimmte Zellpopulation eingeschränkt werden, die auf einzelne Parameter hin untersucht werden sollen. Ermittelte Daten wurden als Histogramme dargestellt, bei denen die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl aufgetragen wird (Abb. 2.3). Mittels dieser Methode kann die mediane Fluoreszenzintensität bestimmter Zellpopulationen gemessen werden. Eine zweite Möglichkeit der Darstellung sind zweidimensionale „Dot-Plots“, bei denen zwei Fluoreszenzen gegeneinander (Rev-Aktivitätsanalysen) bzw. eine Fluoreszenz gegen die Zellgröße aufgetragen werden. Um jeweils die fluoreszierende Population eindeutig eingrenzen zu können, wurde bei jedem Versuch auch die unbehandelte Zelllinie HNSC.100 mitanalysiert.

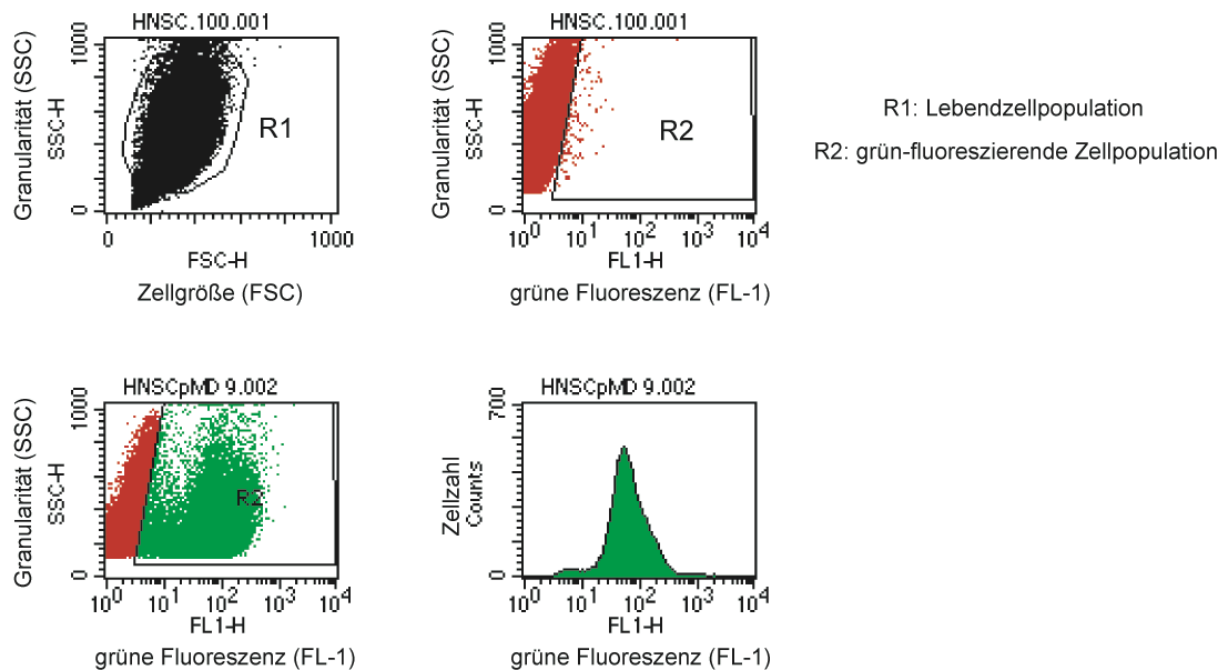


Abbildung 2.3 Auswertung der FACS-Analysen. Dargestellt sind Dot Plots und ein Histogramm Blot (rechts unten) von HNSC.100-Zellen. Zunächst wurde bei allen FACS-Auswertungen die zu analysierende Population R1 mittels der Zellgröße und Zellgranularität eingrenzt (gate R1), um Zelltrümmer bei der Analyse auszuschließen. In den nachfolgenden Auswertungen wurde nur diese Population betrachtet. Mittels unbehandelter HNSC.100-Zellen konnte die Autofluoreszenz der Zellen bestimmt werden und so die fluoreszierende Population R2 festgelegt werden (gate R2). Zur Auswertung der Fluoreszenzintensität wurden Histogrammblots erstellt, bei der nur die R2-Population mit einbezogen wurde.

Fixierung und Immunfärbungen von Zellen für FACS-Analysen

Für die intrazelluläre Immunfärbung von zellulären Proteinen für die Analyse mittels FACS wurden 1×10^6 Zellen in 2% PFA (15 min) in Suspension fixiert. Nach

zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen für 10 Minuten mit 1% Saponin (in PBS) permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1% FCS und 0,1% Saponin in PBS für 20 Minuten blockiert. Ohne die Zellen zu waschen erfolgte die Inkubation mit dem 1.AK (in 1% FCS und 0,1% Saponin in PBS verdünnt) für eine Stunde bei RT. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1% FCS und 0,1% Saponin in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Fluoreszenz-gekoppelten AK (in 1% FCS + 0,1% Saponin in PBS verdünnt) erfolgte für 30 Minuten bei RT. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen in PBS aufgenommen und im FACS untersucht. Zur Kontrolle für unspezifische Färbungen wurden Zellen nur mit dem Zweit-AK inkubiert.

Für die Färbung der Oberflächenrezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 wurden 1×10^6 Zellen fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen APC-gekoppelten AK für eine Stunde gefärbt. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen wiederum im FACS analysiert. Zur Kontrolle für unspezifische Färbungen wurden Zellen mit einer APC-gekoppeltem Isotyp-Kontrolle inkubiert.

2.2.13 Rev-Aktivitätsanalysen

Um die Aktivität des viralen Regulationsfaktors Rev in verschiedenen Zelllinien zu testen, wurde ein Rev-abhängiges Expressionssystem des rot-fluoreszierenden Reporterproteins *DsRed* verwendet (Kramer-Hammerle et al., 2005a; Wolff et al., 2003; Wolff et al., 2006). Die Expression des Fluoreszenzproteins wird durch Tat reguliert, da die Transkription des *DsRed*-Gens unter der Kontrolle der HIV-1-LTR steht. Rev-abhängig wird die Expression von *DsRed* dadurch, dass sich auf der mRNA Sequenz im untranslatierten Bereich zwei Instabilitätselemente (2xINS) und die RRE befinden. Ohne Rev erfolgt deshalb keine effiziente Translation der *DsRed*-mRNA (Abb. 2.4).

Zum Test der Funktion von Rev in den unterschiedlichen Zelllinien, wurden die Zellen in 6-well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mittels der FUGENE™6-Methode transient mit den Rev-Expressionsplasmiden, dem Tat-Expressionskonstrukt und dem Reporterkonstrukt transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und im FACS untersucht. Es wurden typischerweise etwa 100.000 Zellen ausgewertet. Die grüne Fluoreszenz wurde im FL-1 Kanal gemessen, die rote Fluoreszenz im FL-3

Kanal. Im FACS wurde der Anteil der transfizierten grün-fluoreszierenden Zellen bestimmt, der gleichzeitig auch das rote Reporterprotein exprimiert (Abb. 2.4).

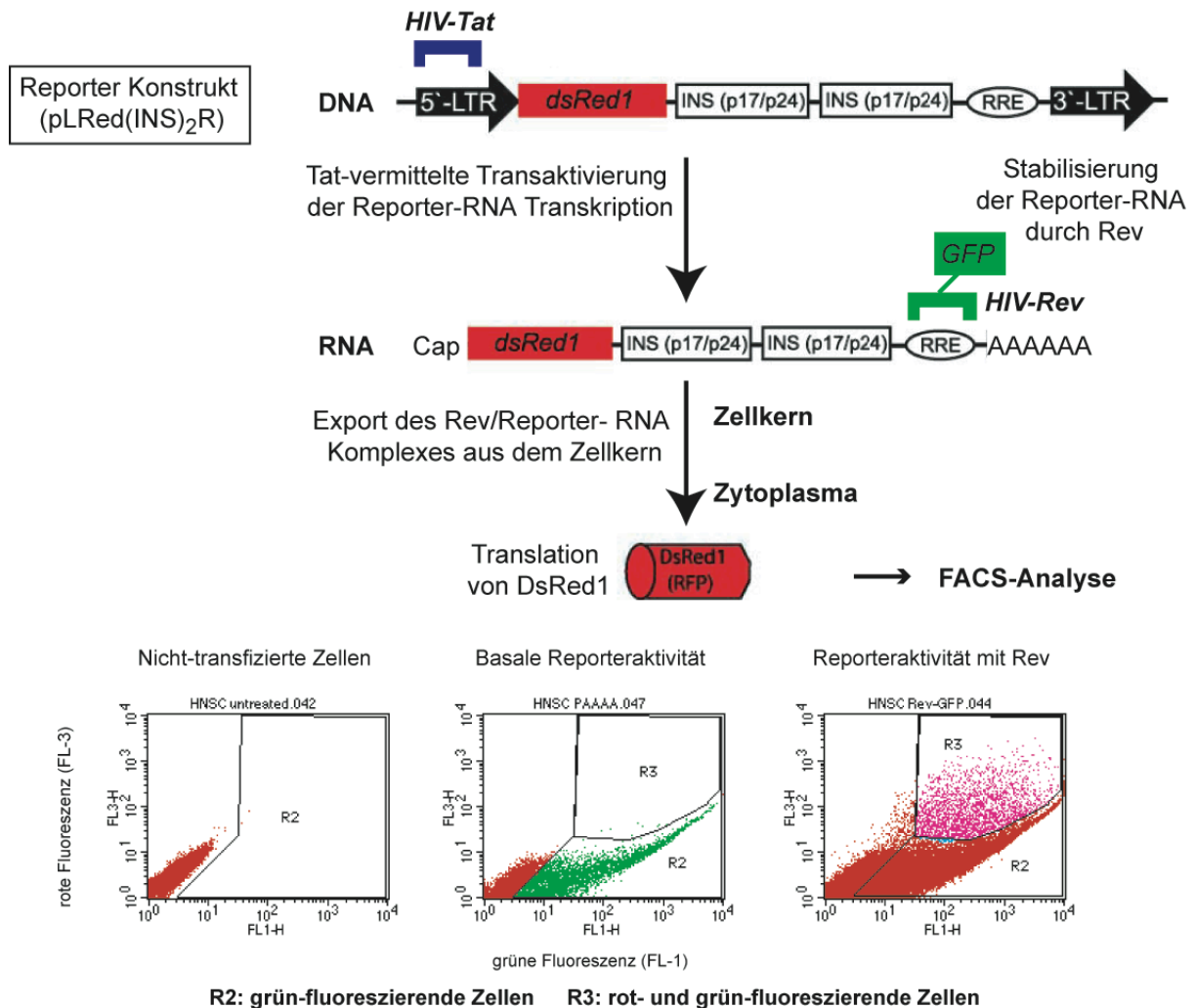


Abbildung 2.4 Prinzip und FACS-Auswertung der Rev-Aktivitätsanalysen. Dargestellt ist das Prinzip des Rev-abhängiges Expressionssystem des rot-fluoreszierenden Reporterproteins *DsRed*. Durch Expression von Tat kommt es zur Transkription der Reporter-mRNA. Rev bzw. Rev-GFP vermittelt den Export des *DsRed*-RNA-Transkripts aus dem Zellkern in das Zytoplasma, wo es zur Translation und Fluoreszenz des Reporterproteins *DsRed* kommt. Die Auswertung des Reportersystems erfolgte im FACS. Es wurde der Anteil an grün-rot-fluoreszierenden Zellen (R3-Population, rosa) bestimmt. Mittels nicht transfizierter HNSC.100-Zellen wurde die grün-fluoreszierende Zellpopulation (R2, grün) festgelegt. Die basale Reporteraktivität wurde mittels inaktiver Rev-Mutanten oder GFP bestimmt.

Die Zellen wurden mit folgenden Plasmidmischungen transfiziert: 1,5 µg pLRed(INS)₂R für die Expression des Reporterproteins, 0,2 µg pL3Tat für die Expression von Tat und 0,2 µg pCsRevsg143 oder pBsRev für die Expression von GFP-gekoppelten Rev oder ungekoppelten Rev. Zusätzlich wurden zu Mischungen mit ungekoppelten pBsRev 0,1 µg pFRED143 für die Expression von GFP als

Transfektionskontrolle kotransfiziert. Die Plasmidmischungen wurden mit dem Vektor pEGFP auf gleiche DNA-Mengen aufgefüllt.

Um die basale Reporteraktivität zu messen, wurden statt funktionellem Wildtyp-Rev entweder kein Rev (nur pFREDsg143) oder defekte GFP-gekoppelte Rev-Mutanten den Plasmidmischungen beigelegt (pCsRevNES(A)₄sg143; pCsRevΔARMsg143). Die Aktivität von Rev wurde als die Fähigkeit bestimmt, durch dessen Zugabe das Reportersystem über die basale Reporteraktivität zu induzieren.

2.2.14 CFSE-Proliferationsassay

Das Proliferationsverhalten wurde mittels einer „*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*“ (CFSE)-Färbung untersucht, die dafür geeignet ist sich Zellproliferation über mehrere Zellteilungsrunden anzuschauen. Der lipophile Farbstoff CFSE diffundiert passiv in die Zellen. Er ist farblos und nicht fluoreszierend bis die Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen abgespalten werden. Dadurch entsteht ein hoch-fluoreszierender Farbstoff, der mit intrazellulären Aminen (enthalten in Amin-haltigen-Aminosäuren) reagiert und so mit intrazellulären Proteinen fluoreszierende Konjugate bildet, die bei der Zellteilung gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben werden.

0,5-1x10⁷ Zellen in Suspension wurden zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten in 1ml 5 μM CFSE (5mM Stocklösung in DMSO, 1:1000 in PBS verdünnt) bei 37°C gefärbt. Durch die Zugabe von 20 ml RPMI-Medium mit 10% FKS wurde die Färbereaktion gestoppt. Es erfolgte eine Inkubation von 5 Minuten auf Eis. Nach zweimaligem Waschen mit 20 ml PBS wurden die Zellen in Proliferationsmedium bzw. Astrozytendifferenzierungsmedium in 12 well- oder 6 well-Platten ausgesät. Ein Aliquot der gefärbten Zellen wurde mit 2% PFA fixiert (Zeitpunkt 0). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden jeweils die Zellen eines wells geerntet und mit 2% PFA fixiert. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS im FL-1 Kanal. Es wurde die mediane Fluoreszenzintensität der gesamten Zellpopulation bestimmt.

2.2.15 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmidminipräparation wurde eingesetzt um kleine Mengen an Plasmid-DNA aus mehreren einzelnen Bakterienklonen zu isolieren, um den Erfolg einer Klonierung zu überprüfen. Die Präparation erfolgte entweder nach unten

beschriebenen Protokoll (verwendete Puffer befinden sich im Materialteil) oder mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kit (Machery&Nagel) streng nach Herstellerangaben. Für Plasmid-Mini-Präparationen wurden von Agarplatten Bakterienkolonien gepickt und in ca. 5 ml LB-Amp-Medium angeimpft. Nach Kultivierung über Nacht bei 37°C im Schüttler wurden 2 ml der Bakteriensuspension fünf Minuten bei 5.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach fünf Minuten auf Eis wurden 200 µl Puffer P2 zugegeben und die Proben mehrmals vorsichtig geschwenkt, um die Bakterien aufzuschließen. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 200 µl Puffer P3. Die geschwenkten Proben wurden für fünf Minuten auf Eis gestellt und dadurch chromosomale DNA und Proteine ausgefällt. Das Präzipitat wurde fünfzehn Minuten bei 15.000 U/min abzentrifugiert, die Überstände mit der Plasmid-DNA in neue Eppendorf-Reagenzgefäße in 330 µl Isopropanol aufgenommen. Die DNA wurde durch diesen Schritt gefällt. Nach der Zentrifugation von 30 Minuten bei 15.000 U/min bei 4°C wurde das DNA-Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation von 10 Minuten bei 15.000 U/min bei 4°C wurde die DNA getrocknet und anschließend in 50 µl A.d. aufgenommen.

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde eine Plasmid-Maxi-Präparation durchgeführt. Dafür wurden 150 ml LB-Amp-Medium mit einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Präparationen erfolgte mit dem Nucleobond-Kit (AX100 oder 500) der Firma Machery&Nagel.

Fotometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mittels einer OD-Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm am UV-Spektralphotometer bestimmt. Die gemessene $OD_{260} \times 5$ für DNA und die gemessene $OD_{260} \times 4$ für RNA gibt die Konzentration der Nukleinsäure in µg/µl an. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} gibt die Reinheit der Nukleinsäure an, wobei ein Wert $>1,8$ anzustreben ist. Kleinere Werte deuteten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese diente zur Analyse von Plasmid-DNA, Produkten aus PCR-Reaktionen oder zur Auftrennung von DNA-Fragmenten. Die Konzentration

der Agarose wurde in Abhängigkeit der erwarteten Fragmentgröße gewählt. Für z.B. ein 1%iges Agarosegel wurde 1g Agarose in 100 ml 1xTAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Zum Sichtbarmachen der DNA-Banden wurde dem Gel Ethidiumbromid (3µl pro 100ml Agarosegel) zugegeben. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit Auftragspuffer versetzt, welcher die DNA beschwert und den Gellauf durch Farbstoffe markiert. Als Laufpuffer diente 1xTAE-Puffer. Je nach Größe und Konzentration des Gels erfolgte die Elektrophorese bei Spannungen zwischen 50V und 100V. Die Größe der DNA wurde anhand eines mit aufgetragenen Längenstandards (2log Marker der Firma NEB) ermittelt. Zur Dokumentation wurden digitale Bilder mit Hilfe des Chemidoc-Geldokumentationssystem von Biorad, München gemacht.

2.2 16 Klonierungsmethoden

DNA-Restriktionsverdau

Der analytische Restriktionsverdau wurde zur Überprüfung von Klonierungen eingesetzt. Es wurden etwa 0,5-1 µg Plasmid-DNA mit 1-5 Units Enzym verdaut. Der präparative Restriktionsverdau diente dazu, DNA-Fragmente aus einem Plasmid auszuschneiden und in einen anderen Vektor einzusetzen. Hierbei werden 1-5 µg DNA und 30-40 Units Enzym eingesetzt.

Es wurden Enzyme der Firmen New England Biolabs, Schwalbach verwendet. Die für ein Enzym jeweils optimalen Pufferbedingungen wurden durch Verwendung eines geeigneten Reaktionspuffers der gleichen Firma erreicht. Manche Enzyme benötigten zur vollständigen Aktivität die Zugabe von 100 µg/ml BSA (Endkonzentration). Die Temperatur und die Zeitdauer einer Reaktion sowie die Enzymkonzentrationen waren abhängig von der eingesetzten DNA-Menge und von den verwendeten Enzymen. Der Verdau der DNA wurde mit einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

Klenow-Reaktion

War es nicht möglich Schnittstellen im Vektor und Insert mit kompatiblen Enden zu finden, wurden die Enden durch das große Fragment der Polymerase I (Klenow-Fragment, NEB) aufgefüllt bzw. abgebaut. Zu der aufzufüllenden DNA wurde die entsprechende Menge Reaktionspuffer, 1,25 mM jedes dNTPs und 1 Unit Klenow

pro μg DNA gegeben. Der Ansatz wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Dephosphorylierung

Um eine mögliche Religation von 3'- und 5'-Enden bei glatten Enden („*blunt ends*“) oder kompatiblen Restriktionsschnittstellen zu verhindern, wurde die DNA-Enden des Vektors dephosphoryliert. Dazu wurde die DNA nach dem Restriktionsverdau mit alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIP) (1 Unit CIP pro μg DNA) inkubiert. Die Reaktion erfolgte eine Stunde bei 37°C. Das Enzym wurde durch Hitze (30 min auf 65°C) inaktiviert.

Säulchen-Reinigung von Plasmid-DNA und Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zum Entfernen von Enzymen sowie spezifischer Salze der Reaktionspuffer wurden DNA-Fragmente mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits der Firma Machery&Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt. Auch die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen fand nach dem Protokoll von Macherey&Nagel mit Hilfe von Ionenaustauschersäulen statt.

Ligation

Durch Ligation wurden DNA-Fragmente in linearisierte Vektoren eingefügt. Es wurde der Rapid DNA Ligation Kit von Roche Diagnostics nach den Angaben des Herstellers verwendet. Das Verhältnis Vektor zu Insert wurde in der Regel so gewählt, dass das Insert in nicht mehr als einem 3-fachen molaren Überschuss vorlag. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei RT konnten die Ligationsansätze in kompetente Bakterien transformiert werden.

Transformation chemokompetenter Zellen

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA muss diese in Bakterien gebracht werden. Für die Transformation wurden XL10 Gold Epicurian Coli®-Zellen verwendet. Die Permeabilisierung der Zellwände der chemokompetenten E.coli-Bakterien erfolgte mit β -Mercaptoethanol. Nach Anlagerung der Plasmid-DNA auf Eis wurden die Bakterienzellen für exakt 60 Sekunden in einem 42°C-Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen. Anschließend konnten sich die Bakterien in SOC-Medium für eine

Stunde in einem 37°C-Schüttler erholen. Die transformierten Bakterien wurden steril auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten auf Bakterienkolonien überprüft, nur erfolgreich transformierte Bakterien mit Ampicillin-Resistenzgen konnten auf dem Nährmedium mit Ampicillin wachsen.

Glycerolkulturen

Um Bakterien, die ein bestimmtes Plasmid tragen, für längere Zeit zu lagern, wurden Glycerolkulturen angelegt. Übernachtkulturen (ca. 10 ml) wurden für zehn Minuten bei 4.500 g abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 3 ml Glycerol-Medium resuspendiert. Davon wurden Aliquots zu je 1 ml bei -80°C eingefroren.

Sequenzierung

Die Überprüfung amplifizierter DNA-Fragmente und klonierter Plasmide auf ihre Richtigkeit erfolgte mittels Sequenzanalyse. Die Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma Sequiserve, Vaterstetten durchgeführt.

2.2.17 Klonierung von pGfa2-EGFP

Die 2,2 kb große Gfa2-Promotorsequenz wurde aus dem Vektor pGfa2-lacZ durch das Restriktionsenzym EcoRI herausgeschnitten, die entsprechende Bande aus dem Agarosegel extrahiert und in den Vektor pEGFP-1 ligiert, der ebenfalls mit EcoRI (Schnittstellen in der "multiple cloning site") verdaut wurde. Das entstandene Plasmid erhielt den Namen pGfa2-EGFP.

2.2.18 Klonierung von pFVGfa2-EGFP

Aus dem Plasmid pGfa2-EGFP wurde die Promotor-Reportergen-Kassette (Gfa2-EGFP) herausgeschnitten. Dazu wurde das Plasmid zuerst mit dem Enzym BglII behandelt, anschließend die überhängenden DNA-Ende mit der Klenow-DNA-Polymerase aufgefüllt und dann mit dem Enzym NotI erneut geschnitten. Das Gfa2-EGFP Fragment wurde in den foamyviralen Expressionsvektor pMD9 kloniert. Dazu wurde aus diesem Vektor der SFFV-U3 Promotor und das nachfolgende EGFP-Gen herausgeschnitten. Dies erfolgte mit Hilfe der beiden Restriktionsenzyme BsmBI und NotI. Der entstandene Vektor erhielt den Namen pFVGfa2-EGFP.

2.2.19 Präparation genomischer DNA

Die Gewinnung genomischer DNA aus 1×10^5 - 1×10^6 Zellen erfolgte mit dem Qiaamp DNA Mini Kit strikt nach Herstellerangaben.

2.2.20 RNA-Methoden

RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus 1×10^5 - 1×10^6 Zellen erfolgte mit dem Qiaquick RNeasy Kit nach Herstellerangaben. Zur Lyse wurden die Qiaashreddersäulchen von Qiagen verwendet. Das Prinzip des Verfahrens beruht auf der Bindung der aus den Zellen freigesetzten RNA an im Kit enthaltenen Säulen. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

Reverse Transkription

Die Untersuchung von zellulären Transkripten mit Hilfe der PCR erfordert die Umschreibung der RNA in cDNA. Dieser Schritt wird als reverse Transkription (RT) bezeichnet.

Vor der Gewinnung von cDNA erfolgte ein DNase-Verdau der gewonnenen RNA mit der DNase der Firma Promega strikt nach Herstellerprotokoll, um eventuell vorhandene genomische DNA zu entfernen. Es wurden 1-2 μg der Gesamt-RNA umgeschrieben und dabei Random-Hexamer-Primer verwendet. Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte nach Herstellerangaben entweder mit dem Omniscript RT-PCR Kit oder es wurde die M-MLV Reverse Transkriptase RnaseH Minus, Point Mutant verwendet (Promega, Mannheim). Der optionale Schritt bei diesem Kit zum Verdau der RNA mit RnaseH erfolgte ausnahmslos. Als RNaseinhibitor wurde Rnasin der Firma Promega eingesetzt. Parallel wurde immer eine Kontrollreaktion durchgeführt, bei der das Enzym (Reverse Transkriptase) fehlte.

RT-PCR-Analysen

Die Untersuchungen auf RNA-Ebene erfolgte durch Reverse Transkriptase (RT)-PCR Analysen. Dazu wurde aus den Zellpopulationen die Gesamt-RNA isoliert und mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis der Expression der Markergene erfolgte in der PCR-Analyse mit spezifischen Primerpaaren (siehe Materialteil). Gleichzeitig wurde auch immer die Expression des

House-Keeping-Gens RNA Polymerase II (RPII) analysiert, um abschätzen zu können, ob vergleichbare Mengen an cDNA untersucht wurden und um Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen. Das RPII-Primerpaar bindet sowohl in genomische DNA als auch in cDNA, wobei unterschiedlich große PCR-Produkte entstehen (genomische DNA 631 bp, cDNA 266 bp).

2.2.21 PCR-Analysen

Die Amplifikation von Nukleinsäure-Fragmenten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zum Nachweis von genomischen DNA-Sequenzen oder zur qualitativen Analyse von Transkripten (cDNA) verwendet. Diente genomische DNA als Template so wurde 1 µg eingesetzt, für eine PCR auf cDNA wurden 2 µl einer Reversen Transkriptions-Reaktion eingesetzt. Für die PCR-Reaktionen wurde das Expand High Fidelity PCR System oder die GoTaq® DNA Polymerase nach Herstellerangaben verwendet. Neben dem Enzym und den spezifischen Puffer wurden der PCR-Reaktion dNTPs, das Template, die beiden Primer und wenn notwendig MgCl₂ zugesetzt. Nach Beendigung der PCR wurde die Reaktion auf erfolgreiche Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments durch eine Gelelektrophorese überprüft.

Nachfolgend sind die typischen Bedingungen für ein PCR-Programm gezeigt:

1x	94°C	5 min	Denaturierung
	94°C	15-30 sek	Denaturierung
30-35x	55-65°C	30 sek	Bindung der Primer (Annealing)
	72°C/68°C	30-180 sek	Elongation
1x	72°C	7-10 min	Vervollständigung der Elongation
	4°C	unbegrenzt	Lagerung

Light Cyclers-Analysen

Eine Möglichkeit, um die Mengen von einem DNA- oder RNA-Ausgangsmaterial quantitativ zu bestimmen, ist die Real-Time-PCR. Bei dieser Methode wird der Amplifikationsverlauf eines Templates über die Zeit verfolgt, indem die Fluoreszenz gemessen wird, die von dem Farbstoff SYBR-Green abgegeben wird, nachdem er sich an die kleine Furche doppelsträngiger DNA angelagert hat. Anschließend wird der CT-Wert errechnet und es kann auf die Menge des Ausgangsmaterials zurück geschlossen werden. Der CT-Wert gibt den „crossing point“ an, den Zyklus, an dem

ein festgelegter Schwellenwert an Amplifikat erreicht wurde. Je höher der CT-Wert, desto weniger Template war im Ausgangsmaterial. Um eine verlässliche und vergleichbare Quantifizierung zu bekommen, wurden sämtliche verwendeten Primer auf den Ausgangsproben auf ihre Amplifikation und deren Effizienz getestet. Bei der Auswertung der erhaltenen Daten gibt es zwei Möglichkeiten: die relative und die absolute Quantifizierung, die zur Provirusquantifizierung verwendet wurde.

Es wurde für alle Ansätze der LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit verwendet und 18 µl des folgenden Master-Mixes in die Glaskapillaren vorgelegt und 2 µl des Templates (cDNA oder genomische DNA) zupipettiert.

Ansatz: 1 µl 5'-Primer (10 µM Stocklösung)
 1 µl 3'-Primer (10 µM Stocklösung)
 2 µl Puffer
 1,6 µl MgCl₂
 12,4 µl H₂O

Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm:

	Temperatur	Zeit	Steigung Temperatur	Zyklusanzahl
Denaturierung	95°C	600 Sek.	20°C/Sek.	1
Amplifikation	95°C	10 Sek.	20°C/Sek.	45
	60°C	5 Sek.	20°C/Sek.	45
	72°C	10 Sek.	20°C/Sek.	45
Schmelzkurve	95°C	0 Sek.	20°C/Sek.	1
	65°C	15 Sek.	20°C/Sek.	1
	95°C	0 Sek.	0,1°C/Sek.	1
Kühlung	40°C	30 Sek.	20°C/Sek.	1

Relative Quantifizierung - vergleichende Expressionslevel

Basierend auf der Veröffentlichung von Radonic et al. wurde das House-Keeping-Gen RNA Polymerase II (RPII) als Standard gewählt (Radonic et al., 2004). Die CT-Werte der Proben wurde auf den CT-Wert von RPII standardisiert, indem der Δ CT-Wert errechnet wurde. Der Δ CT-Wert ergibt sich aus der Differenz des CT-Werts der Probe und des CT-Werts des Standards (RPII). Die vergleichenden Expressionslevel werden nach der Formel $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ berechnet, wobei sich der $\Delta\Delta$ CT-Wert errechnet aus der Differenz der beiden Δ CT-Werte der zwei zu vergleichenden Proben (Livak and Schmittgen, 2001). Ein Wert von 1 entspricht bei dieser Auswertungsmethode

einem identischen RNA-Level und Werte zwischen 0 und 2 wurden als gleiche Mengen zu vergleichender RNA gewertet.

Absolute Quantifizierung - Provirusquantifizierung

Bei der absoluten Quantifizierung wird die Molekülanzahl des Ausgangsmaterials unter Einbeziehung einer erstellten Standardkurve für das zu quantifizierende Primerpaar berechnet. Für die absolute Quantifizierung der proviralen HIV-Kopien wurde genomische DNA der HIV-infizierten Astrozytomzelllinie TH4-7-5 zum Erstellen einer externen Standardkurve verwendet. Die Zelllinie besitzt nur eine provirale Kopie pro Zelle (Brack-Werner et al., 1992). Es wurde eine Standardkurve für das zelluläre β -Globin-Gen als Referenz und eine Standardkurve für die HIV-1 DNA erstellt. Die Primer hierfür sind in (Kabamba-Mukadi et al., 2005) beschrieben. 30 ng der genomischen TH4-7-5-DNA (theoretisches Gewicht der genomische DNA von 5.000 Zellen) wurden für die Standardkurven gleichgesetzt mit 10.000 Genomen und 5.000 proviralen Kopien.

2.2.22 Proteinanalytik

Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

Die zu untersuchenden humanen Zellen wurden entweder durch Trypsinierung oder durch Abschaben mit dem Zellschaber aus dem Zellkulturgefäß gewonnen. Zur Zelllyse wurden die Zellen je nach Zelldichte in 50-100 μ l Lysepuffer (siehe Materialteil) aufgenommen. Nach einer halben Stunde auf Eis wurde das Zelllysate für zehn Minuten bei 14.000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Der entstehende nukleinsäurehaltige Niederschlag wurde mit Zahnstochern herausgepickt.

Um gleiche Mengen an Protein auf die SDS-Gele laden zu können, wurde der Proteingehalt der Zelllysate nach Bradford gemessen. 2 μ l der Zelllysate wurden mit 200 μ l Bradford-Reagenz gemischt und anschließend die Absorption bei 595 nm bestimmt. Zur Quantifizierung wurde zusätzlich die Absorption bekannter BSA-Konzentrationen in dreifachen Ansätzen gemessen und aus den Werten eine Eichgerade erstellt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE können denaturierte, durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladene Proteine entsprechend ihrer Größe in quervernetzten

Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in 4-12% Bis-Tris-Gradientengelen in vertikalen Gelkammern (NuPAGE®, Invitrogen). Eine bestimmte Proteinmenge (10-50 µg) wurde mit Gelauftragspuffer (NuPAGE®, Invitrogen) und Reduktionsreagenz (NuPAGE®, Invitrogen) versetzt. Nach Denaturierung der Proben für 5 Minuten bei 95°C wurden diese abzentrifugiert und sofort auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte nach Zugabe des Laufpuffers (NuPAGE® MES oder MOPS) bei 60-120 Volt. Die Elektrophorese lief bis die Bromphenolblaubande des Probenpuffers aus dem Gel herausgelaufen war.

Western Blot

Nach der Auftrennung wurden die Proteine mit Hilfe eines Semi-Dry Blotters von den Gelen auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Membranen, Whatman-Filterpapiere und Gele wurden vor dem Transfer in Transferpuffer (NuPAGE®, Invitrogen) äquilibriert. Das Blotsandwich für den Proteintransfer wurde in folgender Reihenfolge von der Anode zur Kathode aufgebaut: Whatman Filterpapier, Nitrozellulosemembran, Gel und wieder Whatmann Filterpapier. Der Stapel wurde glatt gestrichen, um Luftblasen zu entfernen. Es wurde bei konstanter Stromstärke von 15 Volt 40 Minuten geblottet. Die Proteinübertragung wurde mit einer Ponceau-Färbung der Membran überprüft. Ponceau S-Rot färbt Proteine an, bindet aber nicht stabil und hat so keinen Einfluss auf nachfolgende Immunnachweise.

Proteine können mit Hilfe von Antikörpern (AK) nachgewiesen werden, die nach spezifischer Bindung markiert und so sichtbar gemacht werden. Um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Proteintransfer über Nacht in Blockierungspuffer (siehe Materialteil) inkubiert. Nachdem Waschen mit Waschpuffer (siehe Materialteil) wurde der 1.AK (in Blockierungspuffer verdünnt) für 2 Stunden bei RT auf die Membran gegeben. Die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten 2.AK (in Blockierungspufferverdünnt) erfolgte für eine Stunde. Die Meerrettich-Peroxidase erzeugt bei Zugabe des Substrats Chlornaphthol ein Lichtsignal. Der Nachweis der an die Proteine gebundenen 1. und 2. AK erfolgte mit Chemolumineszenz. An der Stelle der gebundenen Proteine wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die Membran in der Dunkelkammer durch die Chemolumineszenz ein Signal nachgewiesen. Die Filme wurden für verschiedene Zeiten auf die Membranen

exponiert und anschließend entwickelt. Das Molekulargewicht der aufgetrennten Banden konnte durch Vergleich mit einem mit aufgetragenen Längenstandard (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen) annähernd ermittelt werden.

Quantitative Auswertung von Western Blots mittels Image J

Zur quantitativen Auswertung von Western Blots wurden die entwickelten Röntgenfilme eingescannt und die Tif-Bilder mit Hilfe der Software ImageJ untersucht (Abramoff et al., 2004). Die densitometrische Auswertung der Bilder erfolgte mit der Gel-Analyzer Anwendung nach Herstellerangaben. Zum Standardisieren wurde jeweils auch die Produktion des House-Keeping-Gens GAPDH analysiert.

2.2.23 Statistische Auswertung

Statistische Analysen wurden mit Hilfe der GraphPadPRISM 4.0 Software durchgeführt. Um festzustellen, ob sich zwei Datensätze signifikant unterscheiden, wurde der Mann Whitney Test herangezogen (two-tail P-value). Der Mann-Whitney Test ist ein nichtparametrischer Test zum Vergleich unabhängiger Stichproben. Der dabei erhaltene zweiseitige p-Wert zeigt die Wahrscheinlichkeit an, mit der sich die zwei Stichproben zufällig unterscheiden könnten, obwohl die zugrunde liegenden Populationen gleich sind. Ein kleiner p-Wert bedeutet also, dass der Unterschied zwischen zwei Stichproben nicht zufällig signifikant ist, sagt jedoch nichts über die Größe des Unterschieds zwischen den Stichproben aus. Bei einem p-Wert größer als 0,05 spricht man von einem nicht signifikanten Unterschied zwischen den Stichproben.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Zelllinie HNSC.100

Da das Ziel dieser Arbeit die Analyse der Langzeit-HIV-Infektion von neuronalen Progenitorpopulationen war, wurde nicht mit primären Zellen gearbeitet, sondern eine neurale Progenitorzelllinie verwendet. Es wurde mit der humanen neuronalen Progenitorzelllinie HNSC.100 gearbeitet (siehe Einleitung) (Villa et al., 2000).

Die HIV-1-Infektion von Astrozyten wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits hinsichtlich vieler Aspekte mit Hilfe von humanen Astrozytomzelllinien untersucht. Die neurale Zelllinie HNSC.100 sollte nun zusätzlich auch als Zellkulturmodell für Populationen differenzierter Astrozyten verwendet werden. Deshalb wurden Kulturbedingungen etabliert, die eine gezielte Differenzierung der HNSC.100-Progenitorzellen in Astrozyten fördern. Durch den Entzug der beiden Wachstumsfaktoren und Zugabe des Zytokins CNTF („*ciliary neurotrophic factor*“) in das Zellkulturmedium (Astrozytendifferenzierungsmedium, nähere Zusammensetzung siehe Materialteil) wurde die Differenzierung der HNSC.100-Zellen in Astrozyten gezielt induziert. So konnten nach einem Differenzierungszeitraum von sieben bis zehn Tagen die neuronalen Zellen auch als Modellsystem für Populationen HNSC.100-generierter differenzierter Astrozyten verwendet werden.

Zunächst wurden die beiden HNSC.100-Zellpopulationen (Progenitorzellen und Astrozyten) charakterisiert, um zu zeigen, dass es sich tatsächlich um Populationen von neuronalen Progenitorzellen bzw. Astrozyten handelte. Es wurden verschiedene Zellparameter untersucht, in denen sich Progenitorzellen und Astrozyten unterscheiden sollten. Neben der Analyse der Expression bzw. Produktion zelltypspezifischer Marker wurden morphologische Parameter und das Proliferationsverhalten der Zellpopulationen miteinander verglichen.

3.1.1 Analyse der Markerexpression

Um die beiden Zellpopulationen näher bestimmen und auch unterscheiden zu können, wurden die Progenitor- und die Astrozytenpopulation auf die Expression verschiedener zellulärer Antigene untersucht. Es wurde sowohl ermittelt, ob die Populationen verschiedene Marker exprimierten, als auch ob Unterschiede im

Expressionslevel vorhanden waren. Zur Charakterisierung wurden eine Reihe an neuronalen Marker analysiert, die typischerweise von neuronalen Progenitorzellen, Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten exprimiert werden (siehe Markertabelle 1.1 in der Einleitung).

Die Expression der differenzierungsabhängigen Marker wurde auf RNA- und Protein-Ebene bestimmt. Die Untersuchungen auf RNA-Ebene erfolgten durch Reverse Transkriptase (RT)-PCR Analysen mit spezifischen Primerpaaren (siehe Material- und Methodenteil). Um quantitative Aussagen über die RNA-Expressionslevel treffen zu können, wurden zusätzlich zur RT-PCR noch Real-time-RT-PCR Analysen im Light-Cycler durchgeführt.

Auf Protein-Ebene erfolgte die Analyse der Gesamtpopulationen auf die Produktion von Markerproteinen mittels Western Blot-Analysen. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass überprüft werden kann, ob der Antikörper ein Protein der erwarteten Größe und damit nur das spezifische Antigen detektiert. Um zu untersuchen, welcher Anteil der Zellen positiv für ein Markerprotein sind, wurden intrazelluläre Immunfärbungen an fixierten Zellen durchgeführt und mittels FACS-Analyse ausgewertet. Zusätzlich konnte so die Intensität der Markersynthese ermittelt werden. Auf Einzelzellebene wurde die Markerproduktion über Immunfluoreszenz an fixierten Zellen dargestellt. Diese Methodik erlaubte zusätzlich die Analyse der Koexpression zweier Markerproteinen in einer Zelle.

Da Nestin und GFAP die in der Literatur standardmäßig eingesetzten Marker für neurale Progenitorzellen bzw. Astrozyten sind, wurden die beiden HNSC.100-Zellpopulationen auf die Expression bzw. Produktion dieser Marker jeweils mittels verschiedener Methoden auf RNA- und Protein-Ebene untersucht (siehe Abb. 3.1 und 3.2).

In der RT-PCR-Analyse konnte mit Nestin-spezifischen Primern sowohl in der neuronalen Progenitorpopulation als auch in der Astrozytenpopulation Nestin-RNA detektiert werden (Abb. 3.1a). Errechnete man mit Hilfe von Real-time-RT-PCR Analysen das vergleichende Expressionslevel, zeigte sich, dass in der Astrozytenpopulation 2,67-fach mehr Nestin-RNA exprimiert wird als in der Progenitorpopulation. Im Western Blot und in der Immunfärbung konnte sowohl in der Progenitorpopulation als auch in der Astrozytenpopulation mit einem Nestin-

spezifischen Antikörper die Produktion von Nestin nachgewiesen werden (Abb. 3.1b und 3.1c).

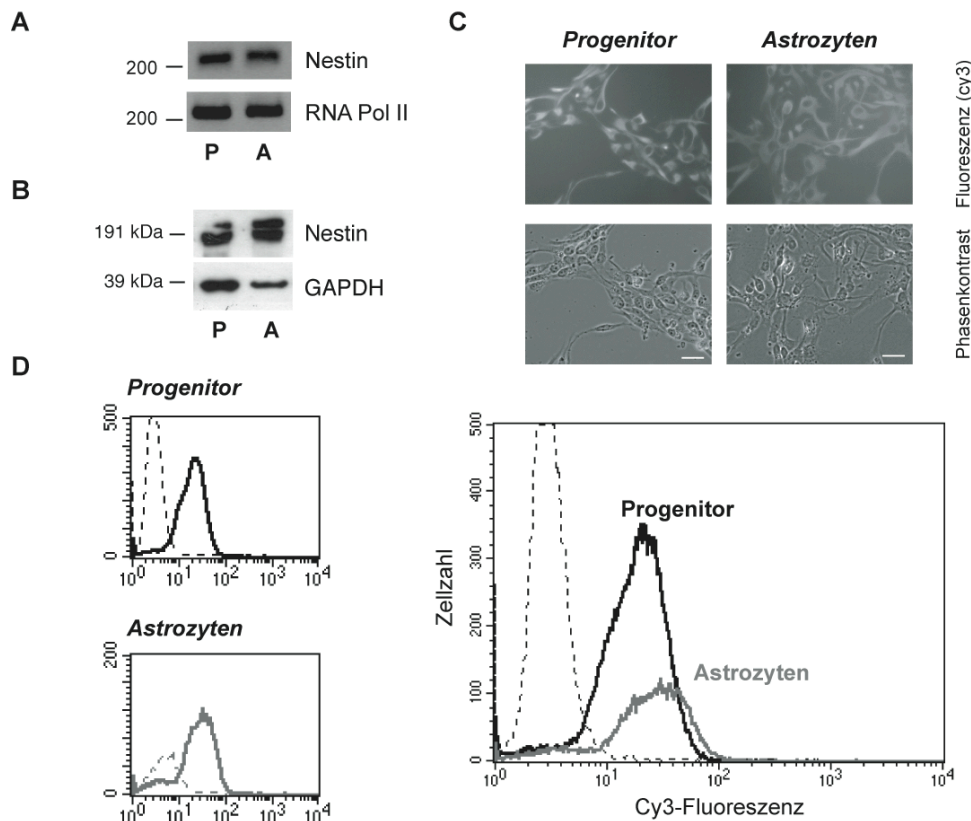


Abbildung 3.1 Analyse der Expression des neuronalen Progenitormarkers Nestin in der Progenitor- (P) und Astrozytenpopulation (A). Sowohl die Progenitorpopulation als auch die Astrozytenpopulation exprimierten Nestin. **A. RT-Analysen.** RNA aus beiden HNSC.100-Populationen wurde in cDNA umgeschrieben und mit Nestin-spezifischen Primern untersucht. RPII diente als Kontrolle, um den Einsatz gleicher cDNA-Mengen sicherzustellen. Nestin 198bp, RPII 266bp. **B. Western Blot-Analyse.** Gesamtzelllysate der HNSC.100-Populationen wurden im Western Blot mit einem Nestin-spezifischen AK untersucht. Die GAPDH-Produktion wurde als Ladungskontrolle analysiert. Nestin 220kDa, GAPDH 36kDa. **C. Immunfärbung zur Analyse der Expression auf Einzelzellebene.** Fixierte, permeabilisierte HNSC.100-Zellen wurden mit einem Nestin-spezifischen Erst-AK und einem Cy3-gekoppelten Zweit-AK angefärbt. Scale bars: 20 μ m. **D. FACS-Analyse.** Die HNSC.100-Populationen wurden fixiert, permeabilisiert und mit einem Nestin-spezifischen Erst-AK und einem Cy3-gekoppelten Zweit-AK gefärbt. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Zweit-AK behandelt (gestrichelte Linie). Links dargestellt sind die FACS-Histogramme sowohl der Progenitor- als auch der Astrozytenpopulation mit ihrer jeweiligen Negativkontrolle und rechts beide Populationen gleichzeitig in einem FACS-Histogramm.

Um für die Proteinproduktion quantitative Aussagen treffen zu können, wurden Zellen in Suspension mit einem Nestin-Antikörper gefärbt und im FACS analysiert (Abb. 3.1d). 92% der Zellen der Progenitorpopulation zeigten eine Nestin-spezifische Färbung (mediane Intensität 19). Auch 90% der Zellen der Astrozytenpopulation waren Nestin-positiv (mediane Intensität 27). Zusätzlich wurde in Western Blot-

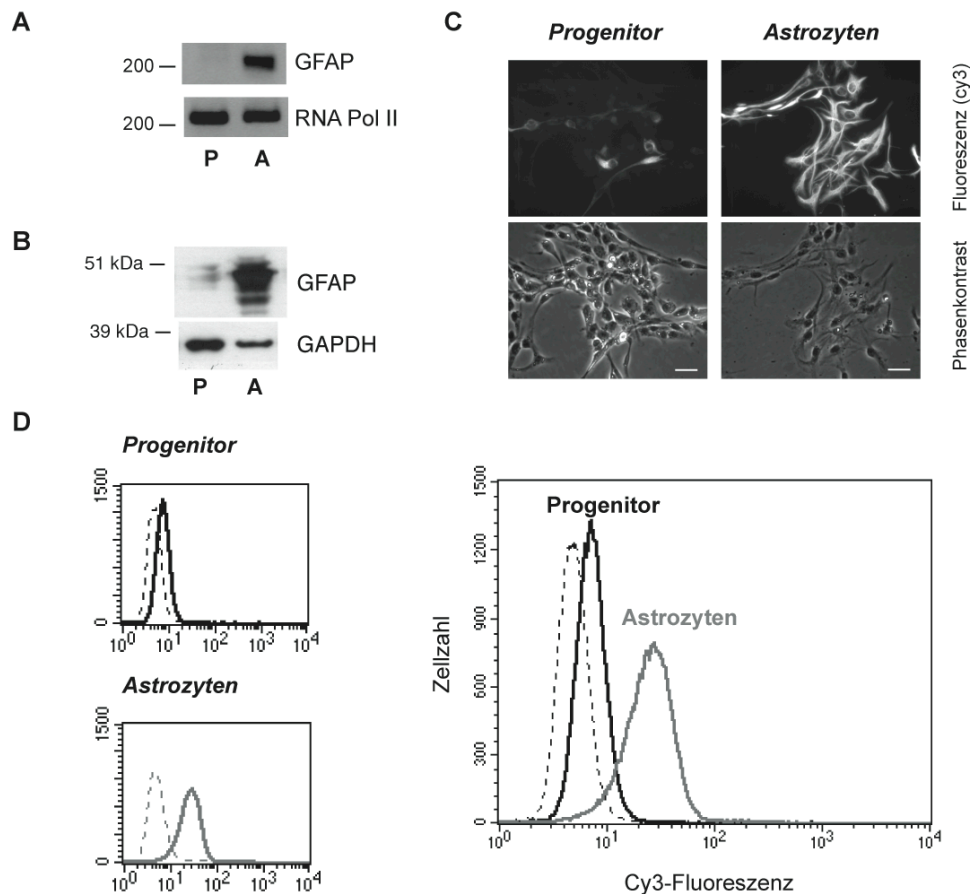
Analysen die Nestin-Synthese der beiden HNSC.100-Populationen mit verschiedenen Astrozytom-Zelllinien verglichen (Daten nicht gezeigt). In den drei Astrozytom-Zelllinien U138MG, U251MG und 85HG66 sowie auch in der untersuchten Kontrollzelllinie (Hela-Zellen) konnte keine Produktion von Nestin detektiert werden.

Eine Expression von GFAP-Transkripten konnte in RT-PCR-Analysen nur in der Astrozytenpopulation nachgewiesen werden (Abb. 3.2a). Errechnet man auch hier das vergleichende Expressionslevel zeigte sich, dass in der Astrozytenpopulation verglichen mit der Progenitorpopulation 4400-fach mehr GFAP-RNA exprimiert wurde. Im Western Blot konnte in der Astrozytenpopulation eine starke Produktion von GFAP gezeigt werden (Abb. 3.2b). In der Progenitorpopulation konnten hingegen nur geringe Mengen an GFAP-Protein detektiert werden. In der Immunfärbung mit einem GFAP-spezifischen Antikörper sah man eine deutliche Färbung der Astrozytenpopulation, während in der Progenitorpopulation nur einige wenige Zellen eine schwache Färbung zeigten (Abb. 3.2c).

Die quantitative Analyse GFAP-gefärbter Zellen im FACS zeigte einen deutlichen Unterschied in der GFAP-Produktion (Abb. 3.2d). 15% der Zellen der Progenitorpopulation zeigten eine GFAP-spezifische Färbung (mediane Intensität 10,6), wogegen 94% der Zellen der Astrozytenpopulation eine GFAP-Synthese zeigten (mediane Intensität 25,3).

Abbildung 3.2 (nächste Seite) Analyse der Expression der Astrozytenmarkers GFAP in der Progenitor- (P) und Astrozytenpopulation (A). Die Astrozytenpopulation zeigte eine deutlich erhöhte Expression an GFAP verglichen mit der Progenitorpopulation.

A. RT-Analysen. RNA aus beiden HNSC.100-Populationen wurde in cDNA umgeschrieben und mit GFAP-spezifischen Primern untersucht. RPII diente als Kontrolle, um den Einsatz gleicher cDNA-Mengen sicherzustellen. GFAP 257bp, RPII 266bp. *B. Western Blot-Analyse.* Gesamtzelllysat der HNSC.100-Populationen wurde im Western Blot mit einem polyklonalen GFAP-spezifischen AK untersucht. Die GAPDH-Produktion wurde als Ladungskontrolle analysiert. GFAP 50kD, GAPDH 36kD. *C. Immunfärbung zur Analyse der Expression auf Einzelzellebene.* Fixierte, permeabilisierte HNSC.100-Zellen wurden mit einem GFAP-spezifischen Erst-AK und einem Cy3-gekoppelten Zweit-AK angefärbt. Scale bars: 20 µm. *D. FACS-Analyse.* Die HNSC.100-Populationen wurden fixiert, permeabilisiert and mit einem GFAP-spezifischen Erst-AK und einem Cy3-gekoppelten Zweit-AK gefärbt. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Zweit-AK behandelt (gestrichelte Linie). Links dargestellt sind die FACS-Histogramme sowohl der Progenitor- als auch der Astrozytenpopulation mit ihrer jeweiligen Negativ-Kontrolle und rechts beide Populationen gleichzeitig in einem FACS-Histogramm.



In der Astrozytenpopulation konnte also zusätzlich zur Produktion des astrozytenspezifischen Intermediärfilaments GFAP auch die Produktion des Intermediärfilaments Nestin nachgewiesen werden. Es wurde nun untersucht, ob verschiedene Subpopulationen vorhanden sind, die entweder nur Nestin oder nur GFAP produzieren oder ob die Zellen der Astrozytenpopulation gleichzeitig GFAP und Nestin produzieren. Die Zellpopulationen wurden mit Antikörpern sowohl gegen das Antigen Nestin als auch gegen das Antigen GFAP gefärbt (Abb. 3.3). Als Kontrolle wurden die Progenitorpopulation untersucht, die sich auch in der Köfärbung nur Nestin-positiv zeigte. So konnte nachgewiesen werden, dass Zellen der Astrozytenpopulation GFAP und Nestin koexprimierten (gelbe/hellgrüne Überlagerung).

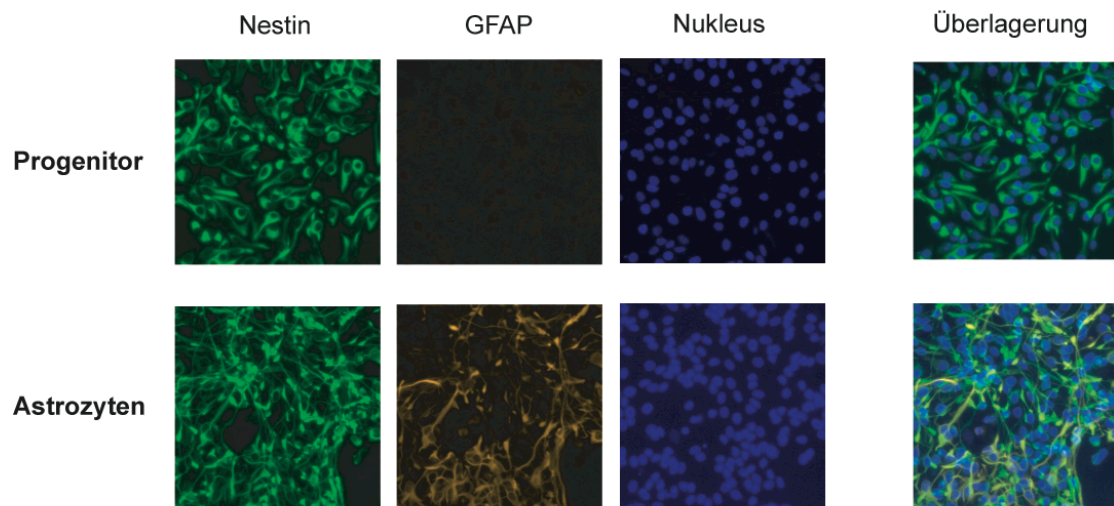


Abbildung 3.3 Analyse der Koexpression von GFAP (orange) und Nestin (grün) in der Progenitor- und Astrozytenpopulation. Während die Progenitorpopulation nur Nestin produzierte, exprimierten die Zellen der Astrozytenpopulation gleichzeitig GFAP und Nestin (gelbe/hellgrüne Überlagerung).

Die fixierten HNSC.100-Populationen wurden zuerst mit einem Nestin-spezifischen Erst-AK (Chemikon) und einem Alexa488-gekoppelten Zweitantikörper (α -Maus) behandelt (links). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem GFAP-spezifischen Erst-AK und dem Alexa 568-gekoppelten Zweit-AK (α -Kaninchen) (Mitte). Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 (blau) angefärbt (rechts). Die Überlagerung der drei Fluoreszenzen wurde rechts dargestellt.

Neben Nestin und GFAP erfolgte die Analyse weiterer zellspezifischer Marker. Auf RNA-Ebene wurden die Expression von Sox1, einem weiteren Marker für neurale Vorläuferzellen, und die Expression der beiden Astrozytenmarkern AQP4 und S100 β untersucht (Abb. 3.4a). Die errechneten vergleichenden Expressionslevel sind in Abbildung 3.4b dargestellt. Sox1-RNA konnte in beiden Populationen nachgewiesen werden. Das errechnete vergleichende Expressionslevel zeigte eine Induktion um den Faktor 1,5 an. Das bedeutet, dass beide Zellpopulationen ein identisches Level an Sox1-RNA exprimierten.

In der Progenitorpopulation konnte keine RNA-Transkripte für AQP4 und S100 β detektiert werden. Nach Differenzierung konnte in der Astrozytenpopulation sowohl eine Steigerung an AQP4-Transkripten (berechnetes vergleichendes Expressionslevel der Astrozytenpopulation zur Progenitorpopulation: 122-fach) als auch an S100 β -Transkripten (5-fach) festgestellt werden.

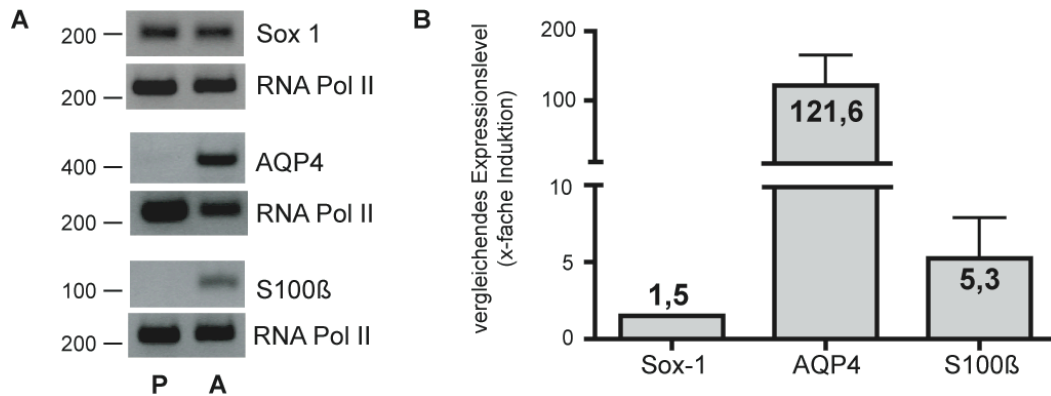


Abbildung 3.4. Analyse der Expression von Sox1, AQP4 und S100β in der Progenitor (P)- und Astrozytenpopulation (A). Beide HNSC.100-Populationen exprimierten Sox1. Die Astrozytenpopulation zeigte erhöhte Expression von AQP4 und S100β.

A. RT-Analysen. RNA aus beiden HNSC.100-Populationen wurde in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern untersucht. RPII diente als Kontrolle, um den Einsatz gleicher cDNA-Mengen sicherzustellen. Sox1 199bp, AQP4 429 bp, S100β 108bp, RPII 266bp. **B. Relative Quantifizierung der RNA-Mengen im Light Cycler.** Dargestellt ist das berechnete vergleichende Expressionslevel der Astrozytenpopulation zur Progenitorpopulation.

Die Produktion des Markers Vimentin wurde im Western Blot untersucht. Sowohl die Progenitorpopulation als auch die Astrozytenpopulation synthetisierten Vimentin (Daten nicht gezeigt). Weiter wurden die Produktion des Oligodendrozytenmarkers CNPase und der Neuronenmarker β-Tubulin III und Synapsin im Western Blot untersucht. Alle drei Zellmarker konnten weder in der Progenitor- noch der Astrozytenpopulation detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse der Markeruntersuchungen folgendermaßen zusammenfassen (siehe auch Tab. 3.1):

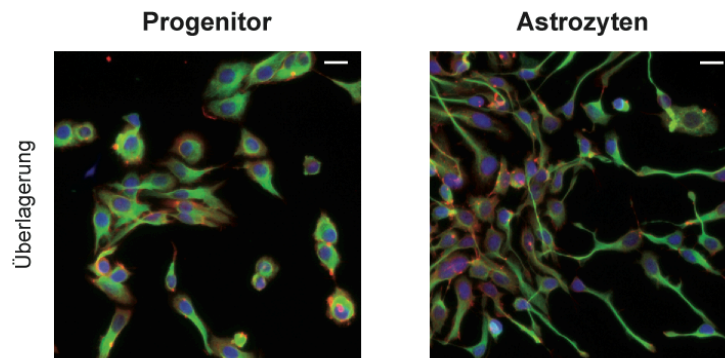
- in beiden Zellpopulationen Expression von Nestin, Vimentin und Sox1;
- in der Astrozytenpopulation Expression von GFAP, AQP4 und S100β;
- in beiden Zellpopulationen keine Expression von CNPase, β-Tubulin III und Synapsin.

Tabelle 3.1 (nächste Seite) Zusammenfassung über die untersuchten Marker und ihre Expression in der Progenitor- und Astrozytenpopulation. RT: RT-PCR-Analysen, WB: Western Blot-Analysen, FACS: FACS-Analysen spezifisch gefärbter Zellen, *mediane Fluoreszenzintensität/Prozentsatz positiver Zellen in Population, ICC: Immunzytochemie, LC: Light Cycler-Analysen. nd: nicht untersucht. +: nachgewiesen, -: nicht nachgewiesen, +/-: teilweise nachgewiesen.

Zellmarker	Progenitorpopulation				Astrozytenpopulation				vergleichendes RNA- Expressionslevel LC
	RT	WB	FACS*	ICC	RT	WB	FACS*	ICC	
Nestin	+	+	19/92%	+	+	+	27/90%	+	2,7-fach
Sox1	+	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	1,5-fach
Vimentin	nd	+	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd
GFAP	-	+/-	11/15%	+/-	+	+	25/94%	+	4400-fach
S100 β	-	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	5-fach
Aquaporin 4	-	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	122-fach
CNPase	nd	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd
β Tubulin III	nd	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd
Synapsin	nd	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd

3.1.2 Analyse der Zellmorphologie

Ein weiteres Merkmal, das sich bei der Differenzierung der Progenitorzellen in Astrozyten veränderte, ist die Morphologie. Während die Progenitorpopulation überwiegend eine unipolare, ovale Zellform aufwies, besaßen die Zellen der Astrozytenpopulation eine lang gestreckte Morphologie mit einen bis mehreren Zellausläufern (Abb. 3.5). Einige Zellen zeigten auch, die für Astrozyten beschriebene, typische sternförmige Morphologie. Diese Veränderungen der Morphologie konnten leicht mit dem Auge im Mikroskop beobachtet werden, aber die Veränderungen der heterogenen Zellpopulationen statistisch miteinander zu vergleichen und auszuwerten, stellte lange Zeit ein Problem dar. Mit der Entwicklung von automatischen Hochdurchsatz-Bildauswertungs-Verfahren wurde dieses Problem gelöst. Die Analyse der Fluoreszenzaufnahmen der Progenitor- und der Astrozytenpopulation erfolgte durch die Software "Morphology Analyst" (Cellomics). Das Programm erkennt automatisch angefärbte Zellstrukturen und misst verschiedenste morphologische Parameter. Folgende Zellstrukturen wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt: der Zellkern, und die beiden Zytoskelettproteine Tubulin und F-Aktin (Abb. 3.5). Aufgrund der Heterogenität der Zellpopulationen wurden mindestens 400 Zellen pro Population ausgewertet.



Zellkern: Hoechst 33342

Tubulin: anti-Tubulin-Antikörper, Alexa 488-konjugierter Zweitantikörper

F-Aktin: Rhodamin-konjugiertes Phalloidin

Abbildung 3.5 (nächste Seite) Morphologische Eigenschaften der Progenitor- und Astrozytenpopulation. Während die Progenitorzellen eine ovale Zellform ausweisen, besitzen die Zellen der Astrozytenpopulation lange Zellausläufer.

In fixierten HNSC.100-Zellen wurden folgende Zellstrukturen angefärbt: der Zellkern (blau, Hoechst 33342) und die Zytoskelettproteine Tubulin (grün, Alexa488) und Aktin (rot, Rhodamin). Dargestellt sind Überlagerungen der drei Fluoreszenzbilder. Scale bars: 20 μ m.

So konnten Zellparameter gefunden werden, welche sich in der neuronalen Progenitor- und der Astrozytenpopulation unterscheiden und so das Vorkommen von Zellen mit unterschiedlicher Morphologie in der Zellpopulation statistisch auswerten. Exemplarisch wurden zwei Parameter herausgesucht, welche die Veränderung der Zellmorphologie bei Differenzierung verdeutlichen: die Fläche des Zellkörpers und die Fläche der Zellausläufer (Abb. 3.6). Der mediane Wert der Zellkörperfläche in der Progenitorzellpopulation war 865 (willkürliche Einheit), während die Astrozytenpopulation nur einen medianen Wert von 302 zeigte. Die Medianwerte für die Fläche der Zellausläufer waren wie folgt: Progenitorpopulation 66 und Astrozytenpopulation 195. Mit der Differenzierung der Progenitorzellen zu Astrozyten nahm also im Durchschnitt die Fläche der Zellkörper ab, während die Fläche der Zellausläufer zunahm.

Die statistische Auswertung ergab, dass die beiden morphologischen Parameter der beiden HNSC.100-Zellpopulationen signifikant unterschiedlich waren ($p < 0,0001$) (Abb. 3.6).

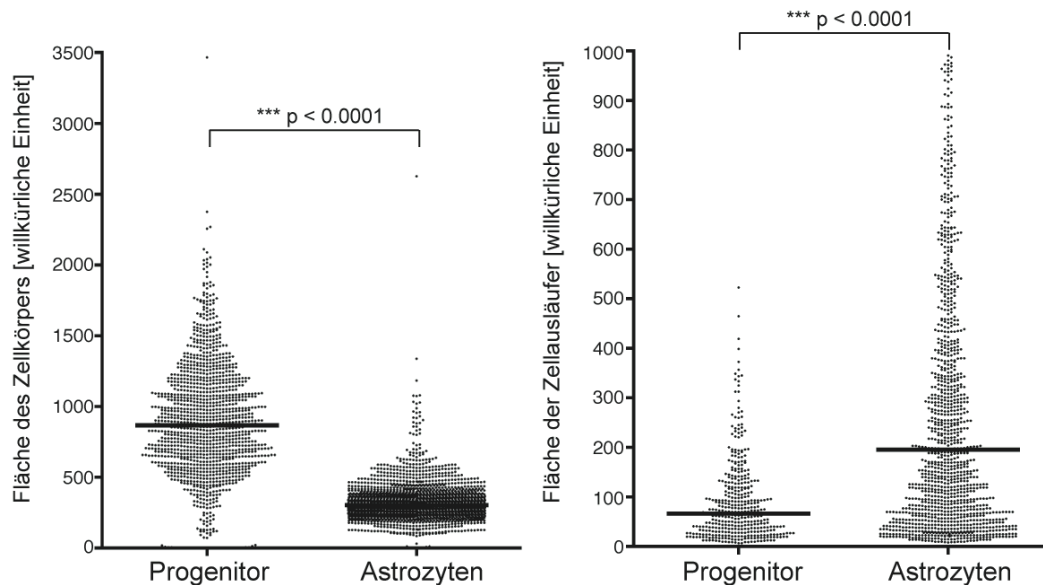


Abbildung 3.6 Quantitative Analyse der morphologischen Eigenschaften der Progenitor- und Astrozytenpopulation. Während die Zellen der Progenitorpopulation im Durchschnitt eine größere Zellkörperfläche aufwiesen, besaßen die Zellen der Astrozytenpopulation im Mittel eine größere Zellausläuferfläche.

Mit Hilfe der Software "Morphology Analyst" wurden die Fläche des Zellkörpers (links) und die Fläche der Zellausläufer (rechts) beider Zellpopulationen bestimmt (willkürliche Einheit). Die Abbildung zeigt die einzelnen quantifizierten Zellen ($n > 400$) und den Median einer Population (schwarze horizontale Linie). Die statistische Auswertung (Mann-Whitney Test) zeigte, dass die Ergebnisse signifikant unterschiedlich waren ($p < 0,0001$).

3.1.3 Analyse des Proliferationsverhaltens

Ein Kennzeichen von undifferenzierten Progenitorzellen ist die Fähigkeit, sich selbst durch mitotische Zellteilung zu erneuern. Der Entzug von Wachstumsfaktoren bewirkt ein Umschalten der intrazellulären Signalkaskaden von Proliferation zur Differenzierung. Es wurde untersucht, ob mit Beginn der Astrozytendifferenzierung die Proliferation der HNSC.100-Zellen abnimmt.

Das Proliferationsverhalten wurde mittels einer CFSE-Färbung untersucht. CFSE-gefärbte neurale Progenitorzellen wurden aufgeteilt und entweder weiter in Proliferationsmedium kultiviert oder in Astrozytendifferenzierungsmedium differenziert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach Beginn der Kultivierung in Astrozytendifferenzierungsmedium (Zeitpunkt 0) wurden die CFSE-gefärbten Zellen fixiert und im FACS analysiert. Abbildung 3.7a zeigt die Histogramm-Blots der Progenitorpopulation bzw. der Astrozytenpopulation zu den verschiedenen Zeitpunkten. Um die Abnahme der Fluoreszenz leicht beobachten zu können, wurde die CFSE-gefärbte Ausgangsprogenitorpopulation (schwarz) immer mit dargestellt.

Der Median der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0 wurde auf 100% gesetzt, und die Mediane der späteren Zeitpunkte darauf bezogen (Abb. 3.7b). In der Population, die weiter in Proliferationsmedium kultiviert wurde, sank die Fluoreszenzintensität nach 3 Tage auf 10,2%, nach 6 bzw. 8 Tagen konnte praktisch keine Fluoreszenz mehr nachgewiesen werden (0,8% bzw. 0,5%). In der differenzierenden Population sank die Intensität der Fluoreszenz nach 3 Tagen auf 19,6%. Nach 6 Tagen lag der Median der Fluoreszenzintensität bei 7,9% und nach 8 Tagen bei 5,4%. Die Population in Astrozytendifferenzierungsmedium teilte sich also nicht so häufig. Dieser Versuch zeigte die Verlangsamung der Proliferation während der Differenzierung der neuralen Progenitorzellen zu Astrozyten.

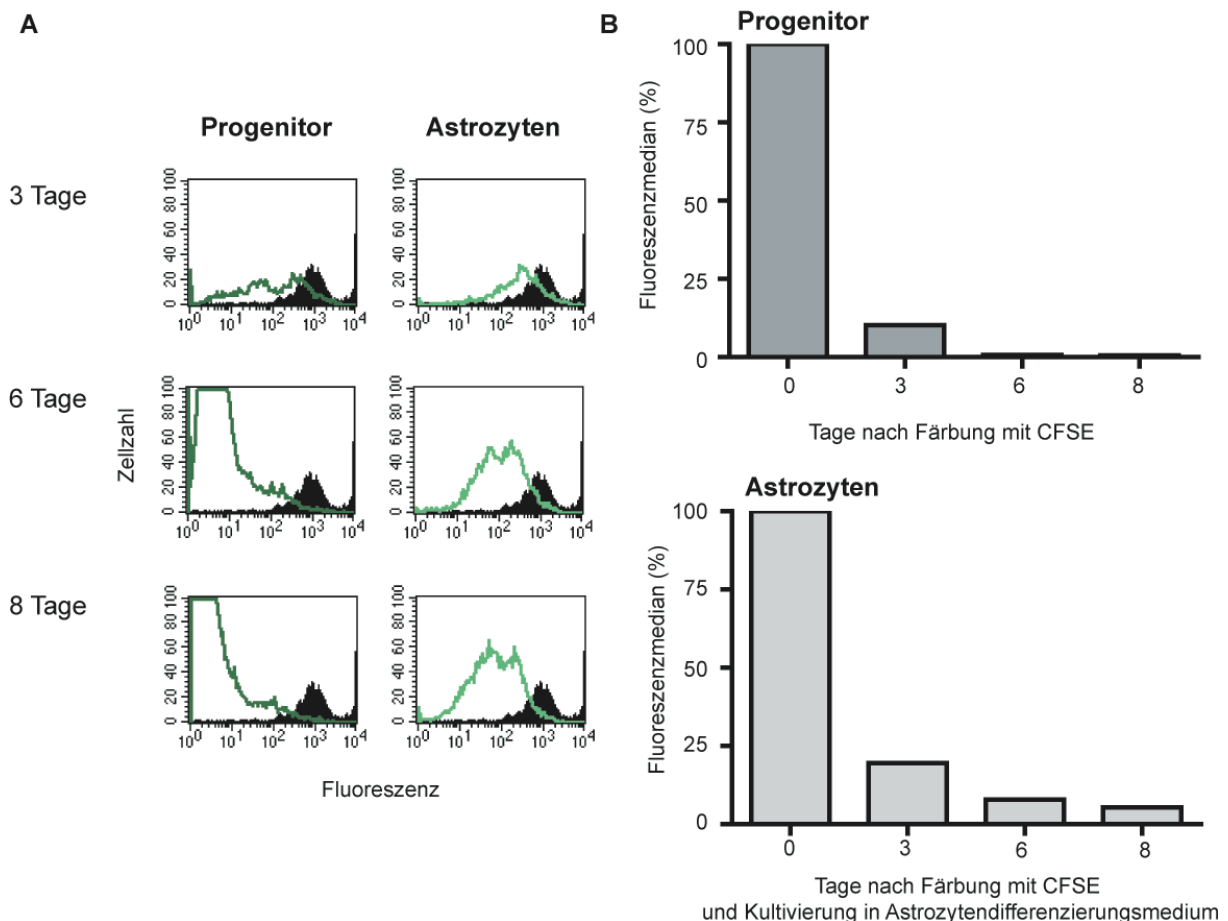


Abbildung 3.7 Proliferationsverhalten der Progenitor- und Astrozytenpopulation. Mit Beginn der Astrozytendifferenzierung nahm die Proliferation der HNSC.100-Zellen ab.

A. FACS-Histogramme der CFSE-gefärbten Progenitorzellen nach 3, 6 und 8 Tagen in Proliferations- bzw. Astrozytendifferenzierungsmedium. Die schwarze Population stellt die gefärbte Zellpopulation zum Zeitpunkt 0 dar. B. Abnahme der medianen Fluoreszenzintensität der CFSE-gefärbten Zellen. Die mediane Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0 wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt wurde der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.2 Differenzierungsabhängige Expression eines Reportergens

In die Progenitorzelllinie HNSC.100 sollte ein externer Marker unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors eingebracht werden, mit dessen Hilfe die Differenzierung der Zellen untersucht werden kann. Als Transgen wurde das Fluoreszenzprotein EGFP („*enhanced green fluorescent protein*“) gewählt, da dieses Protein in der lebenden Zelle beobachtet werden kann und eine quantitative Auswertung der Expression mittels FACS-Analyse möglich ist.

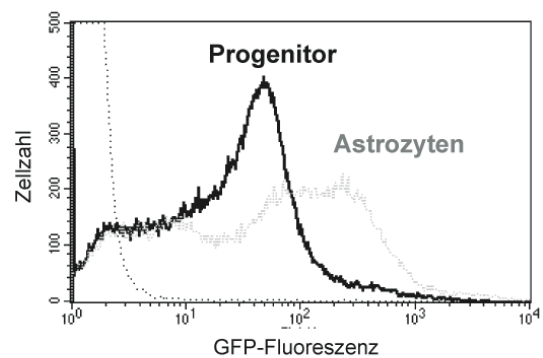
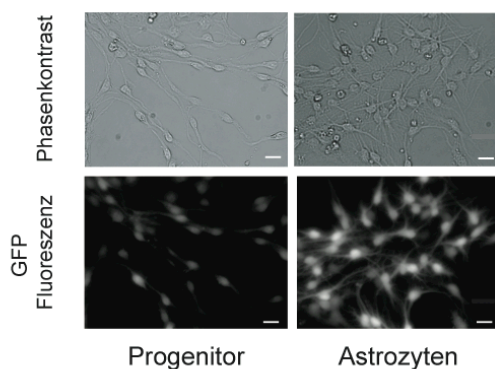
EGFP sollte in den Progenitorzellen unter der Kontrolle des humanen astrozytenspezifischen Gfa2-Promotors, den Promotor des GFAP-Gens, exprimiert werden. Der exogene Gfa2-Promotor verhält sich wie der endogene zelluläre GFAP-Promotor und wird bei Differenzierung zu Astrozyten aktiviert (Brenner et al., 1994; Messing and Brenner, 2003; Su et al., 2004). Die Aktivität des Gfa-2 Promotors und dadurch die Expression des Reportergens sollte somit differenzierungsabhängig modulierbar sein.

In einem ersten Ansatz wurde über stabile Transfektion eine stabile Reporterzellpopulation generiert (siehe Methodenteil) (Abb. 3.8). Die so etablierte Zellpopulation HNSC.pGfa2-EGFP zeigte (verglichen mit der Ausgangszelllinie HNSC.100) eine erhöhte endogene Expression von GFAP und enthielt viele Zellen mit einer auffälligen Zellmorphologie (Daten nicht gezeigt).

Deshalb wurde zur Etablierung einer stabilen Reporterzellpopulation als weitere Methode die Transduktion mit retroviralen Vektoren gewählt. Durch die retrovirale Transduktion wird das Fremdgen stabil in das Zellgenom der Wirtszelle integriert und stabile Zellpopulationen können einfacher und schneller etabliert werden. Als retrovirales System wurde ein foamyvirales Vektorsystem verwendet. Foamy-Viren bieten gegenüber anderen Retroviren mehrere Vorteile wie ihre Apathogenität im Menschen, die große Verpackungskapazität, die es erlaubt den 2,2 kb großen Gfa2-Promotor verpacken zu können und die Tatsache, dass sie einen zweiten internen Promotor besitzen, der durch einen fremden Promotor ersetzt werden kann (Rethwilm, 2007). Mit Hilfe rekombinanter Foamyviren wurden HNSC.100-Zellen infiziert und anschließend im FACS auf GFP-positive Zellen gesortet, um eine stabil transduzierte Zellpopulation zu erhalten (siehe Methodenteil). Es konnte die Zellpopulation HNSC.FV.Gfa2-EGFP etabliert werden, welche das Reportergen EGFP unter der Kontrolle des astrozytenspezifischen Gfa2-Promotors exprimiert (siehe Abb. 3.8). Als Kontrolle wurde die Zellpopulation HNSC.FV.U3-EGFP etabliert,

welche das Reporter-gen EGFP unter der Kontrolle des konstitutiven SFFV-U3-Promotors (U3-Promotor-Region des *spleen focus forming virus*) exprimiert. Die Integration der gesamten Promotor-Gen-Kassetten in die genomische DNA der HNSC.100-Zellen konnte durch PCR-Analysen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

HNSC.pGfa2-EGFP



HNSC.FV.Gfa2-EGFP

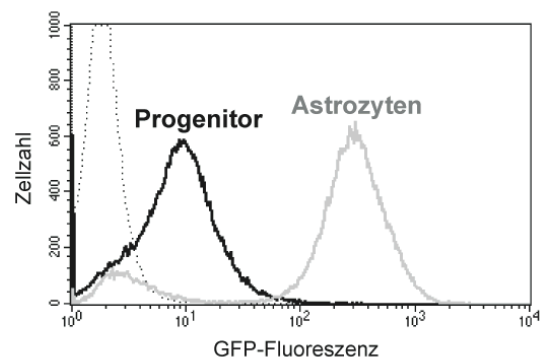
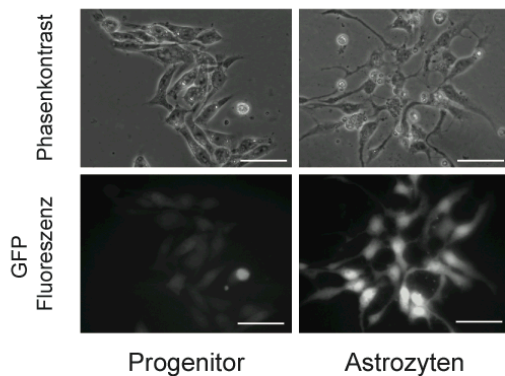


Abbildung 3.8 Astrozytenspezifische Expression des Reportergens EGFP. In den beiden Zellpopulationen HNSC.pGfa2-EGFP und HNSC.FV.Gfa2-EGFP steht die Expression des EGFP-Gens unter der Kontrolle des astrozytenspezifischen Gfa2-Promotors. Nach Kultivierung in Astrozytendifferenzierungsmedium stieg in diesen Zellpopulationen die EGFP-Produktion an. Die Zellpopulation HNSC.pGfa2-EGFP wurde über Transfektion und Selektion etabliert, während die Zellpopulation HNSC.FV.Gfa2-EGFP durch foamyvirale Transduktion entstand. Rechts dargestellt sind Phasenkontrast- und Fluoreszenzbilder der Zellpopulationen. Scale bars: 10 μ m. Um die Fluoreszenzaufnahmen einer Zellpopulation vergleichen zu können, wurden für die Aufnahmen identische Belichtungszeiten verwendet. Rechts befinden sich beispielhaft FACS-Histogramme. Es wurde jeweils sowohl die Progenitor- (schwarz) als auch die Astrozytenpopulation (grau) im FACS untersucht. Nicht-fluoreszierende parentale HNSC.100-Zellen wurden zur Kontrolle mitanalysiert (gestrichelte Linie).

Die Expression von EGFP in den beiden Zellpopulationen HNSC.pGfa2-EGFP und HNSC.FV.Gfa2-EGFP in Abhängigkeit von der Differenzierung der Zellen wurde analysiert. Parallel wurden als Kontrolle die Zellpopulation HNSC.FV.U3-EGFP untersucht, die, wie auch erwartet, keine differenzierungsabhängige Expression von EGFP zeigte (siehe Abb. 3.9). Kultivierte man die Zellen der beiden Zellpopulationen HNSC.pGfa2-EGFP und HNSC.FV.Gfa2-EGFP für eine Woche in Astrozytdifferenzierungsmedium, zeigten die Zellen eine erhöhte Expression von EGFP verglichen mit den Progenitorzellen (siehe Abb. 3.9).

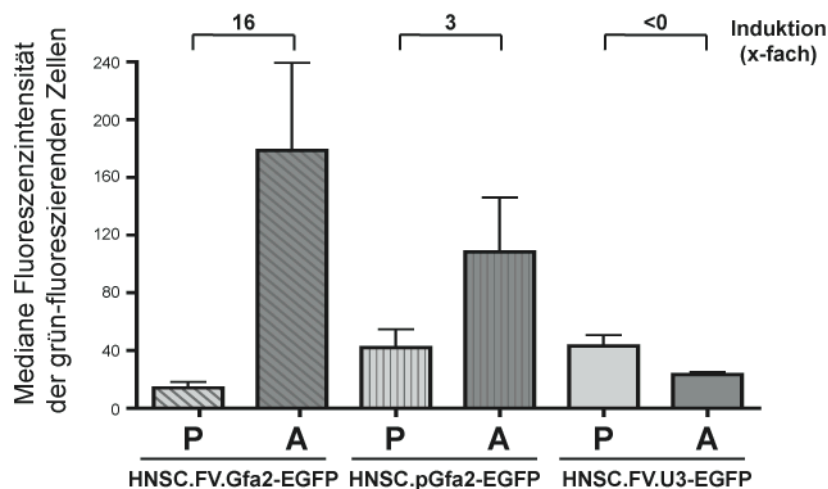


Abbildung 3.9 Quantitative Auswertung der Induktion der EGFP Produktion in den Reporterzellpopulationen. Die EGFP-Produktion lässt sich in der Zellpopulation HNSC.FV.Gfa2-EGFP höher durch Differenzierung in Astrozyten induzieren als in der Zellpopulation HNSC.pGfa2-EGFP. Die Zellpopulation HNSC.FV.U3-EGFP zeigte keine differenzierungsabhängige Induktion von EGFP. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Sowohl die Fluoreszenz der Progenitor- (P) als auch die Astrozytenpopulation (A) wurden quantitativ im FACS untersucht. Im Diagramm dargestellt ist die mediane Fluoreszenzintensität der grün-fluoreszierenden Zellen. Der Mittelwert der berechneten Induktionen der EGFP-Produktion wurde über den Balken angegeben.

Die EGFP-Expression in Abhängigkeit des Differenzierungsstatus wurde mittels FACS quantifiziert (Abb. 3.9). Für die Progenitor- und die Astrozytenpopulationen der Zellpopulationen ergaben sich folgende medianen Werte der Fluoreszenzintensitäten der grünen Zellpopulationen: HNSC.FV.Gfa2-EGFP P 14/ A 179, HNSC.pGfa2-EGFP P 42/A 108 und HNSC.FV.U3-EGFP P 43/A 24. Errechnet man aus diesen Werten die Induktion der Expression von EGFP durch die Differenzierung in Astrozyten zeigte sich, dass die Induktion in der Zellpopulation HNSC.FV.Gfa2-EGFP (16-fach) deutlich höher war als in der Zellpopulation HNSC.pGfa2-EGFP (3-fach) (Abb. 3.9).

In Western Blot-Analysen wurde die Koproduktion von endogenem GFAP und dem Gfa2-kontrollierten EGFP untersucht (Abb. 3.10). Es konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte EGFP-Produktion in der Zellpopulation HNSC.FV.Gfa2-EGFP mit einer gesteigerten Produktion von GFAP einhergeht. In der Zellpopulation HNSC.FV.U3-EGFP war in der Astrozytenpopulation auch eine gesteigerte Produktion von GFAP zu detektieren, die EGFP-Produktion blieb jedoch im Vergleich mit der Progenitorpopulation unverändert.

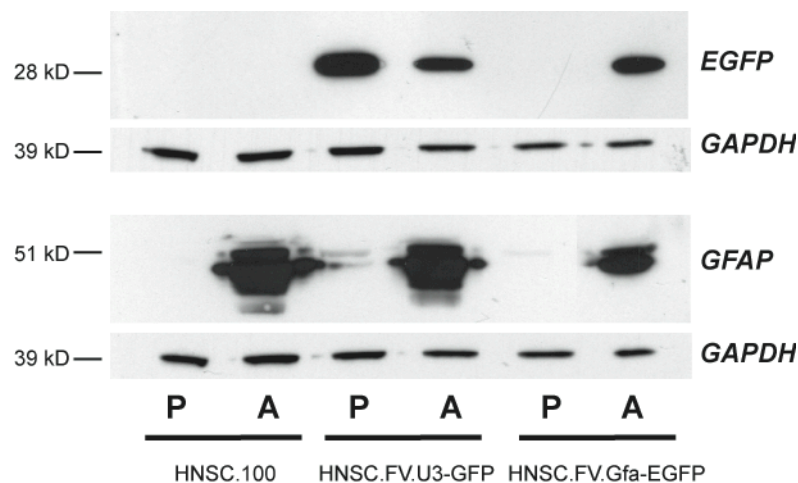


Abbildung 3.10 Analyse der Koproduktion von GFAP und EGFP. Bei allen drei Zellpopulationen produzierte die Astrozytenpopulation (A) deutlich mehr GFAP als die Progenitorpopulation (P). Die Zellpopulation HNSC.FV.Gfa2-EGFP (aber nicht die Zellpopulation HNSC.FV.U3-EGFP) produzierte nach der Differenzierung in Astrozyten deutlich mehr EGFP. Die Zelllinie HNSC.100 wurde zur Kontrolle mit analysiert. Gesamtzelllysate der drei Zellpopulationen wurde im Western Blot mit einem GFAP- und GFP-spezifischen AK untersucht. GAPDH wurde als Ladungskontrolle eingesetzt. GFP 30kD, GFAP 50kD, GAPDH 36kDa.

Die etablierte Reporterzellpopulation HNSC.FV.Gfa2-EGFP konnte verwendet werden, um das Differenzierungsverhalten der HNSC.100-Zellen zu untersuchen. So konnte nochmals gezeigt werden, dass die Zugabe von CNTF zum Medium ohne Wachstumsfaktoren die Differenzierung in Astrozyten steigert im Vergleich zur spontanen Differenzierung durch Wachstumsfaktorenentzug. Die Expression von EGFP wurde in den HNSC.FV.Gfa2-EGFP-Zellen durch Zugabe von CNTF weiter gesteigert (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich sollte eine Reporterzellpopulation mit einem neuronenspezifischen Promotor etabliert werden. Mittels foamyviraler Transduktion wurde der humane neuronale Synapsin-Promotor in die Zelllinie HNSC.100 eingebracht. Die Integration der gesamten Promotor-Gen-Kassette hSyn-EGFP in die genomische DNA konnte

wiederum in PCR-Analysen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Es konnte aber keine differenzierungsabhängige Regulation der EGFP-Produktion und somit des Synapsin-Promotors gezeigt werden. Die Expression des Reportergens EGFP blieb unter allen untersuchten Kultivierungsbedingungen unverändert, obwohl im Western Blot gezeigt werden konnte, dass eine Regulation der endogene Synapsinproduktion stattfand (Daten nicht gezeigt).

3.3 Rev-Lokalisation und -Aktivität

Für die verminderte HIV-Replikation in Astrozyten ist zumindest teilweise eine verminderte Funktionalität des viralen Regulationsfaktors Rev verantwortlich.

Um die HNSC.100-Populationen auch hinsichtlich ihrer spezifischen Eigenschaften in Bezug auf HIV zu charakterisieren, wurden die biologischen Eigenschaften von Rev in der neuralen Progenitorpopulation als auch in der differenzierten Astrozytenpopulation untersucht und mit Astrozytomzelllinien sowie nicht-glialen Kontrollzellen verglichen.

3.3.1 Rev-Lokalisation

In früheren Studien hatten Zellkultur-Experimente gezeigt, dass die intrazelluläre Verteilung von Rev in Astrozyten signifikant anders ist als in nicht-glialen Kontrollzellen: Rev lokalisiert in Astrozyten zu 50-70% im Zytoplasma, während es in HIV-permissiven Zellen nur zu 10% dort vertreten ist und überwiegend im Zellkern in den Nukleoli zu finden ist (Ludwig et al., 1999; Neumann et al., 2001).

Zur Bestimmung der intrazellulären Verteilung von Rev in den beiden HNSC.100-Populationen, der Astrozytomzelllinie U138MG und der Kontrollzelllinie Hela wurde die Lokalisation von GFP-gekoppeltem Rev-Fusionsprotein untersucht. Zur Kontrolle wurde die Verteilung von unfusioniertem GFP bestimmt. Die Verteilung des GFP-Signals wurde durch das Programm IPlab quantifiziert und der prozentuale Anteil der Kernfluoreszenz von der Gesamtfluoreszenz errechnet (siehe Methodenteil) (Neumann et al., 2001). Es zeigte sich aber, dass bei der verwendeten Auswertungsmethode bereits die Verteilung des unfusionierten Fluoreszenzproteins GFP nicht wie angenommen in allen Zelllinien gleichverteilt (d.h. 50% der Fluoreszenz im Kern, 50% im Zytoplasma) vorliegt, sondern abhängig von der Zellmorphologie der Zelle ist (Daten nicht gezeigt). Die untersuchten Zelllinien besitzen ein unterschiedliches Größenverhältnis von Zellkern zu Zytoplasma. Bei der

Quantifizierung der Lokalisation kommt es dadurch zu Fehlern, da zum Kernanteil auch die Fluoreszenzintensität des darüberliegenden Zytoplasmas gerechnet wird. Um trotz diesen Fehlers vergleichbare Aussagen über die Lokalisation von Rev in den verschiedenen Zelllinien treffen zu können, wurden neben GFP zwei weitere Proteine mit bekannter Verteilung in der Zelle als Referenzpunkte analysiert. Einmal eine Export-defiziente Mutante von Rev, die ausschließlich im Zellkern lokalisiert (pCsRevNES(A)₄) und zweitens eine Import-defiziente Mutante von Rev, die dementsprechend nur im Zytoplasma der Zelle zu finden ist (pCsRev Δ ARM).

Die korrigierten Ergebnisse der Quantifikation des nukleären Anteils der grünen Fluoreszenz des Fusionsprotein Rev-GFP sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Jeweils ein Fluoreszenzbild der Lokalisation von Rev-GFP in den verschiedenen Zelllinien ist repräsentativ gezeigt (Abb. 3.11).

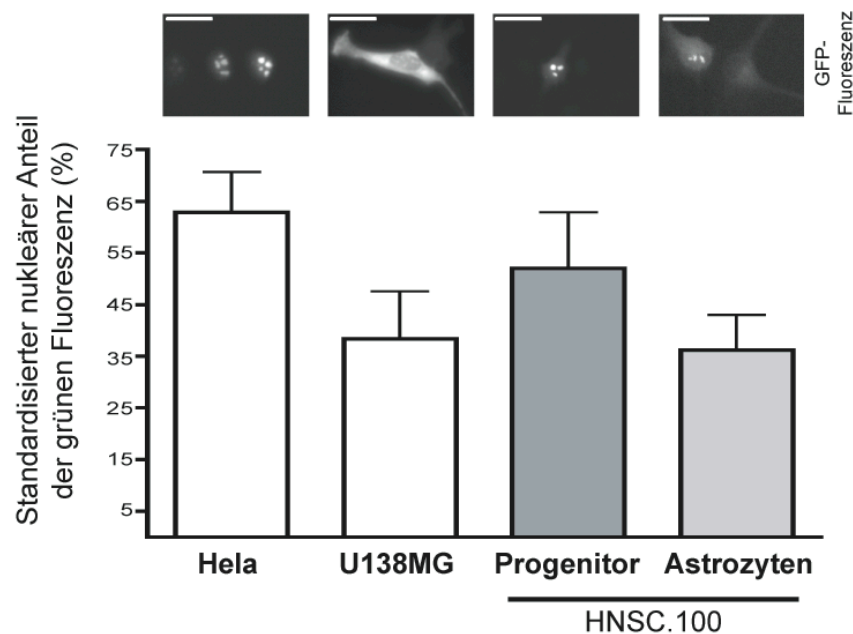


Abbildung 3.11 Lokalisation des regulatorischen HIV-Faktors Rev. Rev lokalisierte in der Progenitorpopulation ähnlich wie in HIV-permissiven HeLa-Zellen mehr im Kern der Zellen. Die Astrozytenpopulation zeigte die astrozytenspezifische Lokalisation von Rev im Zytoplasma, wie auch die Astrozytomzelllinie U138MG. Die Verteilung von Rev-GFP in den Zellen wurde quantifiziert (siehe Methodenteil) ($n > 15$). Um den Fehler durch die unterschiedlichen Zellmorphologien möglichst gering zu halten, wurde mit Hilfe von drei anderen Proteine mit bekannter Lokalisation die quantifizierten Werte von Rev-GFP korrigiert (siehe Methodenteil). Zusätzlich ist jeweils ein beispielhaftes Fluoreszenzbild von Rev-GFP gezeigt. Scale bars: 5 μ m.

In der HIV-permissiven Kontrollzelllinie HeLa lokalisierte Rev-GFP überwiegend im Zellkern (63% der Fluoreszenz im Zellkern). In der Astrozytomzelllinie U138MG konnte die bekannte Akkumulation von Rev-GFP im Zytoplasma von Astrozyten beobachtet werden, nur 38% der Fluoreszenz befand sich im Zellkern. Es zeigte

sich, dass Rev-GFP in den beiden HNSC.100-Populationen unterschiedlich lokalisierte. In der Progenitorpopulation lokalisierte Rev-GFP zu 52% im Zellkern, in der differenzierten Astrozytenpopulation jedoch war Rev-GFP überwiegend im Zytoplasma der Zellen zu finden (36% der Fluoreszenz im Zellkern). Während in der Progenitorpopulation Rev-GFP eher vergleichbar mit HIV-permissiven Zellen im Zellkern lokalisierte, konnte in der Astrozytenpopulation die für Astrozyten typische Lokalisation von Rev-GFP im Zytoplasma gezeigt werden.

3.3.2 Rev-Aktivität

Weiter konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass Rev in Astrozyten in seiner Aktivität stark gehemmt ist. Zur Charakterisierung der HNSC.100-Zellen wurde deshalb auch die Funktionalität von Rev in der neuralen Progenitorpopulation, in der Astrozytenpopulation und in den Astrozytomzelllinien U138MG, U251MG und 85HG66 untersucht.

Hierfür wurde ein Rev-abhängiges Expressionssystem des rot-fluoreszierenden Reporterproteins *DsRed* verwendet (siehe Methodenteil). Die Aktivität von Rev wurde in den verschiedenen Zelllinien bzw. Zellpopulationen mittels transienter Kotransfektionsexperimente untersucht. Als Negativkontrollen wurden parallel Ansätze mit nicht-funktionellen Rev-Mutanten bzw. ohne Rev durchgeführt. In Abbildung 3.12 ist die Induktion der Reporterexpression durch Zugabe von Rev in Vergleich zu Ansätzen ohne Rev bzw. mit Rev-Mutanten dargestellt.

Für die drei untersuchten Astrozytomzelllinien ergaben sich folgende Induktionen: U251MG 1,2-fach, U138MG 2,1-fach und 85HG66 1,7-fach. Rev war in diesen Zellen in seiner Aktivität gehemmt. In der Progenitorpopulation konnte durch Rev eine Induktion um den Faktor 25,3 erreicht werden, während in der Astrozytenpopulation nur eine Induktion um den Faktor 4,5 erreicht wurde. Es zeigte sich, dass Rev in der neuralen Progenitorpopulation aktiver war als in der Astrozytenpopulation, die eine vergleichbar geringe Aktivität von Rev zeigte wie die Astrozytomzelllinien U138MG, U251MG und 85HG66 (Abb. 3.12).

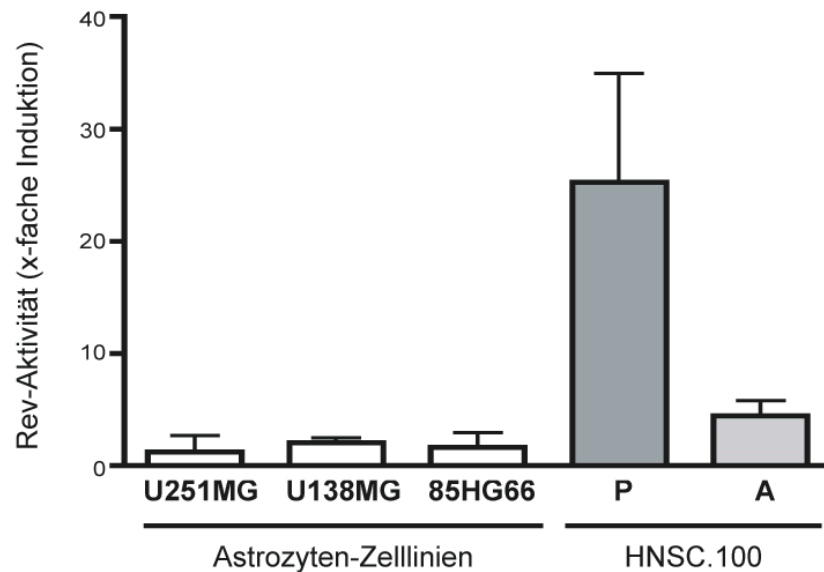


Abbildung 3.12 Aktivität des regulatorischen HIV-Faktors Rev. Rev war in der neuronalen Progenitorpopulation (P) aktiver als in der Astrozytenpopulation (A) und auch als in den Astrozytomzelllinien U251MG, U138MG und 85HG66. Gemessen wurde die Funktion mittels eines Rev-abhängigen Reportergens für das rot-fluoreszierende Reporterprotein *DsRed*, das im FACS quantifiziert wurde (genaue Durchführung siehe Methodenteil). Dargestellt ist die Induktion des Reportersystems, gemessen in mindestens drei unabhängigen Transfektionsexperimenten.

3.3.3 Analyse der Expression von zellulären Rev-interagierenden Faktoren

Es wird angenommen, dass für die Hemmung der Rev-Aktivität in Astrozyten spezifische, zelluläre Faktoren verantwortlich sind, welche mit Rev interagieren. In der Literatur sind zwei Proteine beschrieben, die bekanntermaßen einen Einfluss auf die Funktionalität von Rev in Astrozyten haben, zum einen der Faktor Sam68 („68kDa-Scr-associated protein in mitosis“) (Li et al., 2002) zum anderen die RNA Helikase DDX1 (DEAD Box Protein) (Fang et al., 2005). Sam68 wird in Astrozyten bzw. HIV-infizierten Astrozyten wahrscheinlich geringer als in HIV-permissiven Zellen exprimiert. DDX1 lokalisiert in Astrozyten wie auch Rev vermehrt im Zytoplasma.

Da in den beiden HNSC.100-Zellpopulationen Unterschiede in der Funktion von Rev gefunden werden konnten, wurde mittels Western Blot-Analyse die Expression dieser Faktoren untersucht (Abb. 3.13). Parallel dazu wurde als Kontrolle für weitere Astrozyten die GFAP-positive Astrozytomzelllinie U251MG untersucht. Die standardisierten Expressionswerte von DDX1 und Sam68 wurden in Diagrammen dargestellt (Abb. 3.13).

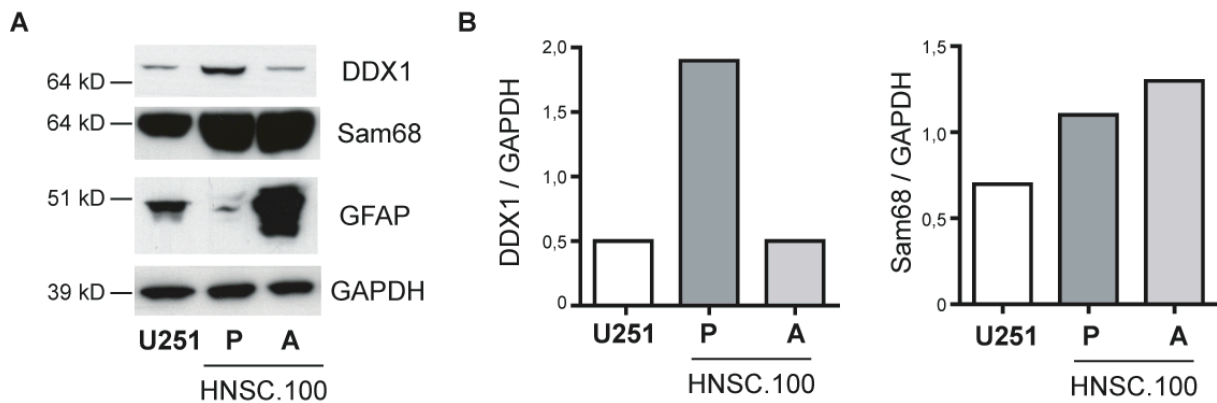


Abbildung 3.13 Produktion Rev-interagierender Faktoren in der Progenitor- (P) und in der Astrozytenpopulation (A). Die Progenitorpopulation exprimiert mehr DDX1 als die Astrozytenpopulation und als die Astrozytomzelllinie U251MG.

A. *Western Blot-Analyse.* Gesamtzelllysate der Astrozytenzelllinie U251MG, der Progenitor- und der Astrozytenpopulation wurden mittels spezifischer Antikörper untersucht. Die GAPDH-Produktion wurde als Ladungskontrolle analysiert. DDX1 82kD, Sam68 68kD, GFAP 50kD, GAPDH 36kD.

B. *Quantitative Auswertung des Western Blots mittels Image J.* Dargestellt ist die Produktion von DDX1 und Sam68 normalisiert auf die Produktion von GAPDH.

In der differenzierten Astrozytenpopulation (0,5) war, verglichen mit der Progenitorpopulation (1,9), die Produktion von DDX1 herunterreguliert. Auch die U251MG-Zellen zeigten eine geringere Produktion (0,5) von DDX1 als die Progenitorpopulation. Bei der Synthese von Sam68 konnte kein entscheidender Unterschied zwischen der Progenitor- (1,1) und der Astrozytenpopulation (1,3) festgestellt werden. Die Zelllinie U251 MG (0,7) produzierte etwas geringere Mengen an Sam68.

Die Astrozytenpopulation zeigte somit, verglichen mit der Progenitorpopulation, eine geringere Produktion des Rev-interagierenden Faktors DDX1.

3.4 Neuronale Differenzierung der Zelllinie HNSC.100

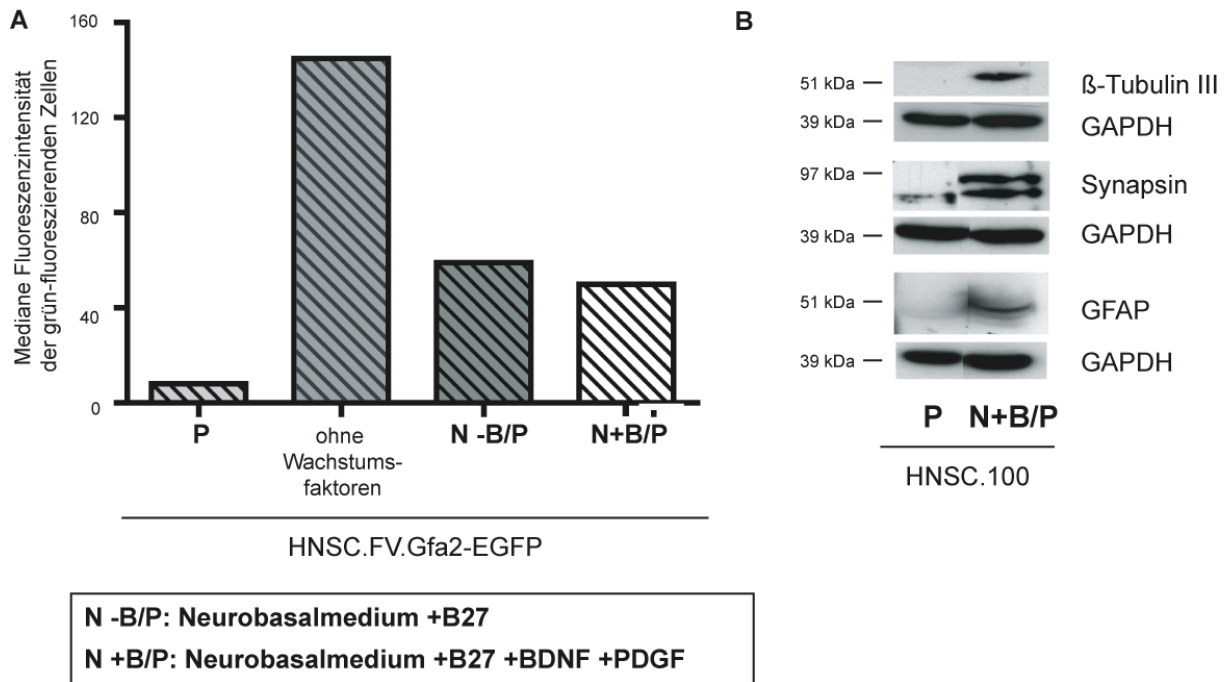
Neben der gezielten Differenzierung in Astrozyten sollten auch Kulturbedingungen gefunden werden, welche eine gezieltere Differenzierung in Neuronen fördern. Verschiedene Zellkulturreagenzien, welche für die Kultivierung von Neuronen optimiert sind, wurden eingesetzt, um einen erhöhten Anteil an Neuronen bei Differenzierung zu erhalten: das Neurobasalmedium der Firma Invitrogen und die Hormonmischung B27 (Ni et al., 2004; Peng et al., 2004).

Der Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf das Differenzierungsverhalten der Progenitorpopulation wurde mit Hilfe der Reporterzellpopulation HNSC.FV.Gfa2-EGFP untersucht. Die Neuronendifferenzierung wurde demnach erst einmal indirekt untersucht. Eine erhöhte Differenzierung in Neuronen, verglichen mit der Kultivierung

der Zellen in Medium ohne Wachstumsfaktoren, sollte zu einer geringeren Induktion des astrozytenspezifischen Gfa2-Promotors und zu einer geringeren EGFP-Expression führen. Die medianen Fluoreszenzintensitäten der grün-fluoreszierenden Zellpopulationen sind in Abbildung 3.14a dargestellt. Die Progenitorpopulation besaß einen Median von 8, während die Population, die in Medium ohne Mitogene differenziert wurde, einen Median von 145 besaß. Differenzierte man die HNSC.FV.Gfa2-EGFP-Zellen in Neurobasalmedium mit der Hormonmischung B27 zeigte die Population eine mediane Fluoreszenzintensität von 59. Bei Zugabe der beiden Zytokine BDNF und PDGF (Cheeran et al., 2005; Johe et al., 1996; Messam et al., 2003) zum Neurobasalmedium sank die mediane Fluoreszenzintensität weiter auf 50. Zusätzlich wurde auch der Prozentsatz an grün-fluoreszierenden Zellen bestimmt (Daten nicht gezeigt). Während in der Progenitorpopulation 44% der Zellen grüne Fluoreszenz zeigten, waren es nach Wegnahme der Mitogene 66%. Bei Kultivierung in Neurobasalmedium (+B27) waren 54% der Zellen grün, bei Zugabe von BDNF und PDGF sank der Anteil auf 40%. Zur Kontrolle wurden auch die Zellpopulation HNSC.FV.U3-EGFP, die konstitutiv EGFP exprimiert, getestet (Daten nicht gezeigt). Die unterschiedlichen Kulturbedingungen hatten keinen Einfluss auf die medianen Fluoreszenzintensitäten und die Prozentsätze an grünen Zellen.

Durch Kultivierung in Medium bestehend aus Neurobasalmedium, B27 und den Zytokinen BDNF und PDGF sank in der Zellpopulation HNSC.FV.Gfa2-EGFP der Anteil an Zellen, die zu Astrozyten differenzieren. Dieses Medium wird in den nachfolgenden Versuchen als Neuronendifferenzierungsmedium bezeichnet.

Abbildung 3.14 (nächste Seite) Untersuchung der neuronalen Differenzierung. Die Kultivierung der Progenitorzellen (P) in Neurobasalmedium mit B27, BDNF und PDGF (Neuronendifferenzierungsmedium, N+B/P) führte zu einer gesteigerten Differenzierung in Neuronen. A.FACS-Analyse der Reporterzellpopulation HNSC.FV.Gfa-EGFP. Es wurden sowohl die Progenitorpopulation (P) als auch Zellen nach Kultivierung in unterschiedlichen Differenzierungsmedien (ohne Wachstumsfaktoren) untersucht. Im Diagramm dargestellt ist die mediane Fluoreszenzintensität der grün-fluoreszierenden Zellen. B.Western Blot-Analysen. Gesamtzelllysate wurden mittels zelltyp-spezifischer AK untersucht. Die in Neuronendifferenzierungsmedium kultivierten HNSC.100-Zellen (N+B/P) produzierten die neuronalen Marker β -Tubulin III und Synapsin. Auch eine geringe Produktion von GFAP konnte detektiert werden. GAPDH diente als Ladungskontrolle. β -Tubulin III 50kD, Synapsin 77/80kD, GFAP 50kD, GAPDH 36kD.



In Western Blot-Analysen wurde anschließend die Produktion neuronenspezifischer Marker untersucht, um zu zeigen, dass durch die etablierten Kulturbedingungen tatsächlich Neuronen entstehen (Abb. 3.14b). Nach Kultivierung der HNSC.100-Progenitorpopulation in Neuronendifferenzierungsmedium (für zehn Tage) konnte sowohl die Expression von β -Tubulin III als auch von Synapsin in den Zellen nachgewiesen werden. Gleichzeitig fand auch eine geringe Expression des Astrozytenmarkers GFAP statt.

Die Kultivierung in Neuronendifferenzierungsmedium führte zu einer erhöhten Differenzierung in Neuronen, es konnte aber keine reine Neuronenpopulation etabliert werden. Um den Anteil an Neuronen in der Population zu bestimmen, sollten Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt werden. Mit den vorhandenen Neuronenspezifischen Antikörpern konnte aber keine spezifische Färbung der Zellen erreicht werden.

3.5 Analyse der Expression möglicher HIV-Rezeptoren

Ein wichtiger Punkt hinsichtlich der HIV-Infektion der beiden HNSC.100-Populationen ist die Produktion von Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die für die HIV-1-Infektion genutzt werden könnten, da HIV seine Zielzellen meist über einen Rezeptorvermittelten Mechanismus infiziert.

Die Progenitor- und die Astrozytenpopulation wurden mittels RT-PCR und FACS-Analyse auf die Expression und Produktion verschiedenster HIV-relevanter Oberflächen-Rezeptoren getestet. Neben den Rezeptoren, die üblicherweise von HIV verwendet werden, wurde eine Reihe von Chemokinrezeptoren untersucht, die bei einer CD4-unabhängigen Infektion eine Rolle spielen oder alternative Korezeptoren darstellen könnten und die weiter im Zusammenhang mit der HIV-Infektion des ZNS identifiziert wurden (Locati and Murphy, 1999; Mukhtar et al., 2002; Neil et al., 2005; Willey et al., 2003). In Tabelle 3.2 sind die untersuchten Rezeptoren zusammengefasst.

In der Progenitorpopulation konnte eine Expression von CXCR4-RNA nachgewiesen werden, während in der Astrozytenpopulation kein Produkt mit den CXCR4-spezifischen Primern entstand (Abb. 3.15a). Für alle anderen untersuchten Rezeptoren konnte keine Expression in der RT-PCR sowohl in der Progenitor- als auch Astrozytenpopulation detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zu den Untersuchungen auf RNA-Ebene wurden Oberflächenfärbungen der wichtigsten HIV-Rezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 mittels Fluoreszenzgekoppelter Antikörper durchgeführt und im FACS ausgewertet. Die Fluoreszenzhistogramme der Färbungen sind in Abbildung 3.15b dargestellt.

Auch hier konnte sowohl auf der Progenitorpopulation als auch auf der Astrozytenpopulationen keine Färbung der beiden Rezeptoren CD4 und CCR5 gezeigt werden (linkes und mittleres Histogramm). Beide HNSC.100-Populationen exprimierten jedoch CXCR4 auf ihrer Zelloberfläche (rechtes Histogramm). 60% der Progenitorzellen waren CXCR4-positiv, wogegen bei den Astrozyten nur 13% CXCR4-positiv waren. Beide Populationen besaßen unterschiedliche mediane Fluoreszenzintensitäten (korrigiert auf die Isotyp-Kontrolle): Die Progenitorpopulation zeigte eine mediane Intensität von 37, wogegen die Astrozyten eine Intensität von 22 aufwiesen. Die Progenitorpopulation wies somit eine höhere Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 auf der Oberfläche auf.

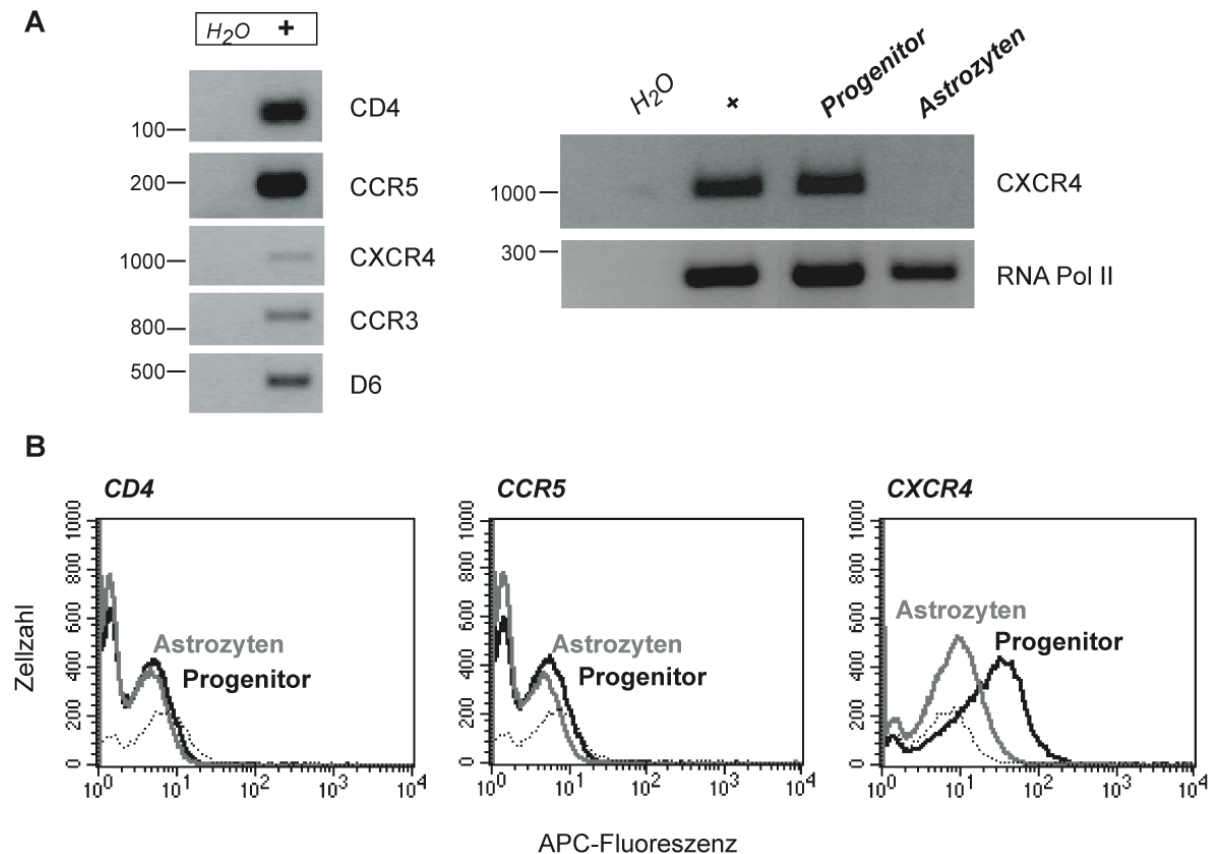


Abbildung 3.15 Expression der Oberflächenrezeptoren auf der Progenitor- und Astrozytenpopulation. Auf der Zelloberfläche der Astrozyten- und der Progenitorpopulation konnte CXCR4 nachgewiesen werden, während RNA für CXCR4 nur in der Progenitorpopulation detektiert werden konnte.

A. RT-PCR Analysen. RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern untersucht. Links sind die Positivkontrollen (+) dargestellt, welche zur Verfügung standen. Folgende Positivkontrollen wurden verwendet: für CD4 U87/CD4 Zellen, für CCR5 U87/CCR5-Zellen, für CXCR4 U87/CXCR4- und Hela-Zellen, für CCR3 U87/CCR3-Zellen und für D6 die U87/CD4-Zellen. Rechts ist der Nachweis der CXCR4 Expression in der Progenitor- und Astrozytenpopulation gezeigt. RPII diente als Kontrolle, um den Einsatz gleicher cDNA-Mengen sicherzustellen. CD4 170bp, CCR5 182bp, CXCR4 1044bp, CCR3 834bp, D6 447bp, RPII 266bp. **B. FACS-Analysen.** Dargestellt sind die FACS-Histogramme sowohl der Progenitor- (schwarz) als auch der Astrozytenpopulation (grau). Die HNSC.100-Populationen wurden fixiert und mit APC-gekoppelten AK gegen CD4, CCR5 und CXCR4 angefärbt. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit einer APC-gekoppelten Isotypkontrolle behandelt (gestrichelte Linie).

In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der Untersuchungen der Oberflächenrezeptoren zusammengestellt. Es wurde gezeigt, dass weder die Progenitor- noch die Astrozytenpopulation eine Synthese von CD4 und CCR5 zeigte. Während in der RT-PCR nur die Expression von CXCR4-mRNA in der Progenitorpopulation festgestellt wurde, konnte im FACS bei beiden Populationen eine Expression von CXCR4 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Die Astrozytenpopulation zeigte jedoch eine geringere Expression von CXCR4. Die Expression eines alternativen

Chemokinrezeptors konnte in keinem der beiden Zellpopulationen nachgewiesen werden.

Für die nachfolgenden Infektionsversuche wurde deshalb ein HIV-Stamm gewählt, der CXCR4 als Korezeptor verwendet.

Funktion	Rezeptoren	spielt Rolle bei der Infektion von...	Progenitor		Astrozyten	
			RT	FACS*	RT	FACS*
HIV-Hauptrezeptor	CD4	T-Zellen, Makrophagen	-	-	-	-
HIV-Korezeptor	CCR5	Makrophagen, Monozyten	-	-	-	-
HIV-Korezeptor	CXCR4	T-Zellen	+	37/60%	-	22/13%
	D6	Astrozyten	-	nd	-	nd
	L-SIGN	BMVECS	-	nd	-	nd
	DC-SIGN	BMVECS	-	nd	-	nd
	CCR3	möglicher alternativer Korezeptor	-	nd	-	nd
	CCR8	möglicher alternativer Korezeptor	-	nd	-	nd
	CXCR6	möglicher alternativer Korezeptor	-	nd	-	nd
	GPR1	möglicher alternativer Korezeptor	-	nd	-	nd
	GPR15	möglicher alternativer Korezeptor	-	nd	-	nd
	RDC1	möglicher alternativer Korezeptor	-	nd	-	nd

Tabelle 3.2 Übersicht über die untersuchten Oberflächen-Rezeptoren. Angegeben ist ihre Funktion bei der HIV Infektion und die Zellen, bei denen die Rezeptoren eine Rolle bei der Infektion spielen. Rechts wurden die Ergebnisse der Expressionsanalysen in der Progenitor- und Astrozytenpopulation zusammengefasst. RT: RT-PCR Analysen, FACS: FACS-Analysen von Oberflächenfärbungen, *mediane Fluoreszenzintensität/Prozentsatz positiver Zellen. nd: nicht untersucht. +: nachgewiesen, -: nicht nachgewiesen. Literaturzitate siehe Text.

3.6 Kurzzeit-Infektion der HNSC.100-Progenitorzellen und -Astrozyten

Für die HIV Infektionsversuche der HNSC.100-Populationen wurde der HIV-1 Stamm HIV-IIIB verwendet. Beim HIV-IIIB-Isolat handelt es sich um ein Gemisch aus mindestens 10 verschiedenen Patientenisolaten, die gemischt wurden, um ein hochinfektiöses Laborisolat zu erhalten. HIV-IIIB nutzt für die Infektion den Chemokinrezeptor CXCR4 und wurde schon zuvor verwendet, um die HIV-Infektion von Astrozyten und primären neuronalen Progenitorzellen zu untersuchen (Brack-Werner et al., 1992; Lawrence et al., 2004).

Sowohl die Progenitor- als auch die differenzierte Astrozytenpopulation (Differenzierungszeitraum zehn Tage) wurde mit HIV-1 infiziert und die Replikation von HIV in den beiden HNSC.100-Populationen indirekt durch Bestimmung der Gag (p24)-Werte im Zellkulturüberstand ermittelt (siehe Methodenteil). Nach der Infektion wurden die Zellen dreimal mit Trypsin behandelt, um anheftende nicht aufgenommene HIV-Partikel zu entfernen. Um die p24-Produktion der beiden

unterschiedlich proliferierenden Zellpopulationen miteinander vergleichen zu können, wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion die beiden Zellpopulationen in gleicher Zellkonzentration ausgesät und 24 Stunden später der Zellkulturüberstand genommen und im p24-ELISA die p24-Konzentration (in pg/ml) bestimmt. Die ermittelte p24-Produktion der beiden HNSC.100-Populationen ist graphisch in Abbildung 3.16 dargestellt.

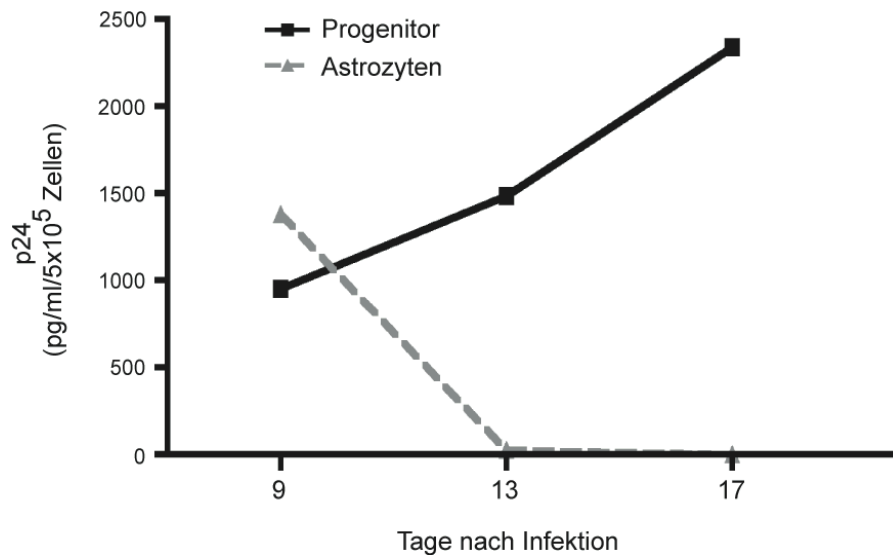


Abbildung 3.16 HIV Gag (p24)-Freisetzung der HIV-infizierten Progenitor- und Astrozytenpopulation. Die HIV-infizierte Progenitorpopulation produzierte bis zum Tag 17 nach Infektion HIV, während im Überstand der Astrozytenpopulation bereits nach 13 Tagen kein Virus mehr detektiert werden konnte.

Progenitorzellen und differenzierte Astrozyten wurden mittels zellfreiem Überstand der HIV-infizierten T-Lymphomzelllinie KE37/1-III B mit dem HIV-1 III B-Stamm infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (9, 13 und 17 Tage p.i.) wurden sowohl die Progenitorpopulation als auch die Astrozytenpopulation in gleicher Zellzahl (5×10^5) ausgesät, 24 h später der Zellkulturüberstand geerntet und die Gag (p24)-Konzentration im p24-ELISA bestimmt. Der Graph zeigt den Mittelwert von Doppelansätze.

Neun Tage nach der Infektion (p.i.) mit HIV-1 konnte im Zellkulturüberstand beider Populationen p24-Protein detektiert werden (Astrozyten 1383 pg/ml, Progenitorzellen 953 pg/ml). Dies zeigte die Infektion beider Zellpopulationen mit HIV. Am Tag 13 p.i. wurde bei der infizierten Progenitorpopulation 1486 pg/ml freigesetztes p24-Protein nachgewiesen, bei der infizierten Astrozytenpopulation nur noch 25 pg/ml. Die Astrozytenpopulation setzte 17 Tage p.i. kein p24-Gag-Protein mehr frei (0 pg/ml), während im Zellkulturüberstand der Progenitorpopulation noch 2339 pg/ml p24-Protein detektiert werden konnte.

Die Astrozytenpopulation produzierte bereits zwei Wochen nach der Infektion kaum mehr Viruspartikel, während die infizierte Progenitorpopulation auch nach 17 Tagen noch Produktion von exogenem Virus aufwies.

Da 17 Tagen p.i. die Astrozytenpopulation keine HIV-Partikel mehr produzierte, wurde überprüft, ob die Zellen 28 Tage p.i. noch HIV-infiziert waren. Dazu wurde aus beiden Zellpopulationen genomische DNA auf provirale HIV-DNA hin untersucht. Als Positivkontrolle wurden die stabil HIV-infizierten Zelllinien KE37/1-IIIB (T-Lymphomzelllinie) und TH4-7-5 (Astrozytomzelllinie) mitgeführt. In beiden HNSC.100-Zellpopulationen konnte 28 Tage p.i. mit dem HIV-spezifischen Primerpaar BSS-S/GAG-A (Bindungsstellen im HIV-Genom siehe Abb. 3.23) provirale HIV-DNA nachgewiesen werden (Abb. 3.17a). Verglichen mit den permanent HIV-infizierten Zelllinien konnten in der genomischen DNA der infizierten HNSC.100-Populationen wesentlich geringere Menge an proviraler HIV-DNA detektiert werden.

Um zu analysieren, ob die unterschiedlichen Virusproduktionen der beiden HNSC.100-Zellpopulationen möglicherweise durch unterschiedliche Infektionsraten zustande kommen, wurde die Anzahl an proviralen HIV-DNA-Kopien in beiden HNSC.100-Zellpopulationen quantitativ bestimmt (Abb. 3.17b). So konnte ermittelt werden, dass 28 Tage p.i. in 10^4 Zellen in der Progenitorpopulation 982 provirale HIV-Kopien und in der Astrozytenpopulation 1182 HIV-Kopien vorlagen. Beide Zellpopulationen zeigten demnach in etwa gleiche Infektionsraten.

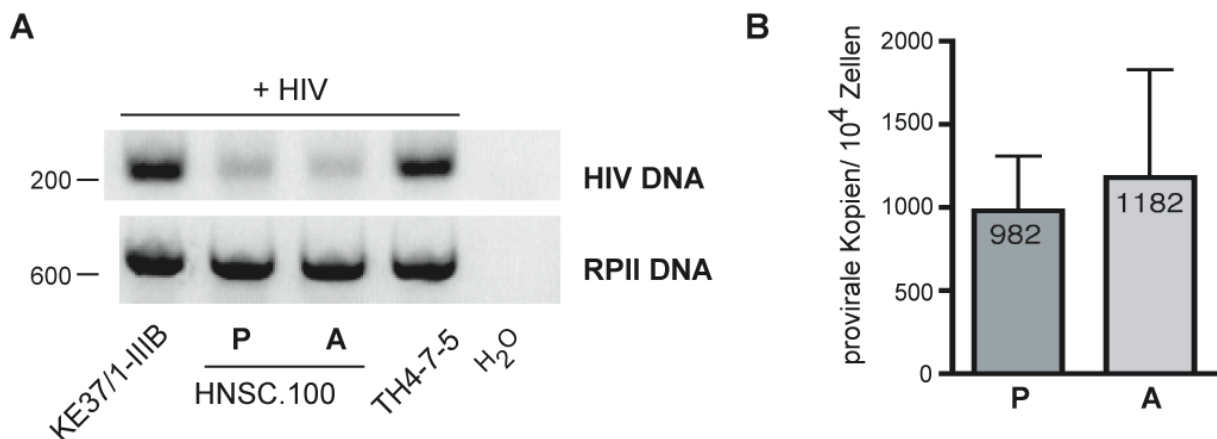


Abbildung 3.17 Nachweis proviraler HIV-1 DNA in der infizierten Progenitor- (P) und Astrozytenpopulation (A). In beiden Zellpopulationen konnte 28 Tage p.i. provirale DNA nachgewiesen werden, in 10^4 Zellen liesen sich etwa 1000 provirale Kopien detektieren.

A. PCR-Analyse. Genomische DNA wurde mittels der HIV-spezifischen Primer BSS-GAGA auf HIV DNA untersucht. DNA der persistent-infizierten Zelllinien KE37/1-IIIB und TH4-7-5 wurde als Positivkontrollen mitanalysiert. RPII-DNA diente als Kontrolle, dass etwa gleiche Mengen an genomischer DNA eingesetzt wurden. HIV-DNA 225bp, RPII-DNA 631bp. **B. Quantifizierung der proviralen HIV-1 DNA-Kopienzahlen durch Real-time PCR Analysen.** Die proviralen Kopien pro 10.000 Zellen wurden bestimmt. Die Balken zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Analysen.

In den nachfolgenden Analysen wurde nun die Langzeit-HIV-Infektion der infizierten Progenitorpopulation genauer untersucht. Alle weiteren Experimente wurden mit dieser Population durchgeführt.

3.7 Langzeit-Infektion der HNSC.100-Progenitorpopulation

Die Viruspartikelproduktion im Überstand der infizierten Progenitorpopulation wurde weiter über einen Zeitraum von vier Monaten beobachtet (Abb. 3.18, schwarze Linie). Bis etwa 70 Tage p.i. konnte eine geringe Virusproduktion der infizierten Progenitorpopulation festgestellt werden. Dabei nahm die Konzentration an freigesetzten p24-Protein stetig ab: 35 Tage p.i. 742 pg/ml, 43 Tage p.i. 716 pg/ml, 54 Tage p.i. 389 pg/ml und 68 Tage p.i. 149 pg/ml. Nach 132 Tagen konnten keine viralen Partikel mehr im Überstand der infizierten Progenitorpopulation detektiert werden (0 pg/ml).

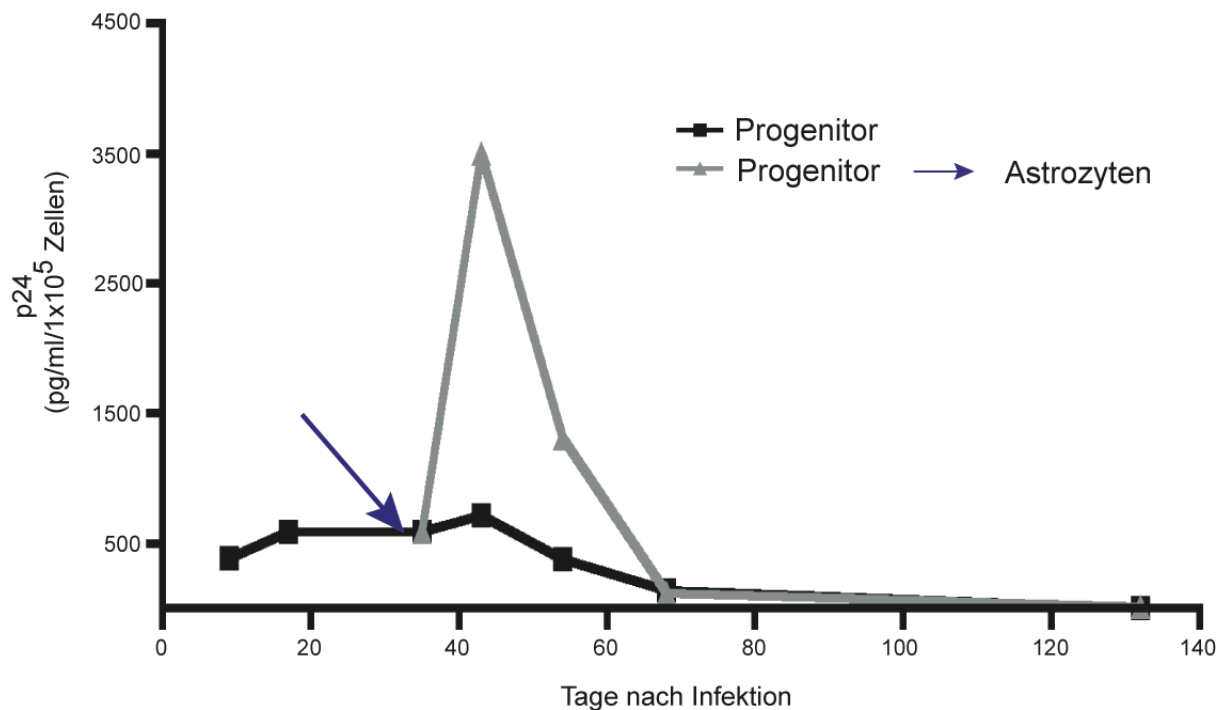


Abbildung 3.18 HIV Gag (p24)-Freisetzung der HIV-infizierten Progenitorpopulation. Die infizierte Progenitorpopulation zeigt bis 60 Tage p.i. eine messbare Virusproduktion. Die Differenzierung von einem Teil der infizierten Progenitorpopulation zu Astrozyten (siehe blauer Pfeil) führte zu einem vorübergehenden Anstieg in der Virusproduktion. Die Freisetzung von Virus in den Zellkulturüberstand wurde über einen Zeitraum von 132 Tagen p.i. mittels p24-ELISA untersucht. 35 Tage p.i. wurde ein Teil der infizierten Progenitorpopulation in Astrozytendifferenzierungsmedium weiterkultiviert (siehe Pfeil, graue Linie, Progenitor→Astrozyten). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die HNSC.100-Zellen (1×10^5 und 5×10^5) ausgesät und 24 h später der Zellkulturüberstand geerntet. Die p24-Konzentrationen wurden jeweils auf die Produktion von 1×10^5 Zellen umgerechnet. Der Graph zeigt den Mittelwert der Doppelansätze.

Es wurde wiederum eine Provirusquantifizierung durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Progenitorzellen nach der langen Zeitspanne noch infiziert waren. 96 Tage p.i. lagen pro 10^4 Zellen 622 provirale Kopien, 115 Tagen p.i. 514 proviralen Kopien vor (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, dass die neurale Progenitorpopulation weiter infiziert war, auch zu Zeitpunkten als keine Virusproduktion mehr stattfand.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die infizierte neurale Progenitorzellpopulation mit dem HI-Virus über einen sehr langen Zeitraum leben konnte und dabei relativ lange in der Lage war, Viruspartikel freizusetzen. HIV konnte in der neuralen Progenitorpopulation persistieren.

Um die Virusproduktion der neuralen Progenitorpopulation im Kontext anderer produktiv und auch restringiert infizierter Zellen einordnen zu können, wurden die p24-Produktion der chronisch infizierten T-Lymphozytenzelllinie KE37/1-IIIB und der chronisch infizierten Astrozytomzelllinie TH4-7-5 unter gleichen Bedingungen untersucht. Beide Zelllinien wurden zu 1×10^5 Zellen ausgesät und 24 Stunden später der Zellkulturüberstand geerntet. Folgende p24-Konzentrationen wurden ermittelt: KE37/1-IIIB 63270 pg/ml und TH4-7-5 80 pg/ml. Die infizierte Progenitorpopulation produzierte somit wesentlich weniger Virus als persistent infizierte T-Zellen, aber bis etwa 70 Tage nach Infektion mehr Virus als persistent infizierte Astrozyten.

3.8 Einfluss der Astrogenese auf die HIV-Infektion

35 Tage nach der HIV-Infektion wurde ein Teil der infizierten neuralen Progenitorzellen in Astrozytendifferenzierungsmedium weiterkultiviert, um den Einfluss der Astrogenese auf die HIV-Produktion zu untersuchen (siehe Abb. 3.18, blauer Pfeil). Parallel zur infizierten Progenitorpopulation, die weiter in Proliferationsmedium gehalten wurde (siehe vorheriger Abschnitt), wurde die p24-Produktion dieser Population bis zum Tag 132 p.i. analysiert.

Die Veränderung der Kulturbedingungen führte zu einer kurzzeitigen Erhöhung der HIV-Produktion (graue Linie, Abb. 3.18). 43 Tage p.i., d.h. 8 Tage nach Induktion der Differenzierung in Astrozyten durch Kultivierung in Astrozytendifferenzierungsmedium, konnte 3501 pg/ml p24-Protein im Zellkulturüberstand gemessen werden. Auch am Tag 54 p.i. produzierte die Astrozytenpopulation mehr HIV (1737 pg/ml) als die infizierte Progenitorpopulation.

Anschließend sank die HIV-Produktion jedoch wieder auf ein mit der Progenitorpopulation vergleichbares Level ab. Im Überstand der Astrozytenpopulation konnte 68 Tage p.i. 120 pg/ml p24-Protein detektiert werden. Am Tag 132 p.i. produzierte die Astrozytenpopulation praktisch keine viralen Partikel mehr (24 pg/ml).

Die Differenzierung in Astrozyten führte zu einem vorübergehenden Anstieg in der Virusproduktion.

Die intrazelluläre HIV-Gag-Produktion der beiden infizierten HNSC.100-Populationen (45 Tage p.i.) und der chronisch infizierten Zelllinien KE37/1-IIIIB und TH4-7-5 wurde zusätzlich im Western Blot untersucht (Abb. 3.19). Mittels eines HIV-1 Gag-spezifischen Antikörpers konnten die verschiedenen Gag-Vorläuferproteine von HIV-1 detektiert werden. Die chronisch infizierte T-Zelllinie KE37/1-IIIIB produzierte deutlich mehr Gag-Proteine, verglichen mit den beiden HNSC.100-Populationen und der Zelllinie TH4-7-5.

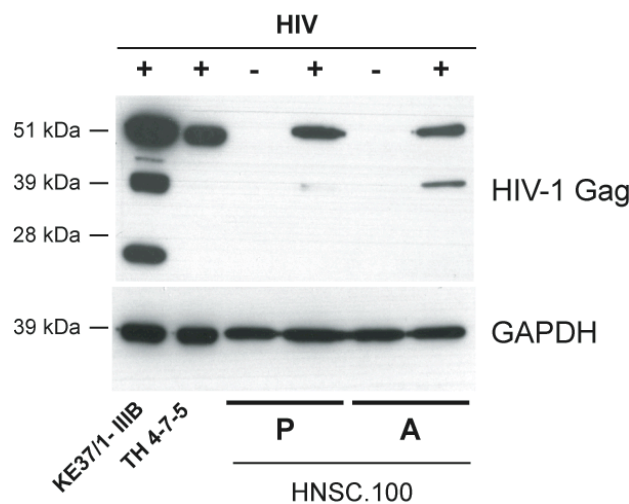


Abbildung 3.19 Analyse der HIV-1 Gag-Produktion im Western Blot. In der infizierten Progenitorpopulation (P, +HIV) und der daraus differenzierten Astrozytenpopulation (A, +HIV) konnte 45 Tage p.i. HIV-Gag Proteine detektiert werden. Zum Vergleich wurden die chronisch infizierte T-Zelllinie KE37/1-IIIIB und die chronisch infizierte Astrozytenzelllinie TH4-7-5 mitanalysiert. Zur Negativkontrolle dienten nicht-infizierte Progenitorzellen und Astrozyten. Gesamtzelllysate wurden mit einem p24-spezifischen AK untersucht. Der AK erkennt auch die Gag-Vorläuferproteine. GAPDH 36kD.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob dieser Anstieg der Virusproduktion durch die Differenzierung zu Astrozyten auch zu einem späteren Zeitpunkt nach der Infektion möglich ist (Abb. 3.20). Am Tag 63 p.i. wurde wiederum ein Teil der infizierten Progenitorpopulation in Astrozytendifferenzierungsmedium weiterkultiviert. Sechs Tage nach Induktion der Astrozytendifferenzierung produzierte auch hier die Astrozytenpopulation (469 pg/ml) mehr HI-Virus als die infizierten Progenitorpopulation (161 pg/ml).

Dies zeigte, dass auch zwei Monate nach der Infektion eine Induktion der Virusproduktion durch Differenzierung möglich war.

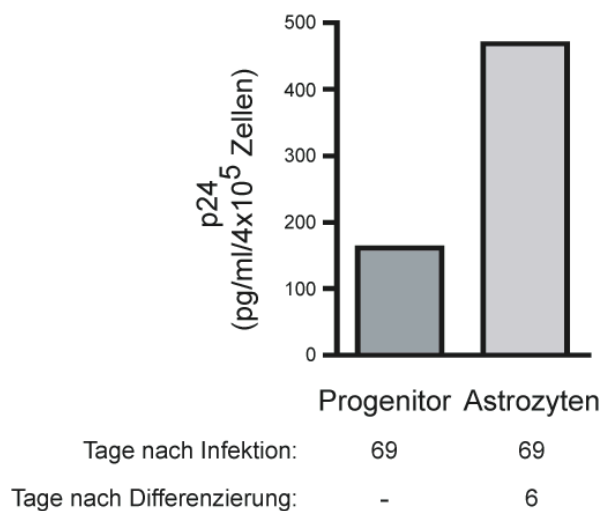


Abbildung 3.20 Induktion der Virusproduktion durch Differenzierung in Astrozyten. Auch zu einem späteren Zeitpunkt (69 Tage p.i.) führt die Differenzierung zu Astrozyten zu einem Anstieg in der Virusproduktion. 63 Tage p.i. wurde ein Teil der infizierten Progenitorzellen in Astrozytendifferenzierungsmedium weiterkultiviert. Fünf Tage später wurden die HNSC.100-Zellen in gleicher Zellzahl (4×10^5) ausgesät und 24 h später der Zellkulturüberstand geerntet.

3.8 Einfluss der Zytokine CNTF und TNF- α auf die HIV-Infektion

Verschiedene inflammatorische Zytokine (z.B. TNF- α) können die Virusproduktion in restringiert infizierten Zellen wie Astrozyten aktivieren (Tornatore et al., 1991; Van Lint et al., 2004). Die Kultivierung der infizierten Progenitorzellen ohne Wachstumsfaktoren und mit Zugabe des Zytokins CNTF führte zu einem kurzzeitigen drastischen Anstieg in der Virusproduktion. Es wurde deshalb weiter untersucht, ob schon die Zugabe des Zytokins CNTF allein (ohne den Entzug der Wachstumsfaktoren) die Virusproduktion der infizierten Progenitorpopulation oder

auch der chronisch infizierten TH4-7-5-Zellen erhöht. Parallel wurde die Wirkung des Zytokins TNF- α auf die Virusproduktion beider Zelllinien analysiert.

Die Zugabe von CNTF (100 ng/ml) zum Medium erhöhte die Virusproduktion der Progenitorpopulation (196 Tage p.i.) nicht (1,1-fach), während die Zugabe von TNF- α (10 ng/ml) die Virusproduktion um das 2,7-fache steigerte (Abb. 3.21).

Die gleichen Tendenzen ließen sich auch bei der Astrozytomzelllinie TH4-7-5 beobachten (Abb. 3.21). Das Zusetzen von CNTF zum Medium führte zu keiner gesteigerten Virusproduktion (1,0-fach). Die Behandlung mit TNF- α steigerte die Virusproduktion der chronisch infizierten TH4-7-5-Zellen um das 2,0-fache.

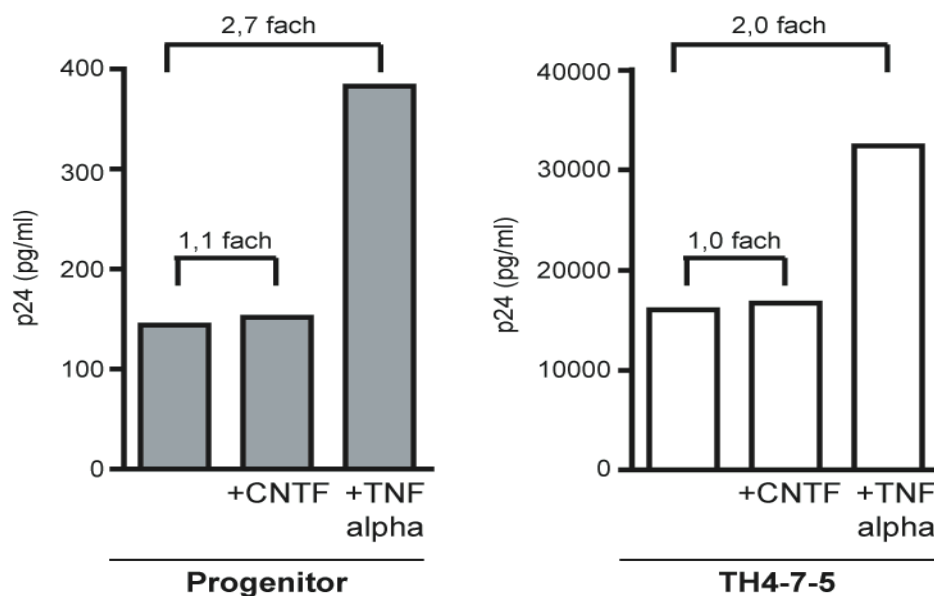


Abbildung 3.21 Analyse der Aktivierung der Virusproduktion durch CNTF und TNF- α . Die Zugabe von CNTF führte zu keiner Induktion der Virusproduktion, während die Zugabe von TNF- α die Virusproduktion sowohl in der infizierten Progenitorpopulation (96 Tage p.i.) als auch in der chronisch HIV-infizierten Astrozytomzelllinie TH4-7-5 etwa um den Faktor 2 induzieren konnte. Beide Zelllinien wurden in gleicher Zellzahl ($2,5 \times 10^5$) in ihrem jeweiligen Zellkulturmedium ausgesät. 48 h später wurde das Medium erneuert und die Zytokine zugesetzt (CNTF 100ng/ml, TNF- α 10ng/ml). Wiederum 48 h später wurde die Zellkulturüberstände geerntet und die p24-Konzentrationen im p24-ELISA ermittelt. Die errechneten Induktionen der Virusproduktion wurden angegeben.

Somit konnte gezeigt werden, dass CNTF allein die Virusproduktion von latent-infizierten Zellen nicht induzierte. Die Differenzierung der Progenitorzellen durch Wachstumsfaktorenentzug und Zugabe von CNTF war der entscheidende Punkt, der die Virusproduktion um ein Vielfaches steigerte.

Zweitens konnte gezeigt werden, dass durch Behandlung mit $\text{TNF-}\alpha$ die Virusproduktion in den infizierten Progenitorzellen induziert werden kann. Dabei war die Aktivierung der Virusproduktion in der neuralen Progenitorpopulation vergleichbar mit der Virusaktivierung in Astrozyten.

3.9 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Es wurde nach einem möglichen Grund für die vorübergehende Aktivierung der Virusproduktion durch die Differenzierung zu Astrozyten gesucht. Dazu wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B untersucht, der an die virale HIV-LTR binden und sie aktivieren kann.

Gemessen wurden die Aktivierung von NF- κ B durch die Analyse der Lokalisation: der Transkriptionsfaktor wandert bei Aktivierung in den Zellkern (siehe Abb. 3.22a). Sonst ist er hauptsächlich im Zytoplasma der Zellen zu finden. Nach Anfärbung von NF- κ B wurde der nukleäre Anteil von NF- κ B in der Zelle mittels der Software „Physiology BioApplication“ bestimmt.

Die Lokalisation von NF- κ B wurden in neuralen Progenitorzellen untersucht, die entweder in Proliferationsmedium weiterkultiviert wurden, oder in Zellen, bei denen ein Medienwechsel zu Astrozytendifferenzierungsmedium stattgefunden hatte. Die Analyse der Zellen erfolgte zu bestimmten Zeitpunkten nach Mediumwechsel (drei, sechs und 24 Stunden). Als Positivkontrolle wurde ein Teil der Zellen in Proliferationsmedium mit dem Zytokin $\text{TNF-}\alpha$ behandelt, das bekannterweise NF- κ B aktiviert (Widera et al., 2006).

In der Progenitorpopulation war 20% der NF- κ B-Fluoreszenz im Zellkern zu finden (Abb. 3.22b). Bei der Weiterkultivierung in Proliferationsmedium für drei, sechs und 24 Stunden änderte sich der nukleäre Anteil des Transkriptionsfaktors wie erwartet nicht (Unterschiede nicht signifikant). Nach Behandlung der Progenitorpopulation mit $\text{TNF-}\alpha$ war NF- κ B vermehrt im Kern der Zellen zu detektieren (nach sechs Stunden 36% im Kern und nach 24 Stunden 33%, Daten nicht gezeigt).

Durch die Kultivierung der Progenitorzellen in Astrozytendifferenzierungsmedium fand auch eine Aktivierung von NF- κ B statt, der Transkriptionsfaktor konnte vermehrt in den Zellkernen detektiert werden (nach drei Stunden 30% im Kern, nach sechs Stunden 31% und nach 24 Stunden 28%). Alle Werte waren signifikant unterschiedlich ($p < 0,0001$) (Abb. 3.22b).

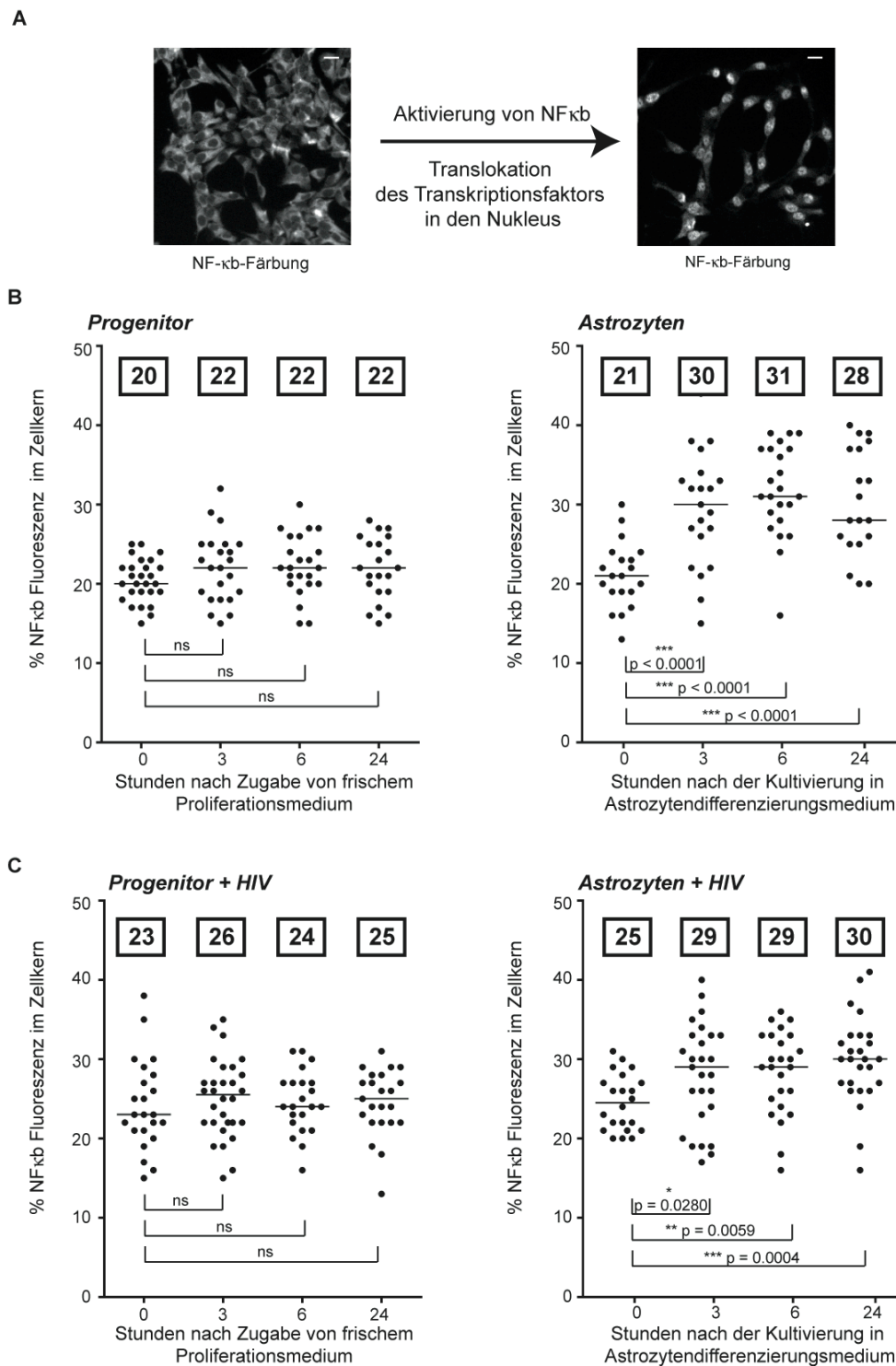


Abbildung 3.22 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB durch Differenzierung in Astrozyten. A. Bei Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB findet eine Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern statt. Dargestellt sind Beispielsbilder für die Lokalisation vor und nach der Aktivierung. NF-κB wurde mit einem NF-κB-spezifischen Erst-AK und einem Alexa488-gekoppelten Zweit-AK angefärbt. B. und C. *Quantitative Analyse der nukleären NF-κB Fluoreszenz.* Nach der Kultivierung der Progenitorzellen in Astrozytendifferenzierungsmedium (Astrozyten) steigt sowohl in der nicht-infizierten Progenitorpopulation (B) als auch in der infizierten Progenitorpopulation (C) (79 Tage p.i.) der nukleäre Anteil an NF-κB. Mit Hilfe der Software "Physiology BioApplication" wurden der nukleäre Anteil der NF-κB-Fluoreszenz bestimmt. Die Abbildung zeigt die einzelnen quantifizierten Zellen ($n > 25$) und den Median einer Population (schwarze horizontale Linie, medianer Wert in Kästchen angegeben). Die statistische Auswertung (Mann-Whitney Test) zeigte, dass die Ergebnisse signifikant unterschiedlich waren.

Ein weiterer Versuch sollte zeigen, ob diese Aktivierung von NF- κ B auch noch in der HIV-infizierten Progenitorpopulation (79 Tage p.i.) möglich ist (siehe Abb. 3.22c). Auch nach der HIV-Infektion findet in den Zellen durch die Kultivierung in Astrozytendifferenzierungsmedium eine Aktivierung von NF- κ B statt. Auch in der infizierten Population waren alle Werte signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert (Abb. 3.22c).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in der nicht-infizierten als auch in der infizierten Progenitorpopulation durch Kultivierung in Astrozytendifferenzierungsmedium der Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Kern der Zellen wanderte, d.h. aktiviert wurde.

3.10 Analyse der Expression viraler Transkripte

Die Expression viraler HIV-RNA-Transkripte wurde sowohl in der infizierten Progenitor- als auch in der daraus differenzierten Astrozytenpopulation 82 Tage p.i. analysiert. Mit Hilfe spezifischer Primerpaare wurden die verschiedenen viralen HIV-1 RNA-Spezies mittels PCR amplifiziert (siehe Abb. 3.23a) (Neumann et al., 1994). Sie erlauben die Unterscheidung ungespleißter, einfach gespleißter als auch mehrfach gespleißter RNA-Transkripte. Abbildung 3.23a zeigt schematisch die Bindungsstellen der verwendeten Primer im HIV-Genom an.

Mit dem Primerpaar BSS-S/-GAG-A konnte sowohl in der infizierten Progenitor- als auch in der Astrozytenpopulation ungespleißte HIV-RNA nachgewiesen werden (Abb. 3.23b). Beim Nachweis der einfach gespleißten RNAs mit den Primern BSS-S/KPN-A wurden folgende Produktgrößen erwartet: 447bp kodierend für Vpu/Env, 463bp für Vpu/Env, 645bp für Tat und 1033bp für Vpr. Die große Klasse von Transkripten (645bp Tat, 1033bp Vpr) konnte nicht amplifiziert werden, da hier die erwarteten Produkte aufgrund ihrer Größe unter den verwendeten PCR-Bedingungen nicht entstehen konnten. Die einfach-gespleißten Transkripte, die für Vpu/Env kodieren, konnten jedoch in beiden HNSC.100-Populationen nachgewiesen werden. Weiter konnte mittels der Primer BSS-S und SJ4.7-A gezeigt werden, dass die kleinen, mehrfach gespleißten Transkriptklassen in beiden HNSC.100-Populationen exprimiert wurden. Es lagen Transkripte kodierend für Rev, Nef und Tat vor.

Da die PCR-Analysen nicht unter quantitativen Bedingungen durchgeführt wurden, können keine quantitativen Aussagen über das Verhältnis der drei RNA-Klassen innerhalb einer Zelllinie getroffen werden.

In dem vorangegangenen Experiment konnte etwa 70 Tagen p.i. keine nachweisbare Virusproduktion in beiden HNSC.100-Populationen mehr nachgewiesen werden. Dieses Experiment zeigte nun, dass trotzdem in der infizierten Progenitor- als auch in der Astrozytenpopulation noch virale Genexpression stattfand. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass zu diesem Zeitpunkt die Zellen noch infiziert waren und dass das Virus in den neuronalen Progenitorzellen persistieren kann.

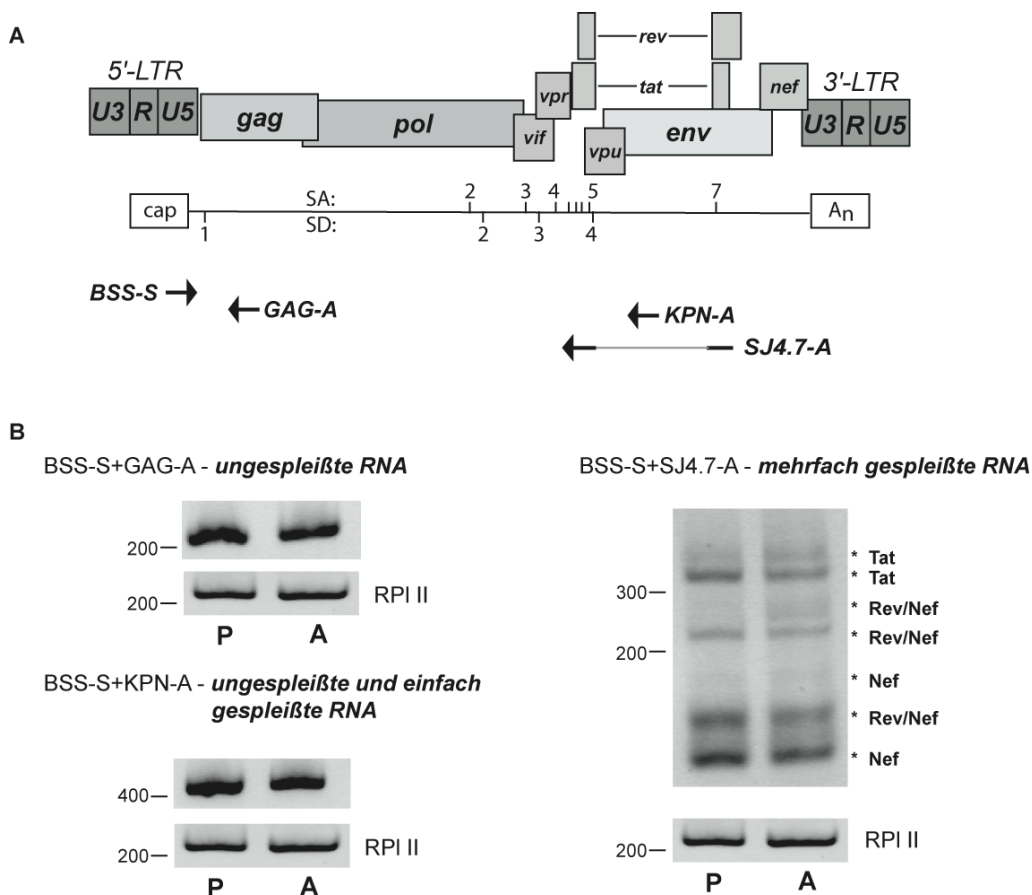


Abbildung 27. Analyse der Expression von HIV-1 Transkripten. Sowohl die Progenitorpopulation (P) als auch die daraus differenzierte Astrozytenpopulation (A) exprimierten 80 Tage p.i. noch HIV-spezifische Transkripte.

A. Für den Nachweis HIV-spezifischer Transkripten wurden Primer verwendet, die spezifisch sind für die verschiedenen Transkriptklassen. Dargestellt sind die Bindungsstellen der verwendeten Primer im HIV-Genom, sowie die Spleißakzeptor (SA)- und donorstellen (SD). Alle Transkripte enthalten das Exon 1, so dass der 5'Primer BSS beim Nachweis aller Transkripte eingesetzt wurde, GAG-A ist spezifisch für ungespleißte mRNA (BSS-GAGA 225bp), KPN-A für die einfach gespleißten Transkripten (BSS-KPNA 447bp Vpu/Env, 463bp Vpu/Env). SJ4.7-A überspannt die Grenzen von Exon 4 und 7 und ist somit spezifisch für die kleine mehrfach gespleißte Klasse (399bp Tat, 325bp Tat, 192bp Rev/Nef, 176bp Nef, 148/142bp Rev/Nef and 126bp (Nef)). B. RT-PCR Analysen. RNA wurde 82 Tage p.i. aus der HIV-infizierten Progenitor- und Astrozytenpopulation präpariert, in cDNA umgeschrieben und mittels spezifischer Primer untersucht. RPII diente als Kontrolle, um den Einsatz gleicher cDNA-Mengen sicherzustellen. RPII 266bp.

3.11 Charakterisierung der infizierten Progenitorpopulation

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die humane neurale Progenitorpopulation durch das HI-Virus infiziert werden kann und dass das Virus in der proliferierenden Population persistiert.

In den nachfolgenden Experimenten wurde nun untersucht, ob die Langzeit-Infektion mit HIV einen Einfluss auf die neuronalen Progenitorzellen hatte. Es wurden die bereits bei der Charakterisierung der beiden HNSC.100-Populationen verwendeten Zellparameter untersucht: die Expression zellspezifischer Marker, die Morphologie der Zellen und das Proliferationsverhalten.

3.11.1 Analyse der Markerexpression

Zunächst wurden die infizierte Progenitorpopulation und die daraus differenzierte Astrozytenpopulation auf die Expression zellspezifischer Marker untersucht. Da die Expression des Intermediärfilaments GFAP ein bedeutendes Unterscheidungsmerkmal beider HNSC.100-Populationen war, wurde die Expression mittels Western Blot Analyse und RT-PCR untersucht. Die GFAP-Expression der infizierten Populationen wurde jeweils mit der Expression in nicht-infizierten Populationen verglichen.

Im Western Blot zeigte sich, dass die HIV-infizierte Progenitorpopulation (45 Tage p.i.), verglichen mit nicht-infizierten Progenitorzellen, eine erhöhte GFAP-Produktion aufwies (Abb. 3.24a). Die GFAP-Produktion der HIV-infizierte Progenitorpopulation war geringer als die der daraus differenzierten Astrozytenpopulation (45 Tage p.i., in Astrozytendifferenzierungsmedium seit Tag 35 p.i.). Die infizierte Astrozytenpopulation und die nicht-infizierte Astrozytenpopulation produzierten beide große Mengen an GFAP.

Auch in RT-PCR Analysen konnte gezeigt werden, dass die infizierte Progenitorpopulation (82 Tage p.i.) mehr GFAP-RNA exprimierte, verglichen mit der nicht-infizierten Progenitorpopulation (Abb. 3.24b). Sowohl die infizierte als auch die nicht-infizierte Astrozytenpopulation exprimierten mehr GFAP-Transkripte als die Progenitorpopulationen. Zwischen den beiden Astrozytenpopulationen konnte kein Unterschied in der Expression festgestellt werden.

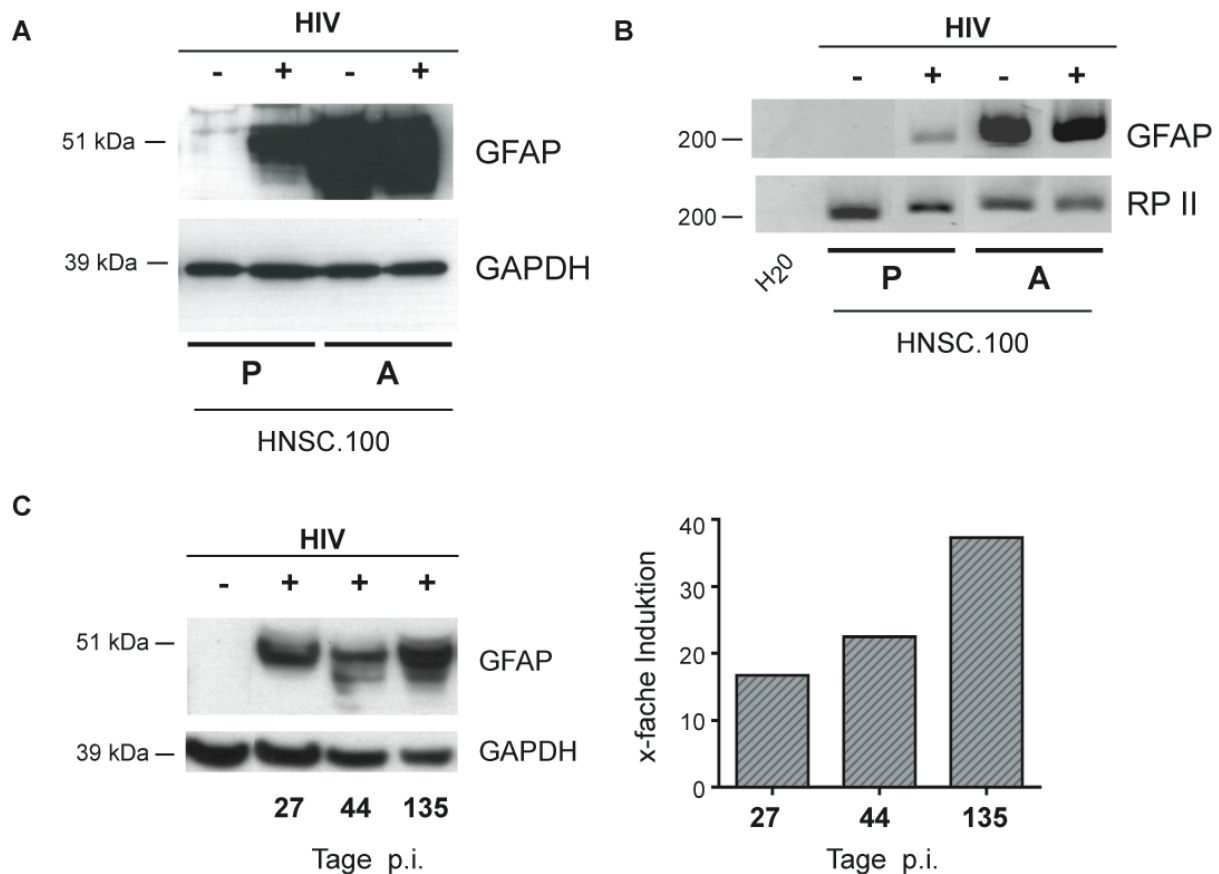


Abbildung 3.24 Synthese des Astrozytenmarkers GFAP in der infizierten Progenitor- (P, +HIV) und Astrozytenpopulation (A, +HIV). Im Vergleich zu nicht-infizierten Progenitorzellen zeigte die infizierte Progenitorpopulation eine erhöhte Synthese von GFAP. Nach der Kultivierung in Astrozytendifferenzierungsmedium zeigten sowohl die infizierte als auch die nicht-infizierte Astrozytenpopulation starke GFAP Produktion. Die Produktion von GFAP nahm im Verlauf der Infektion in der infizierten Progenitorpopulation immer weiter zu.

A. Western Blot-Analyse (45 Tage p.i.). Gesamtzelllysat der HNSC.100-Populationen wurde im Western Blot mit einem polyklonalen GFAP-spezifischen AK untersucht. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte HNSC.100-Populationen. Die GAPDH-Produktion wurde als Ladungskontrolle analysiert. GFAP 50kD, GAPDH 36kD. **B. RT-PCR Analyse (82 Tage p.i.).** RNA aus den HNSC.100-Populationen wurde in cDNA umgeschrieben und mit GFAP-spezifischen Primern untersucht. RPII diente als Kontrolle, um den Einsatz gleicher cDNA-Mengen sicherzustellen. GFAP 257bp, RPII 266bp. **C. Western Blot-Analyse der Produktion von GFAP.** 27, 44 und 135 Tage p.i. wurde Gesamtzelllysat der infizierten Progenitorpopulation gewonnen und zusammen mit Lysat nicht-infizierter Progenitorzellen im Western Blot mit einem GFAP-spezifischen AK untersucht. Das Protein GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet. Rechts dargestellt ist die quantitative Auswertung des Western Blot mittels Image J. Der Graph zeigt die x-fache Induktion der GFAP Produktion in infizierten Progenitorpopulation relativ zu nicht-infizierten Progenitorzellen.

Die RNA-Expressionsanalysen bestätigten die Ergebnisse auf Protein-Ebene: Die HIV-infizierte neurale Progenitorpopulation wies eine erhöhte Expression an GFAP auf. Weiter zeigten diese Experimente, dass die infizierte Progenitorpopulation trotz der HIV-Infektion in der Lage ist, in GFAP-positive Astrozyten zu differenzieren.

Um den Einfluss des HI-Virus auf die GFAP-Expression genauer zu analysieren, wurde die GFAP-Produktion der infizierten Progenitorpopulation über den Zeitraum der Infektion untersucht.

Die Produktion von GFAP in der infizierten Progenitorpopulation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion im Western Blot analysiert und quantifiziert. Der rechte Graph in Abbildung 3.24c zeigt die x-fache Induktion der GFAP-Produktion der infizierten Progenitorpopulationen relativ zu nicht-infizierten Progenitorzellen. Die Auswertung ergab folgende Induktionswerte: 27 Tage p.i. eine Steigerung der GFAP-Produktion um das 16,7-fache, 44 Tagen p.i. um das 22,5-fache und 135 Tagen p.i. um das 37,3-fache.

Zu allen Zeitpunkten nach der Infektion konnte eine erhöhte Produktion von GFAP in der infizierten Progenitorpopulation detektiert werden, die im Laufe der Infektion immer weiter anstieg (siehe Abb. 3.24c).

Zusätzlich wurde zu bestimmten Zeitpunkten nach Infektion mittels Real-time RT-PCR-Analysen das vergleichende RNA Expressionslevel ermittelt (Daten nicht gezeigt). 12 Tage p.i. konnte eine Steigerung in der Expression der GFAP-RNA in der infizierten Progenitorpopulation verglichen mit nicht-infizierte Progenitorzellen um das 469-fache ermittelt werden, 72 Tage p.i. um das 1359-fach und 143 Tage p.i. um das 6281-fache.

Zusammenfassend konnte sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene gezeigt werden, dass im Laufe der Infektion in der infizierten Progenitorpopulation die Synthese von GFAP induziert wurde.

Die Produktion von GFAP in der infizierten Progenitorpopulation wurde zusätzlich zu den bereits gezeigten Gesamtzellanalysen mit Immunfluoreszenzfärbung und Durchflußzytometrie untersucht, um eine Aussage über Expression auf Einzelzellniveau treffen zu können (Abb. 3.25). Es wurde analysiert, ob nur einzelne Zellen der Progenitorpopulation eine stark erhöhte GFAP-Expression aufwiesen oder ob alle Progenitorzellen der Population eine erhöhte Expression zeigten.

Sowohl in der Immunfluoreszenz (45 Tage p.i.) (Abb. 3.25a) als auch in der FACS-Färbung (65 Tage p.i.) (Abb. 3.25b) mit einem GFAP-spezifischen Antikörper wiesen alle Zellen der infizierten Progenitorpopulation eine erhöhte GFAP-Produktion auf. Die mediane Fluoreszenzintensität der gesamten infizierten Progenitorpopulation betrug 12,8, während die nicht-infizierten Zellen nur einen Median von 7,9 besaßen.

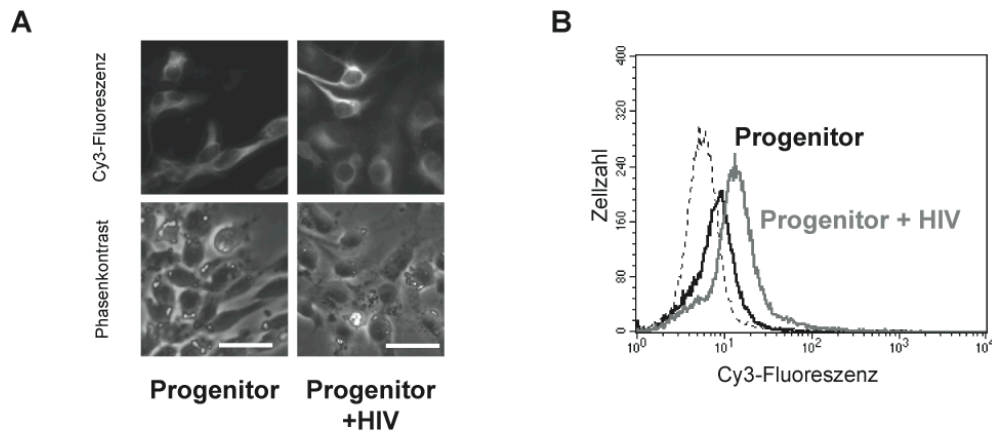


Abbildung 3.25 Analyse der GFAP-Produktion auf Einzelzellebene in der infizierten Progenitorpopulation. Die Mehrzahl der Zellen der HIV-infizierten Progenitorpopulation zeigte eine erhöhte GFAP-Produktion.

A. Immunfärbung (45 Tage p.i.). Fixierte, permeabilisierte HNSC.100-Zellen wurden mit einem GFAP-spezifischen Erst-AK und einem Cy3-gekoppelten Zweit-AK angefärbt. Scale bars: 20 μ m. **B. FACS-Analyse** (65 Tage p.i.). Die HNSC.100-Populationen wurden fixiert, permeabilisiert und mit einem GFAP-spezifischen Erst-AK und einem Cy3-gekoppelten Zweit-AK gefärbt. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Zweit-AK behandelt (gestrichelte Linie). Dargestellt sind im FACS-Histogramm sowohl die infizierte Progenitor- (grau) als auch die nicht-infizierte Progenitorpopulation (schwarz).

In der infizierten Progenitorpopulation wurde die Expression weiterer zellulärer Marker analysiert.

Mittels einer Oberflächenfärbung konnte gezeigt werden, dass die infizierte Progenitorpopulation (143 Tage p.i.) und die nicht-infizierte Progenitorpopulation gleiche Level an CXCR4 exprimierten (Abb. 3.26). Die medianen Fluoreszenzintensitäten und der Prozentsatz an CXCR4-positiven Zellen waren folgende: 153 und 80% in der HIV-infizierten Progenitorpopulation und 180 und 84% in der nicht-infizierten Progenitorpopulation.

Das vergleichende RNA-Expressionslevel (d.h. die infizierte Progenitorpopulation zeigt x-faches Expressionslevel im Vergleich zur nicht-infizierten Progenitorpopulation) von Nestin, AQP4 und S100 β wurden mit Real-time-PCR-Analysen quantitativ bestimmt (Daten nicht gezeigt).

Die Induktion für die Nestin-RNA betrug 0,76, das bedeutet keine Veränderung der Nestin-Expression in der infizierten Progenitorpopulation. Dies konnte auch in Western Blot-Analysen auf Proteinebene bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl an AQP4-Transkripten (3,81-fach) und S100 β -Transkripten (2,71-fach) stieg in der infizierten Progenitorpopulation sehr geringfügig an.

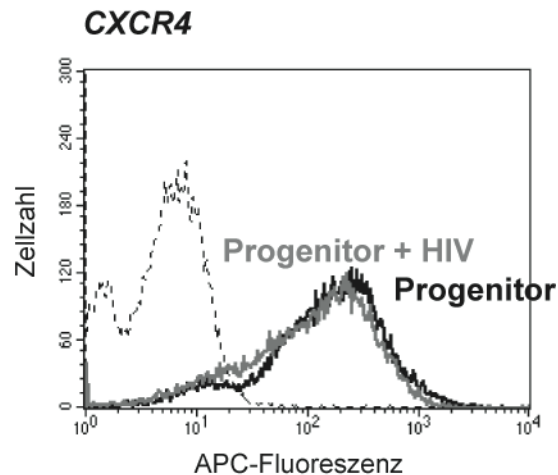


Abbildung 3.26 Produktion von CXCR4 in der infizierten Progenitorpopulation (143 Tage p.i.). Im Vergleich mit nicht-infizierten Progenitorzellen zeigte die infizierte Progenitorpopulation gleiche Produktion von CXCR4 auf der Oberfläche.

Analyse der CXCR4-Produktion auf der Zelloberfläche mittels FACS. Die HNSC.100-Populationen wurden fixiert und mit einem APC-gekoppelten CXCR4-AK gefärbt. Zur Kontrolle wurden Zellen mit einer APC-gekoppelten Isotyp-Kontrolle inkubiert (gestrichelte Linie). Dargestellt ist das FACS-Histogramm mit sowohl der infizierten Progenitor- (grau) als auch der nicht-infizierten Progenitorpopulation (schwarz).

3.11.2 Analyse der Zellmorphologie

Ein signifikantes Unterscheidungsmerkmal zwischen der neuralen Progenitorpopulation und der differenzierten Astrozytenpopulation war die Morphologie der Zellen.

Auch die Zellen der infizierten Progenitorpopulation wiesen beim Betrachten im Mikroskop eine andere Zellform im Vergleich zu den nicht-infizierten Progenitorzellen auf: Viele Zellen besaßen längere und auch mehrere Zellausläufer (siehe Abb. 3.27).

Deshalb wurde auch die Zellmorphologie der infizierten Progenitorpopulation quantitativ ausgewertet. Wiederum wurden die Fläche des Zellkörpers und die Fläche der Zellausläufer als exemplarische Zelleigenschaften bestimmt.

Die Zellparameter der infizierten Progenitorpopulation (141 Tage p.i.) wurden mit einer nicht-infizierten proliferierenden Progenitorpopulation verglichen. Zusätzlich wurde ein Teil der infizierten Progenitorpopulation für 10 Tage in Astrozytendifferenzierungsmedium kultiviert und auch von dieser Astrozytenpopulation die Zellparameter analysiert. Abbildung 3.27 zeigt Beispielsbilder für alle drei untersuchten HNSC.100-Populationen.

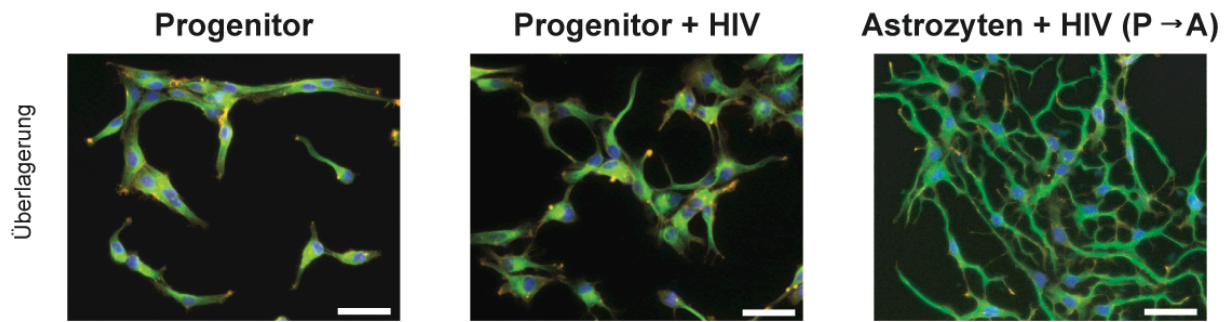


Abbildung 3.27. Morphologische Eigenschaften der HIV-infizierten Progenitorpopulation. Zellen der infizierte Progenitorpopulation (+HIV, 141 p.i.) besaßen mehr Zellausläufer als nicht-infizierte Progenitorzellen. Kultivierte man die infizierte Population für 10 Tage in Astrozytendifferenzierungsmedium (P→A) stieg die Anzahl und Länge der Zellausläufer. In fixierten HNSC.100-Zellen wurden folgende Zellstrukturen angefärbt: der Zellkern (blau) und die Zytoskelettproteine Tubulin (grün) und Aktin (rot). Dargestellt sind Überlagerungen der drei Fluoreszenzbilder. Scale bars: 20 μ m.

Die infizierte Progenitorpopulation unterschied sich sowohl in der Fläche des Zellkörpers als auch in der Fläche der Zellausläufer signifikant von nicht-infizierten Progenitorzellen (für beide Parameter $p < 0,0001$) (Abb. 3.28). Der mediane Wert der Zellkörperfläche war in der infizierten Progenitorpopulation 1262, während die nicht-infizierten Zellen einen medianen Wert von 1771 aufwiesen. Auch die medianen Werte der Zellausläuferflächen zeigten deutliche Unterschiede: für die infizierten Progenitorzellen ein Median von 61 und für die nicht-infizierte Progenitorpopulation ein Median von 32. Nach Differenzierung der infizierten Progenitorzellen zu Astrozyten ergaben sich für die Zellparameter folgende mediane Werte: Zellkörperfläche 241 und Zellausläuferfläche 81 (Abb. 3.28).

D.h. die infizierte Progenitorpopulation veränderte sich durch die Differenzierung weiter, wie auch in nicht-infizierten Zellen nahm mit der Differenzierung die Fläche des Zellkörpers ab, während die Fläche der Zellausläufer zunahm. Auch hier ergab die statistische Auswertung, dass beide Zellparameter signifikant unterschiedlich waren (Abb. 3.28).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Langzeit-Infektion der neuralen Progenitorpopulation mit HIV die morphologischen Eigenschaften der Zellen veränderten. Diese Veränderungen waren aber weniger stark ausgeprägt als die Zellveränderungen, die mit der Differenzierung der Progenitorzellen zu Astrozyten stattfinden.

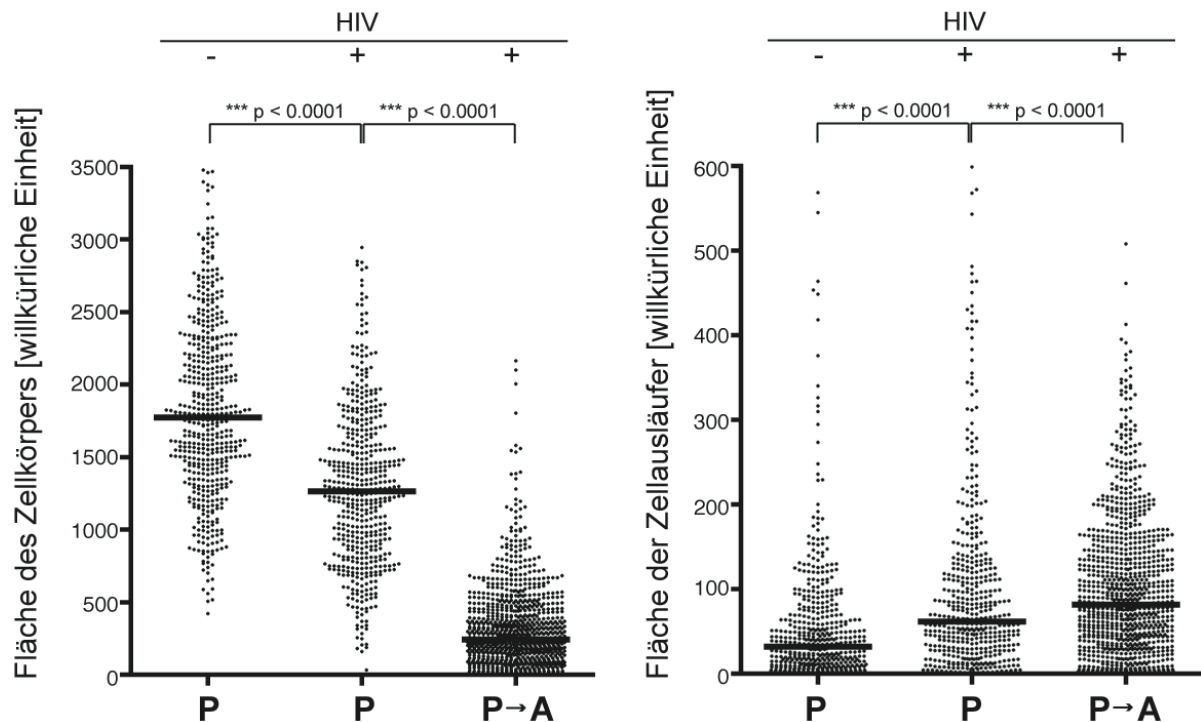


Abbildung 3.28 Quantitative Analyse der morphologischen Eigenschaften der infizierten Progenitorpopulation (P) (141 Tage p.i.). Verglichen mit Zellen einer nicht-infizierten Progenitorpopulation besaßen die Zellen der infizierten Progenitorpopulation (P, +HIV) im Durchschnitt eine kleiner Fläche des Zellkörpers und eine größere Fläche der Zellausläufer. Kultivierte man die infizierte Population für 10 Tage in Astrozytendifferenzierungsmedium (P→A, +HIV) sank die Fläche des Zellkörpers weiter und die Fläche der Zellausläufer stieg weiter an. Mit Hilfe der Software “Morphology Analyst” wurden die Fläche des Zellkörpers und die Fläche der Zellausläufer der Zellpopulationen bestimmt (willkürliche Einheit). Die Abbildung zeigt die einzelnen quantifizierten Zellen ($n > 500$) und den Median einer Population (schwarze horizontale Linie). Die statistische Auswertung (Mann-Whitney Test) zeigte, dass die Ergebnisse signifikant unterschiedlich waren ($p < 0,0001$).

3.11.3 Analyse des Proliferationsverhaltens

Es wurde ermittelt, ob das Virus einen Einfluss auf die Fähigkeit der Progenitorpopulation hatte, sich selbst durch mitotische Zellteilung zu erneuern.

Das Proliferationsverhalten der infizierten Progenitorzellpopulation wurde mit dem Verhalten einer nicht-infizierten Progenitorpopulation mittels einer CFSE-Färbung verglichen. Die Histogramm-Blots der beiden Progenitorpopulationen sind Abbildung 3.29a dargestellt, dabei ist die schwarze (+HIV) bzw. die graue (-HIV) Population die gefärbte Ausgangspopulation (Zeitpunkt 0).

Der Median der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0 wurde auf 100% gesetzt, und die Fluoreszenzintensitätsmediane der späteren Zeitpunkte darauf bezogen (Abb. 3.29b). Nach einem Tag zeigte sowohl die infizierte als auch die nicht-infizierten Progenitorpopulation nur noch etwa 30% der Intensität (-HIV: 26,9%, +HIV: 25%).

Auch bei den späteren Zeitpunkten zeigten beide Progenitorpopulationen ein ähnliches Verhalten: nach zwei Tagen sank der Fluoreszenzmedian beider Populationen auf 10% (-HIV: 9,7%, +HIV: 8,4%), nach drei Tagen auf 3% (-HIV: 3,4%, +HIV: 2,7%) und nach vier Tagen auf 2% (-HIV: 1,9%, +HIV: 1,7%). Beide Progenitorpopulationen besaßen das gleiche Zellteilungsverhalten.

Aus diesem Experiment lässt sich schließen, dass die Infektion mit HIV keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der neuralen Progenitorpopulation hatte.

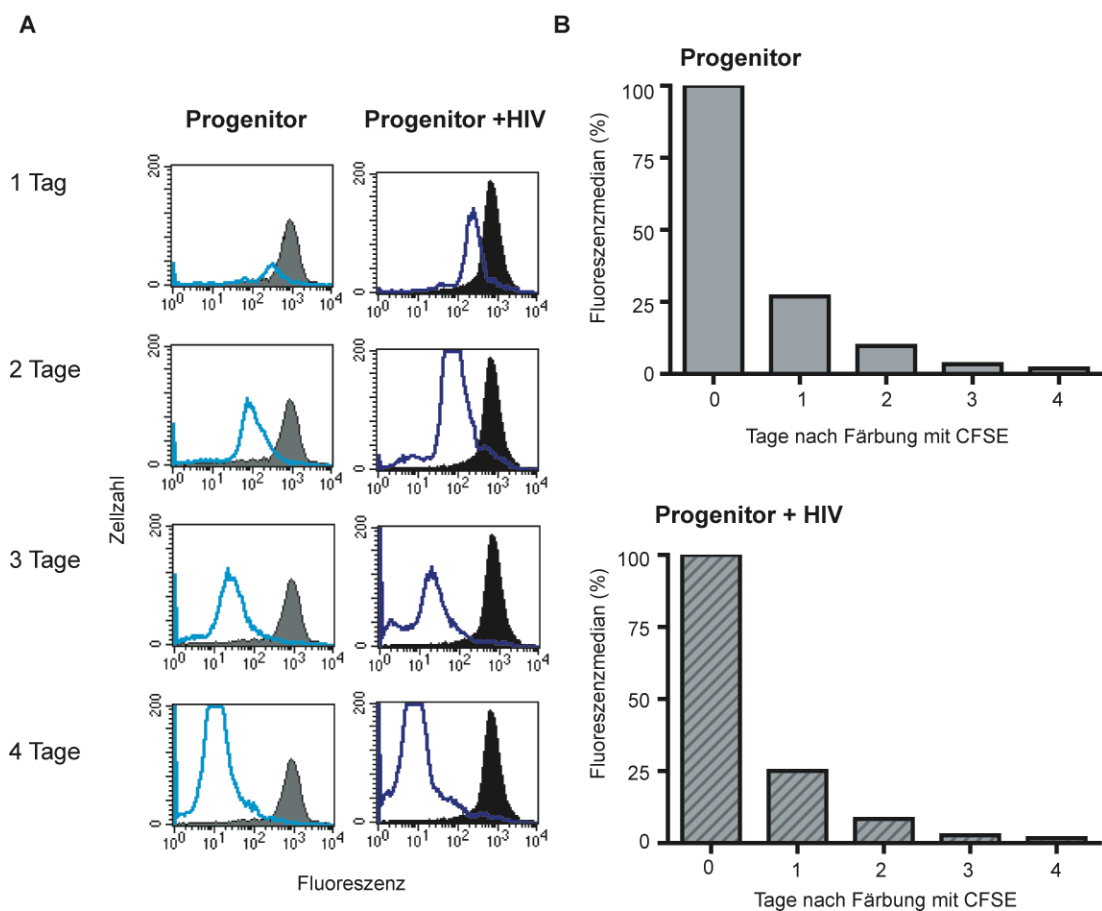


Abbildung 3.29 Proliferationsverhalten der HIV-infizierten Progenitorpopulation. Es konnte keine Unterschiede in der Proliferation festgestellt werden Sowohl die infizierte Progenitorpopulation als auch nicht-infizierte Progenitorzellen wurden parallel mit CFSE gefärbt. A.FACS-Histogramme der CFSE-gefärbten Progenitorzellen nach 1, 2, 3 und 4 Tagen. Die graue bzw. schwarze Population stellen die gefärbten Populationen zum Zeitpunkt 0 dar. B.Abnahme der medianen Fluoreszenzintensität der CFSE-gefärbten Zellen. Die mediane Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0 wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten (83 und 155 Tage p.i.).

3.11.4 Neuronendifferenzierung

Als letztes wurde das Potential der infizierten Progenitorpopulation untersucht, zu Neuronen zu differenzieren. Dafür wurde die Expression der neuronenspezifischen Marker β -Tubulin III und Synapsin nach Differenzierung in Neuronendifferenzierungsmedium analysiert.

In einem ersten Experiment wurden sowohl die infizierte Progenitorpopulation (90 Tage p.i.) als auch nicht-infizierte Progenitorzellen für zehn Tage in Neuronendifferenzierungsmedium kultiviert und das Gesamtzelllysate im Western Blot untersucht (Abb. 3.30a).

Die infizierte Progenitorpopulation exprimierte (wie schon gezeigt) GFAP und auch geringe Mengen an β -Tubulin III. Eine Produktion von Synapsin konnte nicht detektiert werden. Die infizierte in Neuronendifferenzierungsmedium kultivierte Population zeigte im Vergleich mit der infizierten Progenitorpopulation eine erhöhte Expression von GFAP und β -Tubulin III. Aber es konnte kein Synapsin in der infizierten differenzierten Population nachgewiesen werden. In der nicht-infizierten Neuronenpopulation hingegen konnte eine deutliche Produktion der Neuronenmarker β -Tubulin III und auch Synapsin detektiert.

β -Tubulin III ist ein früher Marker der neuronalen Differenzierung und tritt in der infizierten differenzierten HNSC.100-Population auf. Synapsin hingegen stellt einen späten neuronalen Marker dar und konnte nicht detektiert werden. In einem weiteren Versuch wurde nun untersucht, ob die infizierte Progenitorpopulation eine langsamere Differenzierung in Nervenzellen zeigt. Deshalb wurde die neuronale Differenzierung dieser Progenitorpopulation (146 Tage p.i.) über einen längeren Zeitraum beobachtet. Als Kontrolle wurde wiederum die neuronale Differenzierung einer nicht-infizierten Progenitorpopulation mitanalysiert. Beide Populationen wurden in Neuronendifferenzierungsmedium bis zu 31 Tage kultiviert (177 Tage p.i.). Zu bestimmten Zeitpunkten (nach 15, 17, 22, 29 und 31 Tagen) wurde jeweils Gesamtzelllysate gewonnen. In der Western Blot-Analyse zeigte sich, dass die infizierte Population auch nach längerer Kultivierung in Neuronendifferenzierungsmedium keine Expression von Synapsin zeigte, während die nicht-infizierte Neuronenpopulation schon zu allen Zeitpunkten Synapsin (und auch β -Tubulin III) produzierte (Abb. 3.30b). Aber es konnte ein Anstieg in der Expression von β -Tubulin III in der infizierten Population detektiert werden. In beiden

HNSC.100-Populationen (nicht-infiziert und infiziert) konnte über den beobachteten Zeitraum ein Anstieg in der GFAP-Produktion nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in der infizierten neuronalen Progenitorpopulation die Reifung zu Neuronen gestört war.

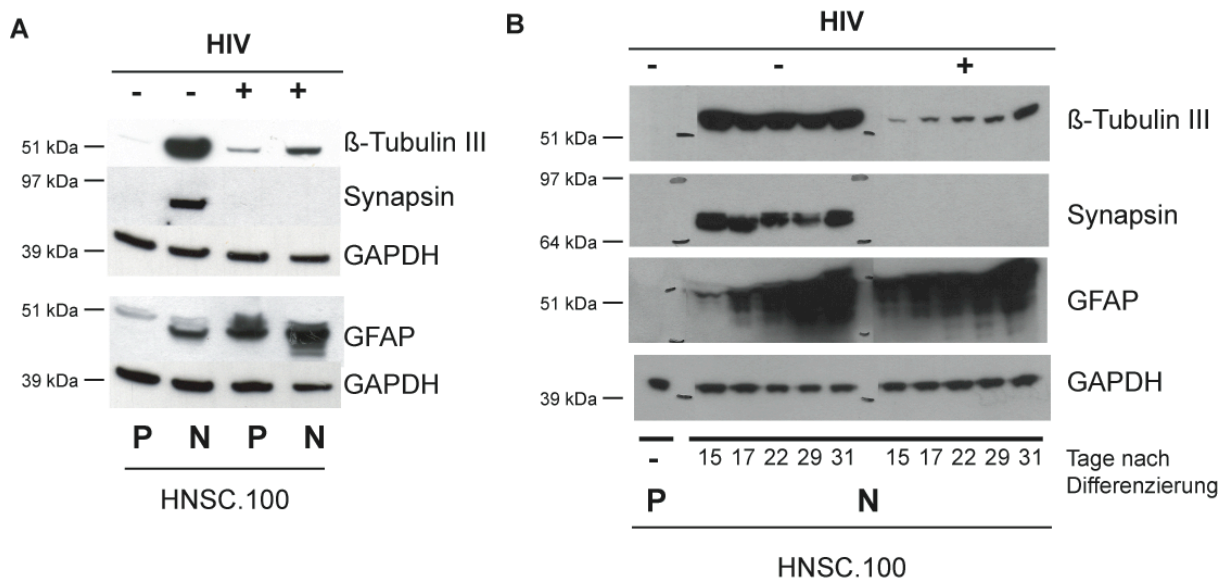


Abbildung 3.30 Untersuchung der neuronalen Differenzierung der infizierten Progenitorpopulation mittels Western Blot-Analysen. Die infizierte HNSC.100-Population zeigte nach Kultivierung in Neuronendifferenzierungsmedium zwar eine erhöhte Produktion von β -Tubulin III, aber keine von Synapsin. Gesamtzelllysate wurden mittels zelltyp-spezifischer Antikörper untersucht. GAPDH diente als Ladungskontrolle. A. Sowohl die nicht-infizierte (-HIV) als auch die infizierte (+HIV) (90 Tage p.i.) Progenitorpopulation (P) wurde für 10 Tage in Neuronendifferenzierungsmedium kultiviert (N). B. Die Neuronendifferenzierung der infizierten Population wurde über einen längeren Zeitraum beobachtet (bis zu 31 Tagen). Zur Kontrolle erfolgte auch die Analyse nicht-infizierter Progenitorzellen. β -Tubulin III 50 kDa, Synapsin 77/80 kDa, GFAP 50 kDa, GAPDH 36 kDa.

4 Diskussion

Die Infektion mit HIV stellt auch nach jahrelanger Forschung noch immer eine unheilbare Krankheit dar. Trotz intensiver Anstrengungen ist es bisher nicht gelungen einen Impfstoff gegen das Virus zu entwickeln, da das Virus außergewöhnlich wandlungsfähig ist. Einstweilen besteht die einzige Hoffnung HIV-Infizierter in einer antiviralen Behandlung, welche die Viruslast mindert und somit das Fortschreiten der Krankheit verzögert (Simon et al., 2006). Die antiviralen Therapien müssen jedoch lebenslang gegeben werden, da beim Absetzen der Medikamente die HIV-Vermehrung wieder einsetzt und AIDS ausbricht oder fortschreitet.

Die Behandlungssituation mit HAART in den ärmeren Ländern der Welt ist nach wie vor katastrophal, in Afrika liegt die Behandlungsrate kaum über 10 %. Das Problem ist, dass die Medikamente sehr teuer sind und Patienten in vielen Ländern Afrikas und Südostasiens sich diese Behandlung nicht leisten können, obwohl auf Initiative der UNO die pharmazeutischen Firmen die Preise für diese Medikamente in den Entwicklungsländern stark reduziert haben (Garnett et al., 2002; Orrell, 2005; Simon et al., 2006).

Derzeitige antiretrovirale Medikamente verhindern nur eine Neuinfektion von Zellen, die Substanzen entfernen nicht die HIV-Proviren, die in zelluläre Genome integriert sind. Um vielleicht eines Tages dem Therapieziel Eradikation etwas näher zu kommen, müssten auch die meist langlebigen viralen Zellreservoir angegangen werden. Dazu ist es notwendig, alle Zielzellen von HIV zu kennen, die ein mögliches Reservoir für den Virus im Körper HIV-infizierter Patienten bilden können. Grundlagenforschung kann dabei entscheidende Hinweise über die viralen Zielzellen geben. Detaillierte Kenntnis der molekularen Vorgänge, welche die Etablierung dieser Reservoirzellen ermöglichen, könnte therapeutisch von Nutzen sein.

4.1 Die Erforschung der Neurobiologie von HIV bleibt weiterhin notwendig

Das ZNS stellt während der chronischen HIV-Infektion für das HI-Virus ein geschütztes Reservoir dar, in dem sich das Virus über Jahrzehnte verstecken kann (Sonza and Crowe, 2001). Erstens gelangen Zellen des Immunsystems und auch antivirale Medikamente nur schlecht oder gar nicht in das Gehirn und zweitens existieren im Gehirn latent infizierte Zellen. Die Verfügbarkeit von HAART konnte zwar zu einer deutlichen Besserung der neurologischen Symptome in HIV-infizierten

Patienten führen, sie konnte die HIV-Infektion aber nicht aus dem ZNS eliminieren (Anthony et al., 2005; Nath and Sacktor, 2006). Durch HAART ist die Inzidenz von HAD zurückgegangen, sie ist jedoch weniger gesunken als die Inzidenzen anderer AIDS-Manifestationen (Dore et al., 1999; Sacktor, 2002; Sacktor et al., 2001). Die Prävalenz von HIV-assoziierten neurologischen Störungen steigt, da infizierte Menschen dank HAART immer länger leben und die Viren damit mehr Zeit haben, im Gehirn Schäden anzurichten (Anthony et al., 2005; Ghafouri et al., 2006). In Zukunft werden immer mehr HIV-infizierte Patienten aufgrund der erhöhten Lebenserwartung Symptome des ZNS entwickeln (Dore et al., 1999; Kandaneeratchi et al., 2003).

Die Prävalenz von HAD im südlichen Afrika, wo die meisten HIV-infizierten Menschen leben, ist größtenteils unbekannt. Eine Studie in Uganda zeigte, dass in Afrika wahrscheinlich über 30% der HIV-infizierten Patienten an HAD und etwa 50% an MCMD leiden (Birbeck, 2005; Sacktor et al., 2007). Die Neurobiologie von HIV bleibt deshalb weiterhin ein wichtiger Punkt.

Trotz intensiver weltweiter Forschung sind die Vorgänge, die nach der Infektion des ZNS zur Zerstörung von Neuronen führen, noch nicht vollständig aufgeklärt. Deshalb gibt es auch noch keine spezielle Behandlung der HAD (Ellis et al., 2007; Hult et al., 2008; Kaul et al., 2001). In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob neurale Progenitorpopulationen eine Rolle bei den Vorgängen im HIV-infizierten ZNS spielen könnten. Die erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür. Neurale Progenitorzellen sind in der Lage, ein weiteres langlebiges zelluläres Reservoir für das HI-Virus darzustellen, da sie persistent mit dem Virus infiziert werden können. Das Virus ruft biologische Veränderungen in der neuronalen Progenitorpopulation hervor. Möglicherweise lassen sich mit diesem Wissen neue Strategien entwickeln, mit denen die schädlichen Wirkungen der HI-Viren auf das Gehirn verhindert werden können.

4.2 Untersuchung der HIV-Infektion von neuronalen Progenitorzellen mittels einer Zelllinie

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Langzeit-Infektion humaner neuronaler Progenitorzellen. Zu diesem Zwecke wurde als experimentelles Modell für neurale Progenitorpopulationen die immortalisierte neurale Stammzelllinie HNSC.100 gewählt, welche aus humanem fötalem Gehirngewebe gewonnen wurde (Villa et al., 2000). Diese Zelllinie kann im Gegensatz zu primären neuronalen Progenitorzellen, welche nach einer bestimmten Zeit in Kultur in Seneszenz gehen, unbegrenzt in

Kultur gehalten werden (Villa et al., 2004). Das zur Immortalisierung verwendete Onkogen v-myc verhindert durch Aktivierung der Telomerase die Verkürzung der Telomeren an den Chromosomen-Enden und verleiht so der Zelllinie die Fähigkeit, sich endlos zu teilen. Vorteil dieser immortalisierten Zelllinie ist, dass sie - im Gegensatz zu Zelllinien aus Gehirntumoren – nicht transformiert ist. Die HNSC.100-Zellen bilden bei der Transplantation ins Gehirn von Ratten keine Tumore (Rubio et al., 2000). Ein Nachteil dieser Zelllinie gegenüber primären neuronalen Progenitorzellen ist natürlich, dass sie genetisch verändert wurde. Sie ermöglicht dafür die Untersuchung von zellulären und viralen Funktionen in einem definierten zellulären Hintergrund, da die Zelllinie monoklonal ist. Ein weiterer Vorteil der Zelllinie HNSC.100 war, neben der unbegrenzten Teilungsfähigkeit, dass sie genetisch transduziert werden kann. Dadurch war es möglich, stabile Reporterzellpopulationen zur Untersuchung des Differenzierungsstatus zu etablieren und die Rev-Funktions- und Lokalisationsanalysen durchzuführen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass unter dem Einfluss der beiden Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 die HNSC.100-Zellen die typischen Marker für neurale Progenitorzellen exprimieren: Nestin, Vimentin und Sox1 (Abb. 3.1, 3.3 und 3.4). Weiter exprimieren die Zellen keine bzw. nur sehr gering spezifische Marker für differenzierte, neurale Zellpopulationen (Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten) (Abb. 3.2 und Tab. 3.1).

Diese Experimente mit einer Zelllinie ergänzen die bereits publizierten Ergebnisse bezüglich der HIV-Infektion humaner neuronaler Progenitorzellen. Bei der Untersuchung der HIV-Infektion von Zellen aus dem Gehirn besteht nämlich einerseits die Möglichkeit, die Gehirngewebe HIV-infizierter Patienten zu analysieren (*in vivo*-Situation), andererseits erfolgt die Analyse der HIV-Infektion mit Hilfe kultivierter Gehirnzellen. Hierbei werden als Zellkultursysteme entweder primäre Zellen oder Zelllinien verwendet. Alle Untersuchungsansätze sind notwendig und ergänzen sich gegenseitig, da sie jeweils sowohl Stärken aber auch Beschränkungen aufweisen (Kramer-Hammerle et al., 2005c). Schwartz et al. untersuchten erst kürzlich die Infektion Nestin-positiver Zellen in Gehirnen von HIV-infizierten Kindern und brachten damit einen ersten Hinweis, dass *in vivo* eine Infektion neuronaler Progenitorzellen stattfinden kann (Schwartz et al., 2007). Zuvor konnte schon *in vitro* die HIV-Infektion primärer fetaler humaner neuronaler Progenitorzellen gezeigt werden (Lawrence et al., 2004).

4.3 Gezielte Differenzierung der HNSC.100-Zellen in Astrozyten

Die Zelllinie HNSC.100 wurde einerseits als experimentelles Modell für neurale Progenitorzellen, andererseits als Modell für differenzierte Astrozyten verwendet.

Bisherige Untersuchungen der HIV-Infektion von Astrozyten wurden hauptsächlich mit Hilfe von Astrozytomzelllinien durchgeführt. Viele dieser Zelllinien aus Tumoren haben die Kapazität verloren GFAP, den typischen Astrozytenmarker, zu synthetisieren (Ludwig et al., 1999). Die Differenzierung von neuronalen Progenitorzellen zu Astrozyten stellt nun ein Zellkultursystem dar, welches der *in vivo* Situation von Astrozyten etwas näher kommt. Ein weiterer Vorteil dieses Zellkultursystems ist, dass die Reaktionen der verschiedenen neuronalen Zellpopulationen (Progenitorzellen und Astrozyten) auf HIV aufgrund des gleichen zellulären Hintergrundes gut miteinander verglichen werden können.

Astrozyten verschiedener Gehirnregionen unterscheiden sich sehr stark in ihrer Genexpression, nur wenige Gene werden ubiquitär exprimiert (Bachoo et al., 2004). Verschiedene Subpopulationen zeigen morphologische, molekulare und auch funktionale Unterschiede (Chen and Swanson, 2003; Walz, 2000). Deshalb wurden verschiedene Zelleigenschaften und Marker analysiert, um die aus HNSC.100-Zellen generierte Astrozytenpopulation zu definieren (Kimmelberg, 2004) (Tab. 3.1).

Durch Zugabe des Astrogenese-fördernden Zytokins CNTF und die Wegnahme der Wachstumsfaktoren konnten nach einem Differenzierungszeitraum von mindestens sieben Tagen aus den Progenitorzellen Astrozyten generiert werden. Dies war das erste Mal, dass gezeigt werden konnte, dass CNTF auch im humanen System die Differenzierung von neuronalen Progenitorzellen in Astrozyten induziert. Die Astrozytenpopulation unterschied sich in der Expression verschiedener Gene und der Morphologie von der Progenitorpopulation (Abb. 3.5 und 3.6). Über 90% der Zellen zeigen eine Produktion des astrozytenspezifischen Markers GFAP (Abb. 3.2). Zusätzlich steigt das Expressionslevel der beiden Astrozytenmarker AQP4 und S100 β (Abb. 3.4). Und mit Induktion der Astrozytendifferenzierung sank die Proliferationsrate der HNSC.100-Zellen (Abb. 3.7). Außerdem zeigte die Astrozytenpopulation die typischen Eigenschaften von Astrozyten bei der Interaktion mit HIV (Brack-Werner, 1999; Gorry et al., 2003): zytoplasmatische Lokalisation und verminderte Funktionalität des HIV-1 Proteins Rev und das schnelle Einstellen der HIV-Produktion nach der Virusinfektion (Abb. 3.11, 3.12 und 3.16).

Alle diese Ergebnisse bestätigten, dass zwischen der Progenitor- und der Astrozytenpopulation der Zelllinie HNSC.100 verlässliche funktionale und phänotypische Unterschiede bestehen.

Auffällig bei den Markerexpressionsanalysen war allerdings, dass nach der Differenzierung in Astrozyten weitere Marker exprimiert wurden, die charakteristisch für neurale Vorläuferzellen sind (Abb. 3.1 und 3.3). Sowohl die Expression des Intermediärfilaments Nestin als auch die Expression des Transkriptionsfaktors Sox1 wird im Allgemeinen beim Austritt aus der Mitose und neuronaler oder glialer Differenzierung herunterreguliert (Bazan et al., 2004). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Differenzierungsbedingungen zur Etablierung der Astrozytenpopulation konnte keine Abnahme von Nestin -weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene- beobachtet werden. Auch nach längeren Differenzierungszeiträumen konnte kein Rückgang der Nestinproduktion detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass das Zytokin CNTF neben der Differenzierung von Progenitorzellen in Astrozyten auch die Aktivierung von Astrozyten bewirken kann (Kahn et al., 1995; Ridet et al., 1997). Nach Aktivierung von Astrozyten findet in den Zellen eine Koexpression der drei Intermediärfilamente GFAP, Vimentin und Nestin statt, wie sie auch in der Astrozytenpopulation der HNSC.100-Zellen zu beobachten war (Eliasson et al., 1999; Ernst and Christie, 2006; Faijerson et al., 2006; Krum and Rosenstein, 1999; Liberto et al., 2004; Pekny and Pekna, 2004). Es ist demnach bekannt, dass aktivierte Astrozyten in der Lage sind, alle drei Typen an Intermediärfilamentproteinen zu exprimieren (Pekny and Pekna, 2004; Zhang et al., 2005). Im Allgemeinen aber wird Nestin mehr in unreifen Astrozytenvorläuferzellen exprimiert, während GFAP und Vimentin auch in nicht-aktivierten, reifen Astrozyten zu finden sind (Messam et al., 2000). Die andauernde Expression von Nestin könnte also ein Hinweis darauf sein, dass die HNSC.100-Zellen noch nicht terminal in reife Astrozyten differenziert waren. Aber auch bestimmte reife Astrozytenpopulationen wie z.B. radiale Gliazellen können noch eine Expression von Nestin zeigen (Malatesta et al., 2003). Messam et al. untersuchten die Koexpression von Nestin und GFAP bei der Entwicklung des humanen Gehirns. Während der Prozentsatz an Nestin-positiven Zellen abnimmt, steigt der Prozentsatz an Nestin- und GFAP-positiven Zellen (Messam et al., 2002). Die Bildung von Intermediärfilamenten ist also sowohl entwicklungsabhängig als auch abhängig vom

funktionellen Status einer Zelle (Fuchs and Cleveland, 1998; Pekny and Pekna, 2004).

Weitere Gründe, warum nach Differenzierung in Astrozyten die Expression der neuronalen Progenitormarker nicht herunterreguliert wurde, könnten mit der Transduktion der Zellen mit dem Onkogen v-myc zusammenhängen. Die Nestin- und Sox1-Expression wird Zellzyklus-abhängig reguliert. Sie wird herunterreguliert, wenn die neuronalen Progenitorzellen zu differenzieren beginnen und sich damit nicht mehr teilen. V-myc könnte dabei genau auf diesen Vorgang einen Einfluss haben. Es ist bereits beschrieben, dass das Proto-Onkogen N-myc aus Neuroblastomen eine Rolle bei der Regulation der Nestin-Expression spielt (Thomas et al., 2004) und dass in bestimmten Zellen die terminale Differenzierung durch v-myc beeinflusst wird (Lee and Reddy, 1999).

4.4 Die Etablierung einer differenzierungsabhängigen Reporterpopulation mittels foamyviraler Vektoren

Zur Untersuchung des Differenzierungsverhaltens der HNSC.100-Zellen wurden Reporterzellpopulationen etabliert, welche das Fluoreszenzprotein EGFP unter der Kontrolle eines astrozytenspezifischen Promotors exprimieren (Abb. 3.8). So konnte eine schnelle und leichte Methode entwickelt werden, mit welcher der Einfluss externer Faktoren auf das Differenzierungsschicksal der Progenitorzellen im FACS untersucht werden kann (Abb. 3.9).

Als astrozytenspezifischer Promoter wurde der humane Promotor des GFAP-Gens gewählt, da die transkriptionelle Regulation des GFAP-Gens mit der Funktion von Astrozyten verknüpft ist (Brenner et al., 1994; Messing and Brenner, 2003; Su et al., 2004). Seine initiale Aktivierung kennzeichnet die Differenzierung zu Astrozyten, und seine Aktivität wird als Antwort auf fast alle Verletzungen des ZNS hochreguliert (Eng and Ghirnikar, 1994; Jakobsson et al., 2006). Studien in Zellkulturen und transgenen Mäusen und Ratten hatten zeigt, dass die 2,2 kb große 5' flankierende Region des humanen GFAP-Gens ausreichend ist für die Astrozytenspezifität des Promotors (Besnard et al., 1991; Brenner, 1994; Jakobsson et al., 2003). Hier konnte gezeigt werden, dass sich der externe Gfa2-Promotor in den HNSC.100-Zellen vergleichbar zum internen nativen GFAP-Promotor verhält und in Abhängigkeit vom Differenzierungsschicksal der Zellen aktiviert wird (Abb. 3.10).

Das Fluoreszenzprotein GFP, welches aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt, wurde gewählt, da es sehr einfach in der lebenden Zelle detektiert werden kann und keine Co-Faktoren benötigt. Es gibt Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass GFP einen Einfluss auf die Proliferation und das Differenzierungspotential von humanen neuronalen Progenitorzellen hat. Diese Berichte postulieren, dass durch GFP artifizielle Resultate entstehen können, da es die Eigenschaften der Zellen verändert (Martinez-Serrano et al., 2001; Martinez-Serrano et al., 2000). Dies konnte aber in der vorliegenden Arbeit und auch in publizierten Daten über die Zelllinie HNSC.100 nicht beobachtet werden (Navarro-Galve et al., 2005).

Für die Etablierung transgener HNSC.100-Zelpopulationen wurden unterschiedliche Transduktionsmethoden verwendet. Über Transfektion und Antibiotikaselektion wurde die Zellpopulation HNSC.pGfa2-EGFP etabliert, welcher aber zu den HNSC.100-Ausgangszellen veränderte Eigenschaften aufweist. Diese Eigenschaften wie die erhöhte endogene GFAP-Expression, die geringere Induzierbarkeit und die morphologischen Veränderungen deuten darauf hin, dass Zellen selektioniert wurden, die in der glialen Entwicklung schon weiter vorangeschritten sind und keine multipotenten neuronalen Progenitorzellen mehr darstellen. Als zweite Methode zur Etablierung einer Reporterzellpopulation wurde ein retrovirales System gewählt. Retrovirale Systeme bieten gegenüber der stabilen Plasmid-Transfektion einige Vorteile wie beispielsweise die relativ sichere Integration der gesamten Genkassette und nur eine Integration pro Zellen in den meisten Fällen, was oft zu moderateren Expressionsleveln führt. Für die Übertragung der Gfa2-egfp Genkassette wurde ein Vektorsystem gewählt, welches auf Foamy Viren aus Primaten basiert (Heinkelein et al., 2002; Heinkelein et al., 1998). Foamy Viren zählen zur Gruppe der Retroviren, besitzen aber eine Replikation, die sie von den anderen Retroviren unterscheidet (Linial, 1999; Rethwilm, 2007). Sie besitzen dabei einige Eigenschaften, die sie zu einem attraktiven und sicheren Vektorsystem machen (Rethwilm, 2007). Die virale LTR des verwendeten Foamy-Vektors ist transkriptionell inaktiv, weshalb ein interner Promotor benötigt wird, um die Expression des Fremdgens nach der Infektion zu kontrollieren. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber anderen retroviralen Vektorsystemen, da der zelltyp-spezifische Gfa2-Promotor übertragen werden kann und keine Interferenzen mit der viralen LTR stattfinden. Foamy-Viren basierende Konstrukte wurden bereits zum Gentransfer zur konstitutiven Genexpression in neuronalen Zellen genutzt (Liu et al., 2005; Liu et al., 2007).

Mittels des foamy-viralen Vektorsystems wurde die Zellpopulation HNSC.FV.Gfa2-EGFP etabliert, die differenzierungs-abhängige Expression des Reportergens EGFP zeigte (Abb. 3.8). Durch die gezielte Differenzierung in Astrozyten konnte die Expression von EGFP in dieser Zellpopulation um den Faktor 16 gesteigert werden, während in der konstitutiv EGFP-exprimierenden Kontrollzellpopulation HNSC.FV.U3-EGFP durch die Differenzierung die Expression des Reportergens eher etwas herunterreguliert wurde (Abb. 3.9). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass foamy-virale Vektoren die Transduktion eines zelltyp-spezifischen Promotor erlauben und dass neurale Progenitorzellen durch diese Vektoren erfolgreich transduziert werden können.

Neben der Betrachtung der astrozytenspezifischen Expression wäre in nachfolgenden Arbeiten die Etablierung weiterer zelltypspezifischer Expressionssysteme sinnvoll. Eine neuronenspezifische Expression könnte über den 2,4 kb großen NSE-Promotor (neuron-specific enolase) erreicht werden und die Enhancer-Region des Nestingens beschränkt die Expression eines Reportergens auf neurale Vorläuferzellen (Tsuchiya et al., 2002; Zimmerman et al., 1994).

4.5 HIV-Persistenz in der neuronalen Progenitorpopulation

Mit Hilfe der humanen Zelllinie HNSC.100 konnte gezeigt werden, dass HIV-1 in neuronalen Progenitorzellen über einen langen Zeitraum persistieren kann und so diese Zellpopulation ein weiteres potentielles Reservoir für das Virus im Gehirn darstellen könnte. Die neurale Progenitorpopulation wurde mittels zellfreien Virusüberstand infiziert und verschiedene Aspekte der Infektion über einen Zeitraum von vier Monaten untersucht (Abb. 3.18, 3.19 und 3.23). In der Arbeit von Lawrence et al., welche bereits die HIV-Infektion primärer neuraler Progenitorzellen betrachtet hatte, wurde die Virusproduktion nach Infektion nur über 13 Tage und nach Transfektion über 28 Tage verfolgt (Lawrence et al., 2004). Die infizierte HNSC.100-Progenitorpopulation überlebte die HIV-Infektion monatelang und wurde nicht durch das Virus getötet. Im Überstand der infizierten Progenitorpopulation konnte etwa 60 Tage lang eine moderate Virusproduktion nachgewiesen werden, danach sank die Produktion von Viren unter die Nachweisgrenze (Abb. 3.18). Auch zu späten Zeitpunkten nach der Infektion, als keine Virusproduktion mehr zu detektieren war, konnte nachgewiesen werden, dass die Progenitorpopulation weiter infiziert blieb. In der Progenitorpopulation konnten sowohl HIV-spezifische RNA-Transkripte als auch

provirale DNA detektiert werden (Abb. 3.23). All dies zeigte, dass HIV-1 neurale Progenitorpopulationen chronisch infizieren kann.

Von entscheidender Bedeutung ist, ob dass von der infizierten Progenitorpopulation freigesetzte Virus noch in der Lage ist, HIV-permissive Zellen erneut zu infizieren. Es konnte gezeigt werden, dass der Zellkulturüberstand der infizierten Progenitorpopulation die Kapazität besaß, die Indikatorzelllinie C8166 produktiv zu infizieren (Daten nicht gezeigt). Dieses Experiment schloss gleichzeitig aus, dass die Zellen mit einem defekten Virusstamm infiziert wurden. Die Restriktion der Virusproduktion in der Progenitorpopulation war demnach zellabhängig.

Nach der Infektion konnten pro 10^4 Progenitorzellen etwa 500-1.000 provirale Kopien quantifiziert werden (Abb. 3.17). Geht man davon aus, dass pro infizierter Zelle nur ein Provirus vorliegt, würde das bedeuten, dass etwa 5-10% der Progenitorzellen mit dem Virus infiziert waren. Nimmt man aber an, dass auch mehrere Proviren pro Zelle integriert sein können, sinkt der Prozentsatz der infizierten Zellen unter 5%. In der Studie von Lawrence et al. waren nach Transfektion der primären neuronalen Progenitorzellen mit dem proviralen Plasmid pNL4-3 trotz Transfektionseffizienzen von etwa 50% nur ca. 0,5% der Zellen infiziert. Ermittelt wurde die Infektionsrate der primären Progenitorzellen drei bis vier Tage nach der Transfektion mittels Immunfärbungen des HIV Proteins p24. In der *in vivo*-Studie von Schwartz et al. wird eine Infektionsrate von 1,5% vorgeschlagen (Schwartz et al., 2007). Die in dieser Arbeit ermittelte Infektionsrate ($\leq 5-10\%$) der neuronalen Progenitorzellen liegt demnach über den bereits veröffentlichten Infektionsraten. Mögliche Gründe hierfür sind die unterschiedlichen betrachteten Zeitpunkte (in dieser Studie war der früheste Zeitpunkt 28 Tage nach Infektion) oder auch die unterschiedlichen Methoden, welche zur Detektion der Infektion verwendet wurden. Die hier verwendete Bestimmung der proviralen DNA-Kopien mittels Real-Time PCR stellt eine wesentlich sensitivere und auch quantitativere Methode als Immunfärbungen dar.

Diese Ergebnisse lassen aber insgesamt vermuten, dass nur eine spezielle Subpopulation der neuronalen Progenitorpopulation die HIV-Infektion unterstützt. Diese Annahme gibt es auch bei der Infektion von Astrozyten, es konnten aber noch keine verlässlichen Marker bestimmt werden, die diese Population charakterisieren (Kim et al., 2004). In nachfolgenden Untersuchungen sollte versucht werden, die HIV-infizierte Subpopulation der neuronalen Progenitorpopulation lebend zu isolieren und dann zu charakterisieren. Eine Möglichkeit wäre die Subklonierung infizierter

Progenitorzellen. Die chronisch infizierte Astrozytomzelllinie TH4-7-5 konnte so in drei aufeinander folgenden Schritten im Einzelzellverfahren erfolgreich etabliert werden (Brack-Werner et al., 1992). Es wurde bereits versucht, diese Methodik für die infizierte Progenitorpopulation anzuwenden, sie führte aber bis jetzt nicht zum Erfolg (Daten nicht gezeigt). Die neuronalen Progenitorzellen scheinen die Anwesenheit und die freigesetzten Stoffe weiterer Progenitorzellen zum Überleben und zur Proliferation zu benötigen. Weiter könnte das zur Messung der Rev-Aktivität verwendete Reporterkonstrukt pLRed(INS)₂R verwendet werden, um infizierte Progenitorzellen zu isolieren. Ein ähnliches System, welches in lentiviralen Vektoren die HIV-abhängige Expression eines Rev-abhängigen-Reporterkonstrukts vermittelt, erlaubte bereits die Detektion von replizierendem HIV in lebenden Zellen (Wu et al., 2007). HIV-infizierte Zellen, welche das Reporterkonstrukt exprimieren, könnten als rot-fluoreszierende Population mittels FACS herausortiert werden. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass die infizierten Zellen die beiden HIV-Proteine Rev und Tat bilden. Eine weitere Herangehensweise wäre die Selektion der infizierten Zellen über eine HIV-abhängig exprimierte Antibiotikaresistenz. Hierfür konnte bereits ein Konstrukt kloniert werden, welche die Hygromycin B-Phosphotransferase unter der Kontrolle der viralen HIV-LTR exprimiert. Die Hygromycin B-Phosphotransferase vermittelt die Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin B.

4.6 Reaktivierung der Virusproduktion von latent infizierten Progenitorzellen

Ein wichtiger Punkt für das Virus bei viralen Zellreservoirs ist, dass es möglich sein muss, die persistent infizierten Zellen wieder zur Virusproduktion anzuregen, um so andere HIV-permissive Zellen mit dem Virus zu infizieren. In verschiedenen Reservoirzellen wie z.B. Astrozyten kann die Transkription von HIV-1 durch extrazelluläre Signale wie z.B. inflammatorische Zytokine wieder reaktiviert werden (Atwood et al., 1994; Blankson et al., 2002; Kleinschmidt et al., 1994; Sabri et al., 1999; Tornatore et al., 1994; Tornatore et al., 1991; Vicenzi et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es möglich ist, die Virusproduktion der permanent HIV-infizierten neuronalen Progenitorpopulation wieder zu reaktivieren. Sowohl durch die Induktion der Differenzierung in Astrozyten und als auch durch die Behandlung mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α konnte die Virusproduktion wieder angeregt werden (Abb. 3.18, 3.20 und 3.21). Beide Phänomene wurden auch schon von Lawrence et al. beschrieben, allerdings zu

früheren Zeitpunkten nach der Infektion (Lawrence et al., 2004). Drei, vier und fünf Wochen nach Transfektion mit dem proviralen Plasmid pNL4-3 konnte durch Stimulation mit TNF- α eine zwei- bis dreifache Erhöhung der Virusproduktion in den primären neuronalen Progenitorzellen induziert werden. Bei der infizierten HNSC.100-Zellpopulation konnte 96 Tage nach Infektion eine 2,7-fache Steigerung der Virusproduktion durch TNF- α erreicht werden (Abb. 3.21). Dass dieser restimulatorische Effekt spezifisch für inflammatorische Zytokine sein könnte, konnte dadurch gezeigt werden, dass das Zytokin CNTF keinen Einfluss auf die Virusreplikation hatte. Auch die Behandlung mit IFN- γ hatte keinen Effekt auf die Virusproduktion der primären neuronalen Progenitorzellen (Lawrence et al., 2004).

Auch die Induktion der Virusproduktion durch Astrozytendifferenzierung wurde bereits in den primären Gehirnzellen untersucht (Lawrence et al., 2004). Zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 und Tag 7 nach Transfektion mit pNL4-3) wurde die Differenzierung in Astrozyten induziert. Für mindestens zehn Tage war eine höhere Virusproduktion (5-fach) in den Astrozyten verglichen mit den Progenitorzellen zu messen. In der vorliegenden Arbeit führte die Astrozytendifferenzierung der infizierten neuronalen Progenitorpopulation 35 und 69 Tage nach der Infektion zu einer gesteigerten Virusproduktion (Abb. 3.18 und 3.20). Über einen Zeitraum von 19 Tage konnten vermehrt Viruspartikel im Überstand detektiert werden, danach wurde die Virusproduktion in den Zellen wieder restringiert. Die maximale Steigerung betrug acht Tage nach der Induktion die 5-fache Virusmenge. Da nicht an allen Tagen nach der Induktion der Astrogenese die Virusproduktion gemessen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass zu früheren oder späteren Zeitpunkten eine noch höhere Produktion an Viren stattfand.

NF- κ B als möglicher aktivierender Signalweg, der zur Induktion der Virusproduktion führt

Diese Ergebnisse deuten auf ein dynamisches Modell während der Astrozytendifferenzierung hin, bei der HIV-stimulatorische wie auch HIV-inhibierende Prozesse stattfinden. Zuerst dominieren bei der Astrogenese Mechanismen, welche die HIV-Produktion stimulieren, zu späteren Zeitpunkten überwiegen wieder die für Astrozyten typischen restringierenden Mechanismen. Die molekularen Vorgänge, die dabei stattfinden, sind wahrscheinlich sehr komplex. In dieser Arbeit wurde ein möglicher HIV-stimulierender Signalweg betrachtet.

Bei der Aktivierung latent-infizierter Reservoirzellen ist der zelluläre Transkriptionsfaktor NF- κ B von entscheidender Bedeutung (Qi et al., 2007; Victoriano et al., 2006; Williams et al., 2007). Der HIV-Promotor, die HIV LTR, besitzt in der U3 Region zwei NF- κ B Bindungsstellen, welche die basale HIV Transkription, neben drei Bindungsstellen für den zellulären Transkriptionsaktivator SP1, regulieren (Geeraert et al., 2008; Nekhai and Jeang, 2006; Pereira et al., 2000). Verschiedene zelluläre Prozesse aktivieren die HIV-Transkription über Stimulierung des zellulären Transkriptionsfaktors NF- κ B. Zu den Stimuli, die eine Aktivierung von NF- κ B auslösen können, zählen Zytokine wie TNF- α und CNTF (Ernfors, 2000; Middleton et al., 2000; Van Lint et al., 2004). Nach Aktivierung wird NF- κ B in den Nukleus der Zellen rekrutiert, bindet dort an die HIV-LTR und initiiert somit die Transkription von HIV-Genen.

Bei der Suche nach Mechanismen, welche zur Induktion der Virusproduktion durch die Astrozytendifferenzierung führen, lag es nahe, die Aktivierung dieses entscheidenden Transkriptionsfaktors zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung der neuralen Progenitorpopulation zu Astrozyten zu einer Aktivierung von NF- κ B führte, d.h. der Transkriptionsfaktor war vermehrt im Zellkern der differenzierenden Zellen zu finden (Abb. 3.22). Allerdings wurden nur sehr frühe Zeitpunkte nach Induktion der Astrozytendifferenzierung untersucht. Auch in primären humanen neuralen Progenitorzellen konnten bereits zwei Stunden nach Beginn der Astrozytendifferenzierung erhöhte NF- κ B-Level im Nukleus der Zellen detektiert werden (Lawrence et al., 2006). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass durch die Differenzierung in Astrozyten und die damit verbundene Aktivierung von NF- κ B die Expression des Chemokins CCL2/MCP-1 erhöht wird. Als Kontrolle zur tatsächlichen Aktivierung der Genexpression durch NF- κ B bei Astrozytendifferenzierung in der Zelllinie HNSC.100 sollte die Expression dieser Chemokins in weiteren Versuchen analysiert werden.

Sowohl in unseren Experimenten als auch in den Studien von Lawrence et al. führte die Behandlung der neuralen Progenitorzellen mit TNF- α zu einer höheren Aktivierung von NF- κ B verglichen mit der Aktivierung nach Astrozytendifferenzierung (Lawrence et al., 2006). Dies steht im Gegensatz zur Induktion der Virusproduktion, die nach Astrozytendifferenzierung deutlich höher war als nach Stimulation mit TNF-

α . Bei der Differenzierung in Astrozyten sind also sehr wahrscheinlich noch weitere Signalwege beteiligt, welche die HIV-Transkription aktivieren.

***In vivo*-Situation im HIV-infizierten Gehirn**

Es stellt sich die grundsätzlich Frage, ob im HIV-infizierten Gehirn überhaupt Bedingungen herrschen, die zu einer Reaktivierung der Virusproduktion von latent infizierten neuronalen Progenitorzellen führen könnten.

In den Gehirnen HIV-infizierter Patienten werden vermehrt TNF- α und andere inflammatorische Zytokine produziert (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005; Kramer-Hammerle et al., 2005c). Das HIV-Protein gp120 stimuliert in Astrozyten und Mikroglia CXCR4-abhängige Signalwege und als Antwort setzen die Zellen vermehrt TNF- α frei (Bezzi et al., 2001; Volterra and Meldolesi, 2005). Dies könnte zur Induktion der Virusproduktion von infizierten neuronalen Progenitorzellen führen.

Die Differenzierung von Progenitorzellen findet im Gehirn in Abhängigkeit von der zellulären Umgebung statt (Flax et al., 1998; Song et al., 2002). Im HIV-infizierten Gehirn setzen aktivierte Astrozyten eine Vielzahl an Molekülen und Wachstumsfaktoren frei und locken so neurale Progenitorzellen an und beeinflussen auch die Differenzierung der Zellen. Es wurde gezeigt, dass von aktivierten Astrozyten ausgeschüttete Faktoren die Astrozytendifferenzierung von neuronalen Progenitorzellen induzieren (Fajerson et al., 2006). Im Überstand der aktivierten Astrozyten konnten erhöhte Level an LIF und CNTF gefunden werden, beides bekannte Induktoren der astrozytären Differenzierung. Die erhöhte Expression von CNTF in aktivierten Astrozyten nach Gehirnverletzungen wurde schon mehrfach gezeigt (Ip et al., 1993; Lee et al., 1998; Liberto et al., 2004; Rudge et al., 1994). Auch aktivierte Mikrogliazellen, welche konzentriert in verletzten Gehirnregionen zu finden sind, locken neurale Progenitorzellen an und haben Einfluss auf die Differenzierung der Zellen (Aarum et al., 2003). Im HIV-infizierten Gehirn herrschen also Bedingungen, welche die Differenzierung der infizierten neuronalen Progenitorzellen in Astrozyten veranlassen und somit zu einer erhöhten Virusfreisetzung führen könnten.

4.7 Vergleich der HIV-Infektion von neuronalen Progenitorzellen und Astrozyten

Vergleicht man die HIV-Infektion der neuronalen Progenitorpopulation mit der Infektion von Astrozyten so lassen sich einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede feststellen.

4.7.1 Chemokinexpression

Die Analyse der Expression möglicher HIV-relevanter Rezeptoren in der neuronalen Progenitorpopulation als auch in der Astrozytenpopulation der Zelllinie HNSC.100 ergab, dass beide Zellpopulationen den HIV-Korezeptor CXCR4 auf der Zelloberfläche exprimieren. In beiden Populationen konnte aber keine Expression des HIV-Rezeptors CD4, des Korezeptors CCR5 und möglicher alternativer Rezeptoren, welchen den Eintritt von HIV in die Zelle erleichtern könnten, nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.2).

Die Expression des HIV-Korezeptors CXCR4 konnte in den Progenitorzellen auf Protein- (60% CXCR4 positiv) und RNA-Ebene gezeigt werden (Abb. 3.15). Nach der Differenzierung nahm die Expression von CXCR4 ab, es wurden geringere Mengen des Rezeptors auf der Zelloberfläche der Astrozyten detektiert (13% positiv). Jedoch konnten keine CXCR4-spezifischen RNA-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Ein möglicher Grund für diese Diskrepanz zwischen RNA und Protein könnte sein, dass der Nachweis der CXCR4-spezifischen RNA ineffizient war, da ein relatives langes PCR-Produkt entstand. Geringere RNA-Mengen könnten deshalb nicht ausgereicht haben, um nachweisbare Mengen an PCR-Produkt zu produzieren. Die Ergebnisse mit der Zelllinie HNSC.100 bestätigen, was schon mehrfach in anderen murinen und auch humanen Zellkultursystemen für neurale Vorläuferzellen gezeigt wurde, nämlich dass neurale Progenitorzellen auf ihrer Zelloberfläche CXCR4 produzieren (Lawrence et al., 2004; Ni et al., 2004; Peng et al., 2004; Tran et al., 2004). Lawrence et al. zeigten in ihrer Publikation, dass 90% der von ihnen verwendeten primären neuronalen Progenitorzellen eine Expression von CXCR4 zeigen. Nach Differenzierung der Progenitorzellen in Astrozyten nahm auch bei ihnen sowohl die Anzahl an CXCR4-positiven Zellen als auch das Expressionslevel ab (Lawrence et al., 2004).

Üblicherweise geschieht der Eintritt von HIV in Zielzellen über die Interaktion des Envelope-Proteins gp120 mit dem zellulären Rezeptoren CD4. Dieser effiziente Mechanismus kann durch die fehlende Expression von CD4 in den neuronalen

Progenitorzellen nicht stattfinden. Auch bei der Infektion von Astrozyten und Neuronen findet ein CD4-unabhängiger Eintritt in die Zellen statt (Alvarez Losada et al., 2002). Zahlreiche alternative Rezeptoren sind für einen möglichen Eintritt von HIV in diese Zellen beschrieben (260kD-Rezeptor, 65kD-Rezeptor, Galactosylceramide, Mannoserezeptor, D6-Rezeptor) (Kramer-Hammerle et al., 2005c; Liu et al., 2004; Neil et al., 2005). Ob CXCR4 tatsächlich bei der CD4-unabhängigen Infektion von neuralen Progenitorzellen eine Rolle spielt, wurde noch nicht untersucht. Es könnte auch eine nicht-rezeptor vermittelte Infektion der Zellen stattfinden, wie sie für Astrozyten vorgeschlagen wird (Clarke et al., 2006). Es wurde bereits nachgewiesen, dass der CD4-unabhängige Viruseintritt nicht der Grund für die kaum stattfindende Virusproduktion ist. Nach Transfektionen mit dem proviralen Plasmid pNL4-3 mit Transfektionseffizienzen von 50-60% zeigten die primären neuralen Progenitorzellen auch eine restringierte Virusproduktion (Lawrence et al., 2004). In weiteren Studien sollte mit Hilfe von Blockierungsexperimenten untersucht werden, ob der Chemokinrezeptor CXCR4 auf der Zelloberfläche der Progenitorzellen für den Viruseintritt relevant ist. Zusätzlich sollten auch Infektionen mit makrophagentropen HI-Viren durchgeführt werden, da diese im Gehirn dominieren (Jones and Power, 2006).

4.7.2 Infektionsrate

Die Infektionsraten beider Zellpopulationen liegen in der gleichen Größenordnung. Die Provirusuntersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass etwa 10% der Zellen der Astrozytenpopulation als auch der Progenitorpopulation 28 Tage nach der Infektion mit dem Virus infiziert waren (unter der Annahme von einem Provirus pro Zelle) (Abb. 3.17).

Es ist durch *in-vivo* Studien als auch durch Arbeiten mit primären fetalen Astrozyten bekannt, dass etwa 1% der Astrozyten HIV-positiv sind bzw. Virusexpression zeigen (Bencheikh et al., 1999; Brack-Werner et al., 1992; Kim et al., 2004; Li et al., 2007; Nuovo et al., 1994; Takahashi et al., 1996; Trillo-Pazos et al., 2003). Diese Infektionsrate erscheint nicht sehr hoch. Bezieht man jedoch in Betracht, dass 50% der Gehirnzellen Astrozyten darstellen und somit etwa 10^{11} - 10^{12} Astrozyten im Gehirn vorhanden sind, so wirkt die Zahl an potentiellen Zielzellen für das Virus wieder sehr viel größer. Kann dann der geringe Prozentsatz an chronisch infizierten neuralen Progenitorzellen *in vivo* überhaupt von Bedeutung sein, wenn man in

Betrachtet zieht, dass diese Zellen nur in bestimmten Gehirnregionen und auch in wesentlich geringeren Zahlen vertreten sind? Der entscheidende Unterschied zu Astrozyten ist, dass neurale Progenitorzellen proliferieren und somit ein selbsterneuerndes Reservoir für das Virus darstellen können. Deshalb könnte eine Amplifikation des Virus stattfinden. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, war die infizierte Progenitorpopulation weiterhin in der Lage zu proliferieren (Abb. 3.29).

4.7.3 Verlauf der Virusproduktion und Virusreaktivierung

Nach der HIV-Infektion zeigte sowohl die Astrozytenpopulation als auch die neurale Progenitorpopulation eine anfängliche schwache Virusproduktion. Während aber die infizierten Astrozyten bereits nach zehn Tagen keine Virusproduktion mehr zeigten, konnte im Überstand der neuralen Progenitorpopulation bis 60 Tage nach der Infektion das Virus detektiert werden (Abb. 3.16). Dies deutet darauf hin, dass Astrozyten zelltypspezifische zelluläre Faktoren besitzen, die zu einer früheren Restriktion der Virusproduktion führen. Zwischen den beiden Zellpopulationen bestehen also zelluläre Unterschiede, die einen Einfluss auf die HIV-Replikation ausüben. Ein weiterer Aspekt, der dies zeigt, ist die Tatsache, dass durch die Differenzierung der Progenitorpopulation in Astrozyten die Virusproduktion induziert wird.

Durch den Vergleich mit chronisch HIV-infizierten Zelllinien konnte die anfänglich stattfindende Virusproduktion der neuralen Progenitorpopulation eingeordnet werden: die chronisch infizierte T-Lymphozytenzelllinie KE37/1-IIIB produzierte etwa 90 mal mehr Viren als die neurale Progenitorpopulation, während die persistent infizierte Astrozytomzelllinie TH4-7-5 weniger Viren produzierte. Hierbei muss aber beachtet werden, dass bei den chronisch infizierten Zelllinien alle Zellen mit dem Virus infiziert sein sollten, während bei der infizierten Progenitorpopulation nur ein gewisser Prozentsatz der Zellen HIV-positiv war. Die infizierte neurale Progenitorpopulation produzierte (wie auch infizierte Astrozyten) während der akuten Infektion sehr viel weniger HIV als HIV-permissive Zellen wie T-Zellen (Brack-Werner et al., 1992; Gorry et al., 1999; McCarthy et al., 1998).

Die Steigerung der Virusproduktion durch $\text{TNF-}\alpha$ in der infizierten Progenitorpopulation (2,7-fach) war vergleichbar mit der Steigerung in der Astrozytomzelllinie TH4-7-5 (2,0-fach) (Abb. 3.21). Dieses Induktionslevel wurde

bereits für die Zelllinie TH4-7-5 in der Literatur beschrieben (Kleinschmidt et al., 1994).

4.7.4 Biologische Eigenschaften des HIV-Proteins Rev

Die beiden HNSC.100-Populationen wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften in Bezug auf das HIV-Protein Rev untersucht. Rev ist ein posttranskriptionell wirkender Transaktivator, der für die zeitliche Regulation der Genexpression von HIV-1 während des Replikationszykluses essentiell ist (Kjems and Askjaer, 2000). Mit Ausnahme der Synthese des Rev-Proteins selbst sowie der Proteine Tat und Nef ist die Synthese aller viralen Strukturproteine und späten Regulationsproteine von der Aktivität von Rev abhängig. In Astrozyten werden zelluläre inhibitorische Faktoren vermutet, die sowohl die Lokalisation als auch die Funktionalität von Rev in diesen Zellen spezifisch verändern (Ludwig et al., 1999; Neumann et al., 2001; Neumann et al., 1995). Die zytoplasmatische Akkumulation von Rev in Astrozyten ist nicht, wie zuerst angenommen, die primäre Ursache für die inhibierte Funktion, kann aber ein Marker für die Inhibition sein (Wolff et al., 2006). Hier konnte gezeigt werden, dass sich die differenzierte Astrozytenpopulation verhält wie alle bisher untersuchten Astrozytomzelllinien und fötalen Astrozyten: Rev akkumuliert nicht nur in den Nukleoli, sondern auch im Zytoplasma der Zellen und zeigt eine geringe Aktivität (Abb. 3.11 und 3.12). Die neurale Progenitorpopulation verhält sich hingegen anders: in diesen neuronalen Zellen ist Rev -wie in HIV-permissiven Zellen- vermehrt im Zellkern lokalisiert und die Funktion von Rev ist nicht gehemmt.

Es bestehen demnach zelluläre Unterschiede zwischen der Astrozyten- und der Progenitorpopulation, welche das Verhalten des HIV-Proteins Rev beeinflussen. In Astrozyten wurden bereits zwei Faktoren beschrieben, welche für die verminderte Rev-Aktivität verantwortlich sein könnten. Zum einen der Faktor Sam68 („68kDa-Scr-associated protein in mitosis“). Die Überexpression von Sam68 stellte die Funktion von Rev in der Astrozytomzelllinie U87MG wieder her, führte aber nur zu einem geringen Anstieg der HIV Virusproduktion (Li et al., 2002). Die RNA Helikase DDX1 (DEAD Box Protein) ist der zweite Faktor. Es wurde gezeigt, dass DDX1 mit Rev interagiert und die Überexpression von DDX1 in Astrozyten veränderte die intrazelluläre Verteilung von Rev (zytoplasmatisch zu nukleär) und erhöhte die Virusproduktion (Fang et al., 2005; Fang et al., 2004). Ein direkter Einfluss von DDX1 auf die Aktivität von Rev wurde allerdings noch nicht gezeigt. In der vorliegenden

Arbeit wurde nun die Expression dieser beiden Faktoren in der Progenitor- und in der Astrozytenpopulation untersucht (Abb. 3.13). Es konnten hohe Expressionslevel des Faktors Sam68 sowohl in den beiden HNSC.100-Populationen als auch in der Astrozytomzelllinie U251MG gefunden werden. Dies steht im Gegensatz zu den bereits veröffentlichten Daten, die eine geringe Expression von Sam68 in Astrozyten postulieren (Li et al., 2002). In der Veröffentlichung wurde aber nur die Expression in einer Astrozytomzelllinie (U87MG) betrachtet. Es konnten weiter keine Unterschiede in der Produktion von Sam68 in den beiden HNSC.100-Populationen detektiert werden, während sich die Produktion von DDX1 deutlich unterschied. Sowohl in den U251MG als auch in der Astrozytenpopulation konnte eine geringere Expression als in der Progenitorpopulation festgestellt werden. DDX1 könnte daher einer der Faktoren sein, welche für die phänotypischen Unterschiede bezüglich der HIV-Infektion der beiden neuronalen Zellpopulationen verantwortlich sind. Überexpressionsexperimente mit DDX1 in der Astrozytenpopulation könnten zeigen, ob die Aktivität von Rev dadurch wieder hergestellt werden kann.

4.8 Zelluläre Veränderungen der HIV-infizierten Progenitorpopulation

In der vorliegenden Arbeit wurde ermittelt, ob die persistente HIV-Infektion die neurale Progenitorpopulation verändert. Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion Einfluss auf biologische Eigenschaften der neuronalen Progenitorzellen hat und somit eventuell die neuronalen Progenitorzellen in spezifischen Funktionen verändern kann. Dieser Aspekt könnte zur Neuropathologie von HIV beitragen.

Die HIV-infizierte Progenitorpopulation unterschied sich in verschiedenen Eigenschaften von nicht-infizierten Progenitorzellen. Im Verlauf der Infektion nahm die Expression des Astrozytenmarkers GFAP zu (Abb. 3.24 und 3.25). Zusätzlich besaßen die Zellen der infizierten Progenitorpopulation verglichen mit nicht-infizierten Zellen im Durchschnitt eine signifikant andere Zellmorphologie (Abb. 3.27 und 3.28). Ob dabei die gesamte Zellpopulation eine Veränderung der Zellform aufwies, oder nur eine bestimmte Subpopulation betroffen war, war nicht eindeutig zu klären. Diese morphologischen Veränderungen waren im Durchschnitt aber weniger ausgeprägt als die Veränderungen, die mit der Differenzierung in Astrozyten einhergehen. Da GFAP ein Protein des Zytoskeletts ist, könnte die erhöhte Produktion mit der veränderten Zellmorphologie zusammenhängen. Die infizierte Progenitorpopulation unterschied sich von uninfizierten Progenitorzellen nicht in der Expression folgender

Marker: CXCR4, AQP4, S100 β und Nestin (Abb. 3.26). Auch im Proliferationsverhalten der beiden Progenitorpopulationen konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.29).

Erhöhung der GFAP-Expression

Zwei Studien, die sich bereits mit der Infektion von neuronalen Progenitorzellen befassten, zeigen auch einen Bezug zu GFAP. Im Mausmodell konnte eine erhöhte GFAP-Expression in neuronalen Progenitorzellen detektiert werden, die mit einem Vektor infiziert wurden, welcher das Env-Protein eines neurovirulenten HIV-Stamms kodierte. Bereits nach 24 Stunden konnte in den Zellen die erhöhte GFAP-Expression festgestellt werden (van Marle et al., 2005). Iwata et al. untersuchten die SIV-Infektion (Simianes Immundefizienzvirus) von neuronalen Progenitorzellen aus Makaken. Um zu sehen, welche Zellen infiziert waren, wurde ein Virusstamm verwendet, welcher ein GFP-gekoppeltes Nef-Protein kodiert. So stellte sich in der Immunfärbung heraus, dass die meisten GFP-positiven (= infizierten) Zellen auch GFAP-positiv waren und zusätzlich das virale SIV-Protein p27 koexprimierten (Iwata et al., 2007). Und Peng et al. zeigten, dass von infizierten Makrophagen konditioniertes Medium die GFAP-Expression von humanen neuronalen Progenitorzellen erhöht (Peng et al., 2008).

Die erhöhte GFAP-Expression der infizierten Progenitorpopulation wirft die Frage auf, ob die in *in vivo*-Studien identifizierten, infizierten Astrozyten auch wirklich Astrozyten und nicht infizierte Progenitorzellen waren. In allen Studien, welche die HIV-Infektion von Astrozyten *in vivo* nachwiesen, wurden die Astrozyten über den Zytoskelettmarker GFAP identifiziert (Kramer-Hammerle et al., 2005c). Es ist deshalb bis jetzt unklar, ob HIV auch GFAP-negative Astrozyten infiziert. Ein Teil der GFAP-positiven Zellen in denen HIV-Marker detektiert wurden, könnten nach unseren neuen Erkenntnissen auch neurale Progenitorzellen darstellen. Dass die Identifizierung infizierter neuraler Zellen über spezielle neurale Marker ein Problem darstellen kann, konnten auch Radja et al. zeigen. Sie wiesen nach, dass das HIV-Protein Nef die Expression Oligodendrozyten-spezifischer Marker erniedrigt (Radja et al., 2003). Dadurch könnte es schwer sein, infizierte Oligodendrozyten im HIV-infizierten Gehirn nachzuweisen.

In vivo-Studien zeigen auch, dass in Gehirnen HIV-infizierter Patienten, die an HAD leiden, Astrozyten-spezifische Marker vermehrt exprimiert werden. Zum einen wurde

eine erhöhte Expression von AQP4 gefunden (St Hillaire et al., 2005). Eine weitere Studie konnte signifikant mehr GFAP-positive Zellen in der grauen und weißen Gehirnmasse in infizierten Patienten mit HIV-Enzephalopathie beobachten, wobei davon ausgegangen wird, dass es sich dabei um aktivierte Astrozyten handelt (Anderson et al., 2003). Die Anzahl an GFAP-positiven Astrozyten korrelierte dabei mit der Stärke der kognitiven Einschränkungen der Patienten. Nef-positive und damit infizierte Astrozyten wurden in der weißen Substanz identifiziert, sie korrelierten aber nicht mit der Stärke der Erkrankung und waren nur zahlreich in einem Patienten ohne antivirale Behandlung.

Einfluss von HIV auf die Genexpression neuraler Zellen

Dass das HI-Virus einen Einfluss auf die Expression zahlreicher Gene in neuronalen Zellen hat, wurde schon mehrfach beschrieben. Der Vergleich infizierter fötaler Astrozyten mit nicht-infizierten Astrozyten konnte zeigen, dass die HIV-Infektion die Genexpression in Astrozyten verändert. Zahlreiche Gene wurden in den infizierten Astrozyten geringer oder auch vermehrt exprimiert (Galey et al., 2003; Kim et al., 2004; Su et al., 2002; Su et al., 2003; Wang et al., 2004). Auch die Behandlung von Astrozyten mit dem HIV-Protein gp120 veränderte das Genexpressionsprofil (Galey et al., 2003; Kim et al., 2004; Su et al., 2002). Dies zeigt, dass schon allein die Interaktion von HIV mit der Zelloberfläche ausreicht, um inhibitorische Effekte auszuüben und die Expression neuraler Zellen zu verändern. Es muss dafür keine HIV-Replikation stattfinden. Durch die veränderte Genexpression können Astrozyten nicht mehr ihren üblichen Aufgaben nachgehen und tragen so zur Neuropathogenese bei der HIV-Infektion bei. Ein Beispiel ist die Herunterregulierung des Glutamat-Transporters EAAT2 (*excitatory amino acid transporter 2*). Sowohl HIV als auch gp120 führen in fötalen humanen Astrozyten zu einer Herunterregulierung des EAAT2-Transporters. Dadurch kann der Neurotransmitter Glutamat nicht mehr oder nur noch verringert von den Astrozyten aufgenommen werden (Wang et al., 2003).

Bedeutung der erhöhten GFAP-Expression: Differenzierung oder Aktivierung?

Was die erhöhte Expression von GFAP für die neurale Progenitorpopulation bedeutet, ist bis jetzt unklar. Es könnte einerseits sein, dass durch die Infektion die Differenzierung der Zellen induziert wird. Es gibt aber mehrere Indizien, die dagegen

sprechen. Die Expression der beiden anderen untersuchten astrozytenspezifischen Marker, AQP4 und S100 β , war in der infizierten Progenitorpopulation nicht erhöht. Auch die Produktion des Oberflächenrezeptors CXCR4 blieb unverändert, die bei Differenzierung in Astrozyten herunterreguliert wird. Zusätzlich veränderte sich die Morphologie der Zellen bei Differenzierung intensiver. Andererseits könnte es deshalb auch sein, dass die Zellen durch die Infektion nicht terminal differenziert werden, sondern nur in die gliale Richtung gelenkt werden. Vielleicht werden gliogene Vorläuferzellen selektioniert, die für die gliale Differenzierung festgelegt sind. Um diese Hypothese zu bestätigen, sollten weitere zelluläre Marker untersucht werden, wie z.B. der Marker A2B5, welcher gliogene Progenitorzellen charakterisiert (Rao et al., 1998).

Ein Kennzeichen aktivierter Astrozyten ist die erhöhte GFAP-Produktion. Sie findet als Antwort auf die HIV-Infektion des Gehirns statt (Anderson et al., 2003; O'Callaghan and Sriram, 2005). Die neurale Progenitorpopulation zeigt somit das gleiche Verhalten wie reife Astrozyten. Die erhöhte GFAP-Produktion könnte deshalb auch ein Zeichen für die Aktivierung der Zellen sein.

Ob durch die veränderte GFAP-Expression die Zellen der infizierten Progenitorpopulation in bestimmten Funktionen gehemmt sind, ist noch unklar. Die gestörte Differenzierung der Zellen in reife Neuronen könnte aber ein erster Hinweis darauf sein.

Mögliche Induktoren der erhöhten GFAP-Expression

Die GFAP-Expression stieg auch in Zellen der infizierten Progenitorpopulation, die nicht mit dem Virus infiziert waren. Die Bestimmung der Proviruskopienzahl zeigte, dass nur etwa jede fünfte Zelle mit dem Virus infiziert war. Die erhöhte GFAP-Expression konnte aber auf Einzelzellebene im Großteil der Progenitorzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.25). Die Infektion an sich war deshalb nicht der Grund für die erhöhte GFAP-Expression.

Zelluläre Faktoren

Eine Möglichkeit, wie es zu der Induktion der GFAP-Expression in den nicht-infizierten Progenitorzellen kommt, könnte sein, dass die infizierten Progenitorzellen durch die Infektion vermehrt bestimmte Zytokine oder Chemokine ausschütten. Diese können dann auf andere Zellen der infizierten Progenitorkultur wirken und die GFAP-

Expression induzieren. Infizierte oder auch aktivierte Astrozyten im HIV-infizierten Gehirn zeigen eine erhöhte Produktion und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Cota et al., 2000; Kramer-Hammerle et al., 2005c). Diese freigesetzten Faktoren können wiederum weitere Zellen im Gehirn aktivieren. Bereits die Bindung von HIV-1 an Astrozyten reicht aus, die Zytokin-Expression der Zellen zu verändern. Nach HIV-Bindung wird z.B. die IL6- und IL8-Produktion in Astrozyten erhöht (Li et al., 2007). In weiteren Versuchen sollte die intra- und extrazelluläre Produktion verschiedener relevanter Zytokine und Chemokine der uninfizierten Progenitorpopulation und der infizierten Progenitorpopulation über Zytokinarrays untersucht und verglichen werden, um einen möglichen Induktor der erhöhten GFAP-Produktion wie z.B. CNTF oder TNF- α zu identifizieren (Peng et al., 2008).

Virale Faktoren

Die von den infizierten Progenitorzellen freigesetzten Faktoren, welche die GFAP-Expression der nicht-infizierten Progenitorzellen beeinflussen, könnten aber auch bestimmte HIV-Proteine sein. Die Wirkung diverser viraler Proteine auf Neuronen und Astrozyten wurden schon in zahlreichen Studien untersucht. Besonders die beiden frühen akzessorischen Proteine Tat und Nef scheinen auf neurale Zellen einen Einfluss zu haben (Jones and Power, 2006; Kramer-Hammerle et al., 2005c). Es konnte bereits für beide Proteine gezeigt werden, dass sie die GFAP-Expression in Astrozyten erhöhen (Kohleisen et al., 1999; Zhou et al., 2004).

Tat kann die Genexpression zahlreicher zellulärer Gene verändern (Brigati et al., 2003; Chauhan et al., 2003; Huigen et al., 2004). Verschiedenste Effekte sowohl von intra- und als auch extrazellulärem Tat auf die Funktionen von Gehirnzellen wurden bereits gezeigt (Buch et al., 2007; King et al., 2006; Minghetti et al., 2004; Nath, 2002; Rappaport et al., 1999). Extrazelluläres Tat konnte im Gehirn von Patienten mit HAD detektiert werden (Hudson et al., 2000; Wiley et al., 1996). Das neurotoxische HIV-Protein wird aktiv durch infizierte Zellen wie Astrozyten sekretiert und kann durch uninfizierte Zellen wie z.B. Neuronen aufgenommen werden (Chauhan et al., 2003; Kim et al., 2003; Liu et al., 2000; Zhou et al., 2004).

Auch Nef kann die Expression zahlreicher Gene verändern und wird von infizierten Zellen freigesetzt (Fujii et al., 1996; Greenway et al., 2003; Shaheduzzaman et al., 2002). Verschiedenste Effekte von extrazellulärem Nef auf neurale Zellen konnten

gezeigt werden: es induziert z.B. in Astrozyten und neuronalen Zelllinien die Freisetzung von proinflammatorischen Faktoren und die Produktion des Komplementfaktors C3 (Olivetta et al., 2003; Speth et al., 2002). Die Überexpression von Nef verändert in Astrozyten verschiedene Signalwege und die Morphologie der Zellen (Kohleisen et al., 1999; Kramer-Hammerle et al., 2005b). Im Mausmodell wurde bereits der Einfluss von Nef auf neurale Progenitorzellen untersucht. Nef-exprimierende Progenitorzellen besaßen eine erhöhte Tumorgenizität (Kramer-Hammerle et al., 2001).

Ein möglicher Kandidat für die Induktion von GFAP könnte auch das Envelope-Protein von HIV sein, das bei Überexpression in murinen neuronalen Progenitorzellen zu einer erhöhten GFAP-Expression führte (van Marle et al., 2005). Dagegen spricht aber, dass die GFAP-Expression in der infizierten Progenitorpopulation anstieg, während die HIV-Produktion der Population abnahm.

In der infizierten Progenitorpopulation konnten Tat- und Nef-spezifische als auch Env-spezifische RNAs 80 Tage nach der Infektion nachgewiesen werden (Abb. 3.21). Es sollte untersucht werden, ob diese HIV-Proteine einen Einfluss auf die GFAP-Expression der neuronalen Progenitorzellen haben. Einerseits könnte mit Hilfe der foamyviralen Vektoren stabile Nef- und Tat-exprimierende Zellpopulationen etabliert werden, andererseits sollte auch der Einfluss von extrazellulären Tat und Nef auf die neuronalen Progenitorzellen getestet werden. Erst kürzlich wurde berichtet, dass HIV-infizierte Makrophagen in der Lage sind, HIV-Proteine auf CD4-negative Zellen wie Astrozyten zu übermitteln, ohne dass eine Infektion stattfindet (Muratori et al., 2007). Vielleicht kann auf diesem Weg über Zell-Zell-Kontakt eine Übertragung von HIV-Proteinen auf die nicht-infizierten neuronalen Progenitorzellen erfolgen.

4.9 Hat die HIV Infektion einen Einfluss auf die Migration der Progenitorzellen?

In der infizierten neuronalen Progenitorpopulation war die Expression des Rezeptors CXCR4 nicht verändert (Abb. 3.26). Auch beim Vergleich der Astrozytomzelllinie TH4-7-5 mit ihrer nicht-infizierten Ausgangszelllinie 85HG66 konnten gleiche Expressionslevel des Rezeptors CXCR4 festgestellt werden, während andere Rezeptoren wie CXCR1 und CCR2b in den infizierten Astrozytomzellen vermehrt exprimiert wurden (Cota et al., 2000).

Der Rezeptor CXCR4 spielt bei der HIV-Infektion des ZNS eine entscheidende Rolle: Zum Einen fungiert er als HIV-Korezeptor und zum Anderen vermittelt er die vom

Virus-induzierte Neurotoxizität. Der negative Einfluss des HIV-Proteins gp120, das an CXCR4 auf Astrozyten und Neuronen bindet, wurde schon mehrfach untersucht (Khan et al., 2004; Wang et al., 2003; Zhang et al., 2003b). Da neurale Progenitorzellen mehr CXCR4 als Astrozyten auf ihrer Zelloberfläche produzieren, könnten die Progenitorzellen vielleicht noch empfänglicher für die schädlichen Effekte von gp120 sein.

Der Rezeptor spielt bei der Regulation wichtiger Zellfunktionen wie Migration und Proliferation von neuronalen Progenitorzellen eine bedeutende Rolle. Eine Eigenschaft von neuronalen Progenitorzellen ist, dass sie durch das Gehirn wandern um verletzte Gehirnregionen zu reparieren und dabei zu Neuronen bzw. Astrozyten reifen (Ishibashi et al., 2004). Die Zellen werden dabei durch die Konzentrationsunterschiede bestimmter Chemokine angezogen, die von aktivierten Astrozyten in verletzten Gehirnregionen freigesetzt werden (Belmadani et al., 2006; Imitola et al., 2004). Hierbei ist vor allem das Chemokin SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*) von Bedeutung, das mit dem CXCR4-Rezeptor auf neuronalen Progenitorzellen interagiert und so als Chemoattraktant wirkt (Imitola et al., 2004; Peng et al., 2004; Tran et al., 2005; Tran et al., 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CXCR4-Rezeptoren-Produktion auf der Zelloberfläche der HIV-infizierten Progenitorpopulation nicht verändert wurde (Abb. 3.26). Die Zellen sind theoretisch weiterhin in der Lage, aktiviert zu werden und in verletzte Regionen zu wandern. Dies würde zur aktiven Verbreitung des Virus im Gehirn führen. In weitergehenden Studien sollte untersucht werden, ob die HIV-Infektion der neuronalen Progenitorzellen einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der neuronalen Population hat. Verschiedene Studien, die bereits durchgeführt wurden, lassen vermuten, dass die HIV-Infektion des Gehirns diesen Prozess negativ beeinflussen kann (Tran and Miller, 2005). Das HIV-Protein gp120 blockiert CXCR4-vermittelte Signalwege in neuronalen Progenitorzellen. Es verhindert die chemotaktische Wirkung von SDF-1 auf humanen neuronalen Progenitorzellen und inhibiert so die Migration (Ni et al., 2004; Tran et al., 2005). Zusätzlich verändert an neurale Progenitorzellen gebundenes gp120 die Proliferation der Zellen (Krathwohl and Kaiser, 2004; Okamoto et al., 2007; Tran et al., 2005). Krathwohl et al konnten zusätzlich zeigen, dass die CSF von HIV-infizierten Patienten mit HAD die gleiche Wirkung auf neurale Progenitorzellen in Kultur hat (Krathwohl and Kaiser, 2004). Sie inhibiert die Proliferation der neuronalen Progenitorzellen. Die Proliferationsuntersuchung der infizierten HNSC.100-

Progenitorpopulation zeigte jedoch kein verändertes Proliferationsverhalten (Abb 3.29).

Zusätzlich zur direkten Wirkung des Virus auf neurale Progenitorpopulationen könnten auch andere Faktoren im HIV-infizierten Gehirn die Wanderung der Zellen beeinflussen.

Die Expression von SDF-1 ist in Patienten mit HIV-Enzephalitis erhöht (Langford et al., 2002; Rostasy et al., 2003; Zheng et al., 1999). Astrozyten sind im humanen Gehirn die hauptsächlich SDF-1 bildenden Zellen. IL-1 β , das von aktivierten und/oder infizierten Makrophagen freigesetzt wird, induziert die Produktion von SDF-1 durch humane Astrozyten (Peng et al., 2006). Das freigesetzte SDF-1 kann mit den CXCR4-Rezeptoren auf anderen neuronalen Zellen wie Neuronen interagieren (Rostasy et al., 2003). HIV-infizierte Makrophagen setzen eine Matrix-Metalloproteinase (MMP-2) frei, welche SDF-1 schneidet, so dass aus dem Chemokin ein Neurotoxin entsteht (Ransohoff, 2003; Zhang et al., 2003a). Die erhöhten SDF-Level oder neurotoxische SDF-Fragmente im infizierten Gehirn könnten die Funktionen von neuronalen Progenitorzellen stören.

4.10 Auswirkungen der beeinträchtigten Neurogenese

Im Verlauf der HIV-Infektion des Gehirns kommt es zum Verlust von Neuronen, in dessen Folge die Patienten zunehmend Demenz entwickeln. Die genaue Ursache und die Mechanismen der Zerstörung der Neuronen sind aber immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Die These, dass durch die HIV-Infektion die Neurogenese im adulten Gehirn beeinträchtigt wird und so einen Einfluss auf die HIV-assoziierten Effekten im ZNS hat, wurde bereits theoretisch diskutiert (Tran and Miller, 2005; Venkatesan et al., 2007). In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob die HIV-infizierte neurale Progenitorpopulation weiterhin in der Lage ist, zu Neuronen zu differenzieren.

Bei der spontanen Differenzierung der HNSC.100-Zellen durch Wachstumsfaktorenentzug entwickeln sich nur etwa 8% der Zellen zu Neuronen (Liste et al., 2007). Mit der Kultivierung der HNSC.100 in Neuronendifferenzierungsmedium konnten Kulturbedingungen gefunden werden, welche die Differenzierung in Neuronen fördern (Abb. 3.14). Das Medium setzt sich aus Bestandteilen zusammen, von denen schon bekannt war, dass sie die neuronale Differenzierung und auch das Überleben von Neuronen unterstützen (Cheeran et al.,

2005; Johe et al., 1996; McCarthy et al., 2006; Messam et al., 2003; Ni et al., 2004; Peng et al., 2004). Der Prozentsatz an Zellen, welcher zu Neuronen differenziert war, konnte aufgrund methodischer Probleme noch nicht bestimmt werden. Nach neuronaler Differenzierung konnte die Produktion der neuronalen Marker β -Tubulin III und Synapsin nachgewiesen werden (Abb. 3.14). β -Tubulin III ist ein früherer Marker, der auch schon in neuronalen Vorläuferzellen (Neuroblasten) exprimiert wird. Synapsin hingegen ist ein späterer Marker, der die Bildung synaptischer Vesikel und damit synaptischer Verbindungen zwischen Neuronen kennzeichnet (De Filippis et al., 2007). Die Expression beider Marker nach Differenzierung der HNSC.100-Zellen wurde schon in der Literatur beschrieben (Liste et al., 2007). Nach Kultivierung in Neuronendifferenzierungsmedium konnte zusätzlich noch die Produktion von GFAP nachgewiesen werden, was zeigt, dass keine reine Neuronenkultur, sondern weiterhin eine Mischpopulation mit Astrozyten, vorlag. Da Neuronen im menschlichen Gehirn auf die Unterstützung von Astrozyten angewiesen sind, war dieses Differenzierungsverhalten der neuralen Progenitorzelllinie natürlich.

Vergleicht man das neuronale Differenzierungsverhalten der infizierten Progenitorpopulation mit nicht-infizierten Progenitorzellen, so lässt sich beobachten, dass die Produktion von β -Tubulin III in der infizierten Population deutlich später beginnt und die Produktion von Synapsin gar nicht stattfindet, auch nicht nach einem Monat im Neuronendifferenzierungsmedium (Abb. 3.30). Langzeit-HIV-infizierte HNSC.100-Populationen zeigten also eine verminderte Fähigkeit in reife Neuronen zu differenzieren. Peng et al. veröffentlicht kürzlich Daten, die unsere Ergebnisse stützen. Sie beobachteten, dass HIV-infizierte Makrophagen Faktoren freisetzen, welche die Proliferation und die astrozytäre Differenzierung von neuralen Progenitorzellen fördern und die neuronale Differenzierung der Zellen inhibieren (Peng et al., 2008). Auch Poluektova et al. konnten im Mausmodell einen negativen Einfluss von aktivierten Makrophagen auf die Neurogenese im Hippocampus nachweisen (Poluektova et al., 2005).

Normalerweise differenzieren neurale Progenitorzellen in verletzten Gehirnregionen in Neuronen und Astrozyten, um diese Zellpopulationen zu ersetzen. Es stellt sich nun die Frage, ob die neuralen Progenitorzellen im HIV-infizierten Gehirn noch in der Lage sind adäquat auf Verletzungen des Gehirns zu antworten. Diese ersten Ergebnisse sprechen dagegen. Dies könnte weiter zu den Symptomen von HAD beitragen und ein Grund für den Verlust von Neuronen im HIV-infizierten Gehirn sein.

Eine veränderte Neurogenese im Hippocampus (speziell die Verhinderung der Entstehung reifer Neuronen) spielt sehr wahrscheinlich auch bei der Alheimers Krankheit eine Rolle (Elder et al., 2006).

In weiteren Experimenten sollte auch der Einfluss der HIV-Infektion auf die Fähigkeit der neuralen Progenitorzellen, in Oligodendrozyten zu differenzieren, untersucht werden. Denn der Abbau der schützenden Myelinschicht um die Neuronen ist ein weiteres Kennzeichen der HIV-Enzephalopathie.

4.11 Auswirkungen auf die Entwicklung des Gehirns bei HIV-infizierten Kindern

Ein Aspekt, der bis jetzt noch nicht diskutiert wurde, ist der Einfluss der HIV-Infektion auf das fetale, sich entwickelnde Gehirn. Im Jahr 2007 waren weltweit etwa 2,5 Millionen Kinder mit HIV infiziert. Die Infektion erfolgt dabei in 95% der Fälle durch eine vertikale Infektion über die HIV-infizierte Mutter. Der Krankheitsverlauf der HIV-Infektion in Kindern unterscheidet sich wesentlich von dem erwachsener HIV-Infizierter. Die Krankheit schreitet wesentlich schneller fort. Kinder zeigen in den ersten Monaten ihres Lebens hohe virale Lasten, auch wenn sie mit HAART behandelt werden. Gründe hierfür sind mitunter die unterschiedliche Transmission und die unterschiedliche Reife des Immunsystems. HIV-infizierte Kinder zeigen eine Vielzahl an neurologischen Symptomen, diese treten oft stärker auf als in Erwachsenen (Cooper et al., 1998; Sanchez-Ramon et al., 2003; Tamula et al., 2003; Tardieu et al., 2000). Sie treten meist früh auf (oft in den ersten 24 Lebensmonaten) und zeigen einen raschen Fortgang. Die Mehrheit der HIV-infizierten Kinder weist deshalb signifikante Beeinträchtigungen bei der Entwicklung des Gehirns auf. Dies zeigt sich beispielsweise durch Sprachdefizite, Aufmerksamkeits- und Konzentrationsprobleme und gestörte soziale, emotionale und motorische Entwicklung.

Neurale Progenitorzellen besitzen bei der Entwicklung des Gehirns eine zentrale und kritische Rolle aufgrund der vermehrt stattfindenden Neurogenese. Die neuronalen Progenitorzellen sind noch im gesamten Gehirn verteilt und in wesentlich größerer Zahl als im adulten Gehirn vorhanden. Der Aspekt, dass die Neurogenese HIV-infizierter neuraler Progenitorpopulationen beeinträchtigt ist, könnte einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des Gehirns HIV-infizierter Kinder haben (Schwartz and Major, 2006).

5 Zusammenfassung

HIV-1 ist ein neurotrophes Virus und kann im Gehirn über Jahre verbleiben. Während bekannt ist, dass Astrozyten ein zelluläres Reservoir für das Virus im Gehirn bilden, ist die Infektion anderer neuraler Zellen des ZNS noch ziemlich unklar. Neurale Progenitorzellen sind multipotente, sich selbsterneuernde Zellen des fetalen und des adulten Gehirns, die in der Lage sind, sich in Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten zu differenzieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Zellen durch das HI-Virus infiziert werden können. Ziel der vorliegenden Arbeit war nun, zu untersuchen, ob diese Zellpopulation ein weiteres mögliches Reservoir für das Virus darstellen könnte.

Als Zellkulturmodell wurde die neurale Progenitorzelllinie HNSC.100 verwendet. Sie konnte zum einen als proliferierende Progenitorpopulation kultiviert werden und zum anderen auch, nach gezielter Differenzierung mittels des Zytokins CNTF, als Modellsystem für Astrozyten. Die beiden HNSC.100-Populationen zeigten verlässliche funktionale und phenotypische Unterschiede. Zur Untersuchung des Differenzierungsstatus konnte eine transgene Zellpopulation etabliert werden, welche eine differenzierungsabhängige Expression des EGFP-Proteins zeigt.

Die Progenitorzelllinie HNSC.100 wurden mittels zellfreiem HIV-1 infiziert und die HIV-Infektion über einen Zeitraum von vier Monaten untersucht. Die Bestimmung der Proviruskopienzahl zeigte, dass die Zellpopulation während der gesamten Beobachtungsperiode infiziert blieb. Die infizierte Progenitorpopulation setzte über 60 Tage lang moderate Mengen an HIV frei, danach sank die Virusproduktion der Zellen ab. Die Progenitorzellen bildeten jedoch weiterhin virale RNA-Transkripte. Durch Induktion der Astrogenese oder Behandlung der Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α konnte die Virusproduktion der infizierten Progenitorzellen vorübergehend wieder aktiviert werden. Die Langzeit-Infektion der neuralen Progenitorpopulation hatte Auswirkungen auf einige zelluläre Eigenschaften der Zellen: die GFAP-Produktion der Zellen nahm im Verlauf der Infektion zu, die Zellen zeigten eine veränderte Zellmorphologie und die Differenzierung in reife Neuronen war beeinträchtigt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass HIV in neuralen Progenitorzellpopulationen persistieren kann und dabei zelluläre Eigenschaften der Population verändert.

6 Literaturverzeichnis

- Aarum, J., Sandberg, K., Haerberlein, S. L. and Persson, M. A.** (2003). Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15983-8.
- Aberg, M. A., Ryttsen, F., Hellgren, G., Lindell, K., Rosengren, L. E., MacLennan, A. J. et al.** (2001). Selective introduction of antisense oligonucleotides into single adult CNS progenitor cells using electroporation demonstrates the requirement of STAT3 activation for CNTF-induced gliogenesis. *Mol Cell Neurosci* **17**, 426-43.
- Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J. and Ram, S. J.** (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11**, 36-42.
- Abrous, D. N., Koehl, M. and Le Moal, M.** (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* **85**, 523-69.
- Aimone, J. B., Wiles, J. and Gage, F. H.** (2006). Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci* **9**, 723-7.
- Albright, A. V., Soldan, S. S. and Gonzalez-Scarano, F.** (2003). Pathogenesis of human immunodeficiency virus-induced neurological disease. *J Neurovirol* **9**, 222-7.
- Albright, A. V., Strizki, J., Harouse, J. M., Lavi, E., O'Connor, M. and Gonzalez-Scarano, F.** (1996). HIV-1 infection of cultured human adult oligodendrocytes. *Virology* **217**, 211-9.
- Alvarez Losada, S., Canto-Nogues, C. and Munoz-Fernandez, M. A.** (2002). A new possible mechanism of human immunodeficiency virus type 1 infection of neural cells. *Neurobiol Dis* **11**, 469-78.
- Alvarez-Buylla, A. and Garcia-Verdugo, J. M.** (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* **22**, 629-34.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M. and Tramontin, A. D.** (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* **2**, 287-93.
- Alvarez-Buylla, A. and Lim, D. A.** (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**, 683-6.
- Amiry-Moghaddam, M. and Ottersen, O. P.** (2003). The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* **4**, 991-1001.
- An, S. F., Giometto, B. and Scaravilli, F.** (1996). HIV-1 DNA in brains in AIDS and pre-AIDS: correlation with the stage of disease. *Ann Neurol* **40**, 611-7.
- An, S. F., Groves, M., Giometto, B., Beckett, A. A. and Scaravilli, F.** (1999). Detection and localisation of HIV-1 DNA and RNA in fixed adult AIDS brain by polymerase chain reaction/in situ hybridisation technique. *Acta Neuropathol (Berl)* **98**, 481-7.
- Anderson, C. E., Tomlinson, G. S., Pauly, B., Brannan, F. W., Chiswick, A., Brack-Werner, R. et al.** (2003). Relationship of Nef-positive and GFAP-reactive astrocytes to drug use in early and late HIV infection. *Neuropathol Appl Neurobiol* **29**, 378-88.
- Angelastro, J. M., Mason, J. L., Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Stengren, G. B., Goldman, J. E. et al.** (2005). Downregulation of activating transcription factor 5 is required for differentiation of neural progenitor cells into astrocytes. *J Neurosci* **25**, 3889-99.
- Anthony, I. C., Ramage, S. N., Carnie, F. W., Simmonds, P. and Bell, J. E.** (2005). Influence of HAART on HIV-related CNS disease and neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 529-36.
- Atwood, W. J., Tornatore, C. S., Traub, R., Conant, K., Drew, P. D. and Major, E. O.** (1994). Stimulation of HIV type 1 gene expression and induction of NF-kappa B (p50/p65)-binding activity in tumor necrosis factor alpha-treated human fetal glial cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 1207-11.
- Aubert, J., Stavridis, M. P., Tweedie, S., O'Reilly, M., Vierlinger, K., Li, M. et al.** (2003). Screening for mammalian neural genes via fluorescence-activated cell sorter purification of neural precursors from Sox1-gfp knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11836-41.

- Bachoo, R. M., Kim, R. S., Ligon, K. L., Maher, E. A., Brennan, C., Billings, N. et al.** (2004). Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8384-9.
- Bagasra, O., Khalili, K., Seshamma, T., Taylor, J. P. and Pomerantz, R. J.** (1992). TAR-independent replication of human immunodeficiency virus type 1 in glial cells. *J Virol* **66**, 7522-8.
- Bagasra, O., Lavi, E., Bobroski, L., Khalili, K., Pestaner, J. P., Tawadros, R. et al.** (1996). Cellular reservoirs of HIV-1 in the central nervous system of infected individuals: identification by the combination of in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Aids* **10**, 573-85.
- Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S. and Schettini, G.** (2002). Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J Neurochem* **82**, 1311-29.
- Balvay, L., Lopez Lastra, M., Sargueil, B., Darlix, J. L. and Ohlmann, T.** (2007). Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**, 128-40.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J. et al.** (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-71.
- Bazan, E., Alonso, F. J., Redondo, C., Lopez-Toledano, M. A., Alfaro, J. M., Reimers, D. et al.** (2004). In vitro and in vivo characterization of neural stem cells. *Histol Histopathol* **19**, 1261-75.
- Behrstock, S., Ebert, A., McHugh, J., Vosberg, S., Moore, J., Schneider, B. et al.** (2006). Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to parkinsonian rodents and aged primates. *Gene Ther* **13**, 379-88.
- Bell, J. E.** (2004). An update on the neuropathology of HIV in the HAART era. *Histopathology* **45**, 549-59.
- Belmadani, A., Tran, P. B., Ren, D. and Miller, R. J.** (2006). Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. *J Neurosci* **26**, 3182-91.
- Bencheikh, M., Bentsman, G., Sarkissian, N., Canki, M. and Volsky, D. J.** (1999). Replication of different clones of human immunodeficiency virus type 1 in primary fetal human astrocytes: enhancement of viral gene expression by Nef. *J Neurovirol* **5**, 115-24.
- Berger, O., Gan, X., Gujuluva, C., Burns, A. R., Sulur, G., Stins, M. et al.** (1999). CXC and CC chemokine receptors on coronary and brain endothelia. *Mol Med* **5**, 795-805.
- Berninger, B., Costa, M. R., Koch, U., Schroeder, T., Sutor, B., Grothe, B. et al.** (2007). Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. *J Neurosci* **27**, 8654-64.
- Besnard, F., Brenner, M., Nakatani, Y., Chao, R., Purohit, H. J. and Freese, E.** (1991). Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. *J Biol Chem* **266**, 18877-83.
- Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E. et al.** (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* **4**, 702-10.
- Bigner, D. D., Bigner, S. H., Ponten, J., Westermark, B., Mahaley, M. S., Ruoslahti, E. et al.** (1981). Heterogeneity of Genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **40**, 201-29.
- Birbeck, G. L.** (2005). Human immunodeficiency virus dementia patients in Africa: How many? Who cares? And where to from here? *J Neurovirol* **11 Suppl 3**, 30-3.
- Blankson, J. N., Persaud, D. and Siliciano, R. F.** (2002). The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* **53**, 557-93.
- Bonni, A., Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D. A., Rozovsky, I. et al.** (1997). Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* **278**, 477-83.
- Brack-Werner, R.** (1999). Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis. *Aids* **13**, 1-22.

- Brack-Werner, R., Kleinschmidt, A., Ludvigsen, A., Mellert, W., Neumann, M., Herrmann, R. et al.** (1992). Infection of human brain cells by HIV-1: restricted virus production in chronically infected human glial cell lines. *Aids* **6**, 273-85.
- Brenner, M.** (1994). Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathol* **4**, 245-57.
- Brenner, M., Kisseberth, W. C., Su, Y., Besnard, F. and Messing, A.** (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci* **14**, 1030-7.
- Brigati, C., Giacca, M., Noonan, D. M. and Albini, A.** (2003). HIV Tat, its TARgets and the control of viral gene expression. *FEMS Microbiol Lett* **220**, 57-65.
- Brooks, D. G., Kitchen, S. G., Kitchen, C. M., Scripture-Adams, D. D. and Zack, J. A.** (2001). Generation of HIV latency during thymopoiesis. *Nat Med* **7**, 459-64.
- Brunet, J. F., Grollmund, L., Chatton, J. Y., Lengacher, S., Magistretti, P. J., Villemure, J. G. et al.** (2004). Early acquisition of typical metabolic features upon differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. *Glia* **46**, 8-17.
- Buc-Caron, M. H.** (1995). Neuroepithelial progenitor cells explanted from human fetal brain proliferate and differentiate in vitro. *Neurobiol Dis* **2**, 37-47.
- Buch, S. K., Khurdayan, V. K., Lutz, S. E., Knapp, P. E., El-Hage, N. and Hauser, K. F.** (2007). Glial-restricted precursors: patterns of expression of opioid receptors and relationship to human immunodeficiency virus-1 Tat and morphine susceptibility in vitro. *Neuroscience* **146**, 1546-54.
- Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A. P. et al.** (2008). Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3581-6.
- Cacci, E., Villa, A., Parmar, M., Cavallaro, M., Mandahl, N., Lindvall, O. et al.** (2007). Generation of human cortical neurons from a new immortal fetal neural stem cell line. *Exp Cell Res* **313**, 588-601.
- Cao, Q., Benton, R. L. and Whittemore, S. R.** (2002). Stem cell repair of central nervous system injury. *J Neurosci Res* **68**, 501-10.
- Carpenter, M. K., Cui, X., Hu, Z. Y., Jackson, J., Sherman, S., Seiger, A. et al.** (1999). In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol* **158**, 265-78.
- Cassidy, R. and Frisen, J.** (2001). Neurobiology. Stem cells on the brain. *Nature* **412**, 690-1.
- Chauhan, A., Turchan, J., Pocerich, C., Bruce-Keller, A., Roth, S., Butterfield, D. A. et al.** (2003). Intracellular human immunodeficiency virus Tat expression in astrocytes promotes astrocyte survival but induces potent neurotoxicity at distant sites via axonal transport. *J Biol Chem* **278**, 13512-9.
- Cheeran, M. C., Hu, S., Ni, H. T., Sheng, W., Palmquist, J. M., Peterson, P. K. et al.** (2005). Neural precursor cell susceptibility to human cytomegalovirus diverges along glial or neuronal differentiation pathways. *J Neurosci Res* **82**, 839-50.
- Chen, Y. and Swanson, R. A.** (2003). Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 137-49.
- Cherner, M., Cysique, L., Heaton, R. K., Marcotte, T. D., Ellis, R. J., Masliah, E. et al.** (2007). Neuropathologic confirmation of definitional criteria for human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders. *J Neurovirol* **13**, 23-8.
- Chiodi, F., Fuerstenberg, S., Gidlund, M., Asjo, B. and Fenyo, E. M.** (1987). Infection of brain-derived cells with the human immunodeficiency virus. *J Virol* **61**, 1244-7.
- Chun, T. W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J. A., Taylor, H. et al.** (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**, 183-8.
- Chun, T. W., Engel, D., Berrey, M. M., Shea, T., Corey, L. and Fauci, A. S.** (1998). Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8869-73.
- Chun, T. W., Nickle, D. C., Justement, J. S., Large, D., Semerjian, A., Curlin, M. E. et al.** (2005). HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *J Clin Invest* **115**, 3250-5.

- Clarke, J. N., Lake, J. A., Burrell, C. J., Wesselingh, S. L., Gorry, P. R. and Li, P.** (2006). Novel pathway of human immunodeficiency virus type 1 uptake and release in astrocytes. *Virology* **348**, 141-55.
- Cooper, E. R., Hanson, C., Diaz, C., Mendez, H., Abboud, R., Nugent, R. et al.** (1998). Encephalopathy and progression of human immunodeficiency virus disease in a cohort of children with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. Women and Infants Transmission Study Group. *J Pediatr* **132**, 808-12.
- Cota, M., Kleinschmidt, A., Ceccherini-Silberstein, F., Aloisi, F., Mengozzi, M., Mantovani, A. et al.** (2000). Upregulated expression of interleukin-8, RANTES and chemokine receptors in human astrocytic cells infected with HIV-1. *J Neurovirol* **6**, 75-83.
- Curtis, M. A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M. F., Axell, M. Z., Wikkelso, C. et al.** (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* **315**, 1243-9.
- D'Aversa, T. G., Eugenin, E. A. and Berman, J. W.** (2005). NeuroAIDS: contributions of the human immunodeficiency virus-1 proteins Tat and gp120 as well as CD40 to microglial activation. *J Neurosci Res* **81**, 436-46.
- Dahlstrand, J., Lardelli, M. and Lendahl, U.** (1995). Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* **84**, 109-29.
- Davis, L. E., Hjelle, B. L., Miller, V. E., Palmer, D. L., Llewellyn, A. L., Merlin, T. L. et al.** (1992). Early viral brain invasion in iatrogenic human immunodeficiency virus infection. *Neurology* **42**, 1736-9.
- De Filippis, L., Lamorte, G., Snyder, E. Y., Malgaroli, A. and Vescovi, A. L.** (2007). A novel, immortal, and multipotent human neural stem cell line generating functional neurons and oligodendrocytes. *Stem Cells* **25**, 2312-21.
- Demart, S., Ceccherini-Silberstein, F., Schlicht, S., Walcher, S., Wolff, H., Neumann, M. et al.** (2003). Analysis of nuclear targeting activities of transport signals in the human immunodeficiency virus Rev protein. *Exp Cell Res* **291**, 484-501.
- Doetsch, F.** (2003). The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* **6**, 1127-34.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-16.
- Doms, R. W.** (2001). Chemokine receptors and HIV entry. *Aids* **15 Suppl 1**, S34-5.
- Dore, G. J., Correll, P. K., Li, Y., Kaldor, J. M., Cooper, D. A. and Brew, B. J.** (1999). Changes to AIDS dementia complex in the era of highly active antiretroviral therapy. *Aids* **13**, 1249-53.
- Draberova, E., Lukas, Z., Ivanyi, D., Viklicky, V. and Draber, P.** (1998). Expression of class III beta-tubulin in normal and neoplastic human tissues. *Histochem Cell Biol* **109**, 231-9.
- Elder, G. A., De Gasperi, R. and Gama Sosa, M. A.** (2006). Research update: neurogenesis in adult brain and neuropsychiatric disorders. *Mt Sinai J Med* **73**, 931-40.
- Eliasson, C., Sahlgren, C., Berthold, C. H., Stakeberg, J., Celis, J. E., Betsholtz, C. et al.** (1999). Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem* **274**, 23996-4006.
- Ellis, R., Langford, D. and Masliah, E.** (2007). HIV and antiretroviral therapy in the brain: neuronal injury and repair. *Nat Rev Neurosci* **8**, 33-44.
- Emsley, J. G., Mitchell, B. D., Kempermann, G. and Macklis, J. D.** (2005). Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* **75**, 321-41.
- Enam, S., Sweet, T. M., Amini, S., Khalili, K. and Del Valle, L.** (2004). Evidence for involvement of transforming growth factor beta1 signaling pathway in activation of JC virus in human immunodeficiency virus 1-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Pathol Lab Med* **128**, 282-91.
- Eng, L. F. and Ghirnikar, R. S.** (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* **4**, 229-37.
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S. and Lee, Y. L.** (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* **25**, 1439-51.

- Engelman, A.** (2007). AIDS/HIV. A reversal of fortune in HIV-1 integration. *Science* **316**, 1855-7.
- Ensoli, F., Cafaro, A., Fiorelli, V., Vannelli, B., Ensoli, B. and Thiele, C. J.** (1995). HIV-1 infection of primary human neuroblasts. *Virology* **210**, 221-5.
- Ensoli, F., Wang, H., Fiorelli, V., Zeichner, S. L., De Cristofaro, M. R., Luzi, G. et al.** (1997). HIV-1 infection and the developing nervous system: lineage-specific regulation of viral gene expression and replication in distinct neuronal precursors. *J Neurovirol* **3**, 290-8.
- Ernfors, P.** (2000). Nuclear factor-kappaB to the rescue of cytokine-induced neuronal survival. *J Cell Biol* **148**, 223-5.
- Ernst, C. and Christie, B. R.** (2006). The putative neural stem cell marker, nestin, is expressed in heterogeneous cell types in the adult rat neocortex. *Neuroscience* **138**, 183-8.
- Faijerson, J., Tinsley, R. B., Aprico, K., Thorsell, A., Nodin, C., Nilsson, M. et al.** (2006). Reactive astrogliosis induces astrocytic differentiation of adult neural stem/progenitor cells in vitro. *J Neurosci Res* **84**, 1415-24.
- Fan, G., Martinowich, K., Chin, M. H., He, F., Fouse, S. D., Hutnick, L. et al.** (2005). DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* **132**, 3345-56.
- Fang, J., Acheampong, E., Dave, R., Wang, F., Mukhtar, M. and Pomerantz, R. J.** (2005). The RNA helicase DDX1 is involved in restricted HIV-1 Rev function in human astrocytes. *Virology* **336**, 299-307.
- Fang, J., Kubota, S., Yang, B., Zhou, N., Zhang, H., Godbout, R. et al.** (2004). A DEAD box protein facilitates HIV-1 replication as a cellular co-factor of Rev. *Virology* **330**, 471-80.
- Ferrari, S., Battini, R., Kaczmarek, L., Rittling, S., Calabretta, B., de Riel, J. K. et al.** (1986). Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene. *Mol Cell Biol* **6**, 3614-20.
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T. et al.** (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* **5**, 512-7.
- Flax, J. D., Aurora, S., Yang, C., Simonin, C., Wills, A. M., Billingham, L. L. et al.** (1998). Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol* **16**, 1033-9.
- Frankel, A. D. and Young, J. A.** (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**, 1-25.
- Freed, E. O.** (2001). HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* **26**, 13-33.
- Fricker, R. A., Carpenter, M. K., Winkler, C., Greco, C., Gates, M. A. and Bjorklund, A.** (1999). Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci* **19**, 5990-6005.
- Fuchs, E. and Cleveland, D. W.** (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**, 514-9.
- Fujii, Y., Otake, K., Tashiro, M. and Adachi, A.** (1996). Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein on the cell surface is cytotoxic for human CD4+ T cells. *FEBS Lett* **393**, 105-8.
- Gage, F. H.** (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-8.
- Galey, D., Becker, K., Haughey, N., Kalehua, A., Taub, D., Woodward, J. et al.** (2003). Differential transcriptional regulation by human immunodeficiency virus type 1 and gp120 in human astrocytes. *J Neurovirol* **9**, 358-71.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S. et al.** (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865-7.
- Garcia, A. D., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G. and Sofroniew, M. V.** (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* **7**, 1233-41.
- Garden, G. A.** (2002). Microglia in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *Glia* **40**, 240-51.
- Garnett, G. P., Bartley, L., Grassly, N. C. and Anderson, R. M.** (2002). Antiretroviral therapy to treat and prevent HIV/AIDS in resource-poor settings. *Nat Med* **8**, 651-4.

- Gartner, S.** (2000). HIV infection and dementia. *Science* **287**, 602-4.
- Geeraert, L., Kraus, G. and Pomerantz, R. J.** (2008). Hide-and-seek: the challenge of viral persistence in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* **59**, 487-501.
- Ghafouri, M., Amini, S., Khalili, K. and Sawaya, B. E.** (2006). HIV-1 associated dementia: symptoms and causes. *Retrovirology* **3**, 28.
- Ghashghaei, H. T., Lai, C. and Anton, E. S.** (2007). Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat Rev Neurosci* **8**, 141-51.
- Glass, J. D., Fedor, H., Wesselingh, S. L. and McArthur, J. C.** (1995). Immunocytochemical quantitation of human immunodeficiency virus in the brain: correlations with dementia. *Ann Neurol* **38**, 755-62.
- Goff, S. P.** (2007). Host factors exploited by retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**, 253-63.
- Goldman, S.** (2003). Glia as neural progenitor cells. *Trends Neurosci* **26**, 590-6.
- Goldman, S.** (2005). Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nat Biotechnol* **23**, 862-71.
- Goldman, S. A. and Sim, F.** (2005). Neural progenitor cells of the adult brain. *Novartis Found Symp* **265**, 66-80; discussion 82-97.
- Gonzalez-Scarano, F. and Martin-Garcia, J.** (2005). The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* **5**, 69-81.
- Gorry, P. R., Howard, J. L., Churchill, M. J., Anderson, J. L., Cunningham, A., Adrian, D. et al.** (1999). Diminished production of human immunodeficiency virus type 1 in astrocytes results from inefficient translation of gag, env, and nef mRNAs despite efficient expression of Tat and Rev. *J Virol* **73**, 352-61.
- Gorry, P. R., Ong, C., Thorpe, J., Bannwarth, S., Thompson, K. A., Gatignol, A. et al.** (2003). Astrocyte infection by HIV-1: mechanisms of restricted virus replication, and role in the pathogenesis of HIV-1-associated dementia. *Curr HIV Res* **1**, 463-73.
- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A. et al.** (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**, 1425-31.
- Greenfield, S. A.** (2003). Reiseführer Gehirn. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Greenway, A. L., Holloway, G., McPhee, D. A., Ellis, P., Cornall, A. and Lidman, M.** (2003). HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication. *J Biosci* **28**, 323-35.
- Han, S. S., Liu, Y., Tyler-Polsz, C., Rao, M. S. and Fischer, I.** (2004). Transplantation of glial-restricted precursor cells into the adult spinal cord: survival, glial-specific differentiation, and preferential migration in white matter. *Glia* **45**, 1-16.
- Han, Y., Wind-Rotolo, M., Yang, H. C., Siliciano, J. D. and Siliciano, R. F.** (2007). Experimental approaches to the study of HIV-1 latency. *Nat Rev Microbiol* **5**, 95-106.
- Hayes, R. and Weiss, H.** (2006). Epidemiology. Understanding HIV epidemic trends in Africa. *Science* **311**, 620-1.
- Heinkelein, M., Dressler, M., Jarmy, G., Rammling, M., Imrich, H., Thurow, J. et al.** (2002). Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J Virol* **76**, 3774-83.
- Heinkelein, M., Schmidt, M., Fischer, N., Moebes, A., Lindemann, D., Enssle, J. et al.** (1998). Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J Virol* **72**, 6307-14.
- Heinkelein, M., Thurow, J., Dressler, M., Imrich, H., Neumann-Haefelin, D., McClure, M. O. et al.** (2000). Complex effects of deletions in the 5' untranslated region of primate foamy virus on viral gene expression and RNA packaging. *J Virol* **74**, 3141-8.
- Hermanson, O., Jepsen, K. and Rosenfeld, M. G.** (2002). N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature* **419**, 934-9.
- Hilfiker, S., Pieribone, V. A., Czernik, A. J., Kao, H. T., Augustine, G. J. and Greengard, P.** (1999). Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 269-79.
- Hudson, L., Liu, J., Nath, A., Jones, M., Raghavan, R., Narayan, O. et al.** (2000). Detection of the human immunodeficiency virus regulatory protein tat in CNS tissues. *J Neurovirol* **6**, 145-55.

- Huigen, M. C., Kamp, W. and Nottet, H. S.** (2004). Multiple effects of HIV-1 trans-activator protein on the pathogenesis of HIV-1 infection. *Eur J Clin Invest* **34**, 57-66.
- Hult, B., Chana, G., Masliah, E. and Everall, I.** (2008). Neurobiology of HIV. *Int Rev Psychiatry* **20**, 3-13.
- Imitola, J., Raddassi, K., Park, K. I., Mueller, F. J., Nieto, M., Teng, Y. D. et al.** (2004). Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 18117-22.
- Ip, N. Y., Wiegand, S. J., Morse, J. and Rudge, J. S.** (1993). Injury-induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* **5**, 25-33.
- Ishibashi, S., Sakaguchi, M., Kuroiwa, T., Yamasaki, M., Kanemura, Y., Shizuko, I. et al.** (2004). Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. *J Neurosci Res* **78**, 215-23.
- Iwata, N., Yoshida, H., Tobiume, M., Ono, F., Shimazaki, T., Sata, T. et al.** (2007). Simian fetal brain progenitor cells for studying viral neuropathogenesis. *J Neurovirol* **13**, 11-22.
- Jakobsson, J., Ericson, C., Jansson, M., Bjork, E. and Lundberg, C.** (2003). Targeted transgene expression in rat brain using lentiviral vectors. *J Neurosci Res* **73**, 876-85.
- Jakobsson, J., Rosenqvist, N., Marild, K., D, V. A. and Lundberg, C.** (2006). Evidence for disease-regulated transgene expression in the brain with use of lentiviral vectors. *J Neurosci Res* **84**, 58-67.
- Jessen, K. R.** (2004). Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1861-7.
- Jin, K., Mao, X. O., Sun, Y., Xie, L. and Greenberg, D. A.** (2002). Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *J Clin Invest* **110**, 311-9.
- Johe, K. K., Hazel, T. G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M. M. and McKay, R. D.** (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* **10**, 3129-40.
- Jones, G. and Power, C.** (2006). Regulation of neural cell survival by HIV-1 infection. *Neurobiol Dis* **21**, 1-17.
- Kabamba-Mukadi, B., Henrivaux, P., Ruelle, J., Delferriere, N., Bodeus, M. and Goubau, P.** (2005). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA load in purified CD4+ cells by LightCycler real-time PCR. *BMC Infect Dis* **5**, 15.
- Kahn, M. A., Ellison, J. A., Speight, G. J. and de Vellis, J.** (1995). CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res* **685**, 55-67.
- Kandaneeratchi, A., Williams, B. and Everall, I. P.** (2003). Assessing the efficacy of highly active antiretroviral therapy in the brain. *Brain Pathol* **13**, 104-10.
- Kanmogne, G. D., Grammas, P. and Kennedy, R. C.** (2000). Analysis of human endothelial cells and cortical neurons for susceptibility to HIV-1 infection and co-receptor expression. *J Neurovirol* **6**, 519-28.
- Kaul, M., Garden, G. A. and Lipton, S. A.** (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* **410**, 988-94.
- Kaul, M. and Lipton, S. A.** (2004). Signaling pathways to neuronal damage and apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-associated dementia: Chemokine receptors, excitotoxicity, and beyond. *J Neurovirol* **10 Suppl 1**, 97-101.
- Keirstead, H. S.** (2001). Stem cell transplantation into the central nervous system and the control of differentiation. *J Neurosci Res* **63**, 233-6.
- Kelly, S., Bliss, T. M., Shah, A. K., Sun, G. H., Ma, M., Foo, W. C. et al.** (2004). Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11839-44.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. and Kronenberg, G.** (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* **27**, 447-52.
- Khan, M. Z., Brandimarti, R., Patel, J. P., Huynh, N., Wang, J., Huang, Z. et al.** (2004). Apoptotic and antiapoptotic effects of CXCR4: is it a matter of intrinsic efficacy? Implications for HIV neuropathogenesis. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 1063-71.
- Kim, B. O., Liu, Y., Ruan, Y., Xu, Z. C., Schantz, L. and He, J. J.** (2003). Neuropathologies in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 Tat protein under the

- regulation of the astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein promoter and doxycycline. *Am J Pathol* **162**, 1693-707.
- Kim, S. U.** (2007). Genetically engineered human neural stem cells for brain repair in neurological diseases. *Brain Dev* **29**, 193-201.
- Kim, S. U., Park, I. H., Kim, T. H., Kim, K. S., Choi, H. B., Hong, S. H. et al.** (2006). Brain transplantation of human neural stem cells transduced with tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase 1 provides functional improvement in animal models of Parkinson disease. *Neuropathology* **26**, 129-40.
- Kim, S. Y., Li, J., Bentsman, G., Brooks, A. I. and Volsky, D. J.** (2004). Microarray analysis of changes in cellular gene expression induced by productive infection of primary human astrocytes: implications for HAD. *J Neuroimmunol* **157**, 17-26.
- Kimelberg, H. K.** (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int* **45**, 191-202.
- King, J. E., Eugenin, E. A., Buckner, C. M. and Berman, J. W.** (2006). HIV tat and neurotoxicity. *Microbes Infect* **8**, 1347-57.
- Kjems, J. and Askjaer, P.** (2000). Rev protein and its cellular partners. *Adv Pharmacol* **48**, 251-98.
- Kleinschmidt, A., Neumann, M., Moller, C., Erfle, V. and Brack-Werner, R.** (1994). Restricted expression of HIV1 in human astrocytes: molecular basis for viral persistence in the CNS. *Res Virol* **145**, 147-53.
- Kohleisen, B., Shumay, E., Sutter, G., Foerster, R., Brack-Werner, R., Nuesse, M. et al.** (1999). Stable expression of HIV-1 Nef induces changes in growth properties and activation state of human astrocytes. *Aids* **13**, 2331-41.
- Kolson, D. L.** (2002). Neuropathogenesis of central nervous system HIV-1 infection. *Clin Lab Med* **22**, 703-17.
- Koutsilieris, E., Scheller, C., Sopper, S., ter Meulen, V. and Riederer, P.** (2002). The pathogenesis of HIV-induced dementia. *Mech Ageing Dev* **123**, 1047-53.
- Kramer-Hammerle, S., Ceccherini-Silberstein, F., Bickel, C., Wolff, H., Vincendeau, M., Werner, T. et al.** (2005a). Identification of a novel Rev-interacting cellular protein. *BMC Cell Biol* **6**, 20.
- Kramer-Hammerle, S., Hahn, A., Brack-Werner, R. and Werner, T.** (2005b). Elucidating effects of long-term expression of HIV-1 Nef on astrocytes by microarray, promoter, and literature analyses. *Gene* **358**, 31-8.
- Kramer-Hammerle, S., Kohleisen, B., Hohenadl, C., Shumay, E., Becker, I., Erfle, V. et al.** (2001). HIV type 1 Nef promotes neoplastic transformation of immortalized neural cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 597-602.
- Kramer-Hammerle, S., Rothenaigner, I., Wolff, H., Bell, J. E. and Brack-Werner, R.** (2005c). Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res* **111**, 194-213.
- Krathwohl, M. D. and Kaiser, J. L.** (2004). HIV-1 promotes quiescence in human neural progenitor cells. *J Infect Dis* **190**, 216-26.
- Krum, J. M. and Rosenstein, J. M.** (1999). Transient coexpression of nestin, GFAP, and vascular endothelial growth factor in mature reactive astroglia following neural grafting or brain wounds. *Exp Neurol* **160**, 348-60.
- Langford, D., Sanders, V. J., Mallory, M., Kaul, M. and Masliah, E.** (2002). Expression of stromal cell-derived factor 1alpha protein in HIV encephalitis. *J Neuroimmunol* **127**, 115-26.
- Langford, T. D., Letendre, S. L., Larrea, G. J. and Masliah, E.** (2003). Changing patterns in the neuropathogenesis of HIV during the HAART era. *Brain Pathol* **13**, 195-210.
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P. E. et al.** (2003). Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* **33**, 366-74.
- Lawrence, D. M., Durham, L. C., Schwartz, L., Seth, P., Maric, D. and Major, E. O.** (2004). Human immunodeficiency virus type 1 infection of human brain-derived progenitor cells. *J Virol* **78**, 7319-28.
- Lawrence, D. M. and Major, E. O.** (2002). HIV-1 and the brain: connections between HIV-1-associated dementia, neuropathology and neuroimmunology. *Microbes Infect* **4**, 301-8.

- Lawrence, D. M., Seth, P., Durham, L., Diaz, F., Boursiquot, R., Ransohoff, R. M. et al.** (2006). Astrocyte differentiation selectively upregulates CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human brain-derived progenitor cells. *Glia* **53**, 81-91.
- Lee, C. M. and Reddy, E. P.** (1999). The v-myc oncogene. *Oncogene* **18**, 2997-3003.
- Lee, H. J., Kim, K. S., Kim, E. J., Choi, H. B., Lee, K. H., Park, I. H. et al.** (2007). Brain transplantation of immortalized human neural stem cells promotes functional recovery in mouse intracerebral hemorrhage stroke model. *Stem Cells* **25**, 1204-12.
- Lee, M. K., Rebhun, L. I. and Frankfurter, A.** (1990). Posttranslational modification of class III beta-tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7195-9.
- Lee, M. Y., Kim, C. J., Shin, S. L., Moon, S. H. and Chun, M. H.** (1998). Increased ciliary neurotrophic factor expression in reactive astrocytes following spinal cord injury in the rat. *Neurosci Lett* **255**, 79-82.
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B. and McKay, R. D.** (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585-95.
- Li, J., Bentsman, G., Potash, M. J. and Volsky, D. J.** (2007). Human immunodeficiency virus type 1 efficiently binds to human fetal astrocytes and induces neuroinflammatory responses independent of infection. *BMC Neurosci* **8**, 31.
- Li, J., Liu, Y., Kim, B. O. and He, J. J.** (2002). Direct participation of Sam68, the 68-kilodalton Src-associated protein in mitosis, in the CRM1-mediated Rev nuclear export pathway. *J Virol* **76**, 8374-82.
- Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R. and Smith, A.** (1998). Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol* **8**, 971-4.
- Liberto, C. M., Albrecht, P. J., Herx, L. M., Yong, V. W. and Levison, S. W.** (2004). Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* **89**, 1092-100.
- Lie, D. C., Song, H., Colamarino, S. A., Ming, G. L. and Gage, F. H.** (2004). Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 399-421.
- Lindvall, O. and Kokaia, Z.** (2006). Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* **441**, 1094-6.
- Linial, M. L.** (1999). Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol* **73**, 1747-55.
- Liste, I., Garcia-Garcia, E., Bueno, C. and Martinez-Serrano, A.** (2007). Bcl-XL modulates the differentiation of immortalized human neural stem cells. *Cell Death Differ* **14**, 1880-92.
- Liste, I., Garcia-Garcia, E. and Martinez-Serrano, A.** (2004a). The generation of dopaminergic neurons by human neural stem cells is enhanced by Bcl-XL, both in vitro and in vivo. *J Neurosci* **24**, 10786-95.
- Liste, I., Navarro, B., Johansen, J., Bueno, C., Villa, A., Johansen, T. E. et al.** (2004b). Low-level tyrosine hydroxylase (TH) expression allows for the generation of stable TH+ cell lines of human neural stem cells. *Hum Gene Ther* **15**, 13-20.
- Liu, W., He, X., Cao, Z., Sheng, J., Liu, H., Li, Z. et al.** (2005). Efficient therapeutic gene expression in cultured rat hippocampal neurons mediated by human foamy virus vectors: a potential for the treatment of neurological diseases. *Intervirology* **48**, 329-35.
- Liu, W., Liu, Z., Cao, X., Cao, Z., Xue, L., Zhu, F. et al.** (2007). Recombinant Human Foamy Virus, a Novel Vector for Neurological Disorders Gene Therapy, Drives Production of GAD in Cultured Astrocytes. *Mol Ther* **15**, 1834-41.
- Liu, Y., Jones, M., Hingtgen, C. M., Bu, G., Laribee, N., Tanzi, R. E. et al.** (2000). Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat Med* **6**, 1380-7.
- Liu, Y., Liu, H., Kim, B. O., Gattone, V. H., Li, J., Nath, A. et al.** (2004). CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J Virol* **78**, 4120-33.
- Liu, Y. and Rao, M. S.** (2004). Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them. *Biol Cell* **96**, 279-90.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8.
- Lledo, P. M., Alonso, M. and Grubb, M. S.** (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* **7**, 179-93.

- Locati, M. and Murphy, P. M.** (1999). Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev Med* **50**, 425-40.
- Ludwig, E., Silberstein, F. C., van Empel, J., Erfle, V., Neumann, M. and Brack-Werner, R.** (1999). Diminished rev-mediated stimulation of human immunodeficiency virus type 1 protein synthesis is a hallmark of human astrocytes. *J Virol* **73**, 8279-89.
- Ma, D. K., Ming, G. L. and Song, H.** (2005). Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 514-20.
- Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F. et al.** (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* **37**, 751-64.
- Marras, D., Bruggeman, L. A., Gao, F., Tanji, N., Mansukhani, M. M., Cara, A. et al.** (2002). Replication and compartmentalization of HIV-1 in kidney epithelium of patients with HIV-associated nephropathy. *Nat Med* **8**, 522-6.
- Martin-Garcia, J., Kolson, D. L. and Gonzalez-Scarano, F.** (2002). Chemokine receptors in the brain: their role in HIV infection and pathogenesis. *Aids* **16**, 1709-30.
- Martinez-Serrano, A., Rubio, F. J., Navarro, B., Bueno, C. and Villa, A.** (2001). Human neural stem and progenitor cells: in vitro and in vivo properties, and potential for gene therapy and cell replacement in the CNS. *Curr Gene Ther* **1**, 279-99.
- Martinez-Serrano, A., Villa, A., Navarro, B., Rubio, F. J. and Bueno, C.** (2000). Human neural progenitor cells: better blue than green? *Nat Med* **6**, 483-4.
- Martino, G. and Pluchino, S.** (2006). The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* **7**, 395-406.
- Masliah, E., Ge, N., Achim, C. L. and Wiley, C. A.** (1995). Differential vulnerability of calbindin-immunoreactive neurons in HIV encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**, 350-7.
- Mattson, M. P., Haughey, N. J. and Nath, A.** (2005). Cell death in HIV dementia. *Cell Death Differ* **12 Suppl 1**, 893-904.
- McArthur, J. C., Brew, B. J. and Nath, A.** (2005). Neurological complications of HIV infection. *Lancet Neurol* **4**, 543-55.
- McArthur, J. C., Haughey, N., Gartner, S., Conant, K., Pardo, C., Nath, A. et al.** (2003). Human immunodeficiency virus-associated dementia: an evolving disease. *J Neurovirol* **9**, 205-21.
- McBride, J. L., Behrstock, S. P., Chen, E. Y., Jakel, R. J., Siegel, I., Svendsen, C. N. et al.** (2004). Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. *J Comp Neurol* **475**, 211-9.
- McCarthy, M., He, J. and Wood, C.** (1998). HIV-1 strain-associated variability in infection of primary neuroglia. *J Neurovirol* **4**, 80-9.
- McCarthy, M., Vidaurre, I. and Geffin, R.** (2006). Maturing neurons are selectively sensitive to human immunodeficiency virus type 1 exposure in differentiating human neuroepithelial progenitor cell cultures. *J Neurovirol* **12**, 333-48.
- McKay, R.** (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science* **276**, 66-71.
- Memberg, S. P. and Hall, A. K.** (1995). Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin. *J Neurobiol* **27**, 26-43.
- Merkle, F. T., Tramontin, A. D., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17528-32.
- Messam, C. A., Hou, J., Berman, J. W. and Major, E. O.** (2002). Analysis of the temporal expression of nestin in human fetal brain derived neuronal and glial progenitor cells. *Brain Res Dev Brain Res* **134**, 87-92.
- Messam, C. A., Hou, J., Gronostajski, R. M. and Major, E. O.** (2003). Lineage pathway of human brain progenitor cells identified by JC virus susceptibility. *Ann Neurol* **53**, 636-46.
- Messam, C. A., Hou, J. and Major, E. O.** (2000). Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody. *Exp Neurol* **161**, 585-96.
- Messam, C. A. and Major, E. O.** (2000). Stages of restricted HIV-1 infection in astrocyte cultures derived from human fetal brain tissue. *J Neurovirol* **6 Suppl 1**, S90-4.
- Messing, A. and Brenner, M.** (2003). GFAP: functional implications gleaned from studies of genetically engineered mice. *Glia* **43**, 87-90.

- Michalczyk, K. and Ziman, M.** (2005). Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* **20**, 665-71.
- Middleton, G., Hamanoue, M., Enokido, Y., Wyatt, S., Pennica, D., Jaffray, E. et al.** (2000). Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol* **148**, 325-32.
- Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M. and Eisdorfer, C.** (2002). The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **202**, 13-23.
- Ming, G. L. and Song, H.** (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **28**, 223-50.
- Minghetti, L., Visentin, S., Patrizio, M., Franchini, L., Ajmone-Cat, M. A. and Levi, G.** (2004). Multiple actions of the human immunodeficiency virus type-1 Tat protein on microglial cell functions. *Neurochem Res* **29**, 965-78.
- Mizrachi, Y., Rodriguez, I., Sweetnam, P. M., Rubinstein, A. and Volsky, D. J.** (1994). HIV type 1 infection of human cortical neuronal cells: enhancement by select neuronal growth factors. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 1593-6.
- Modrow, S., Falke, D. and Truyen, U.** (2003). *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Molne, M., Studer, L., Tabar, V., Ting, Y. T., Eiden, M. V. and McKay, R. D.** (2000). Early cortical precursors do not undergo LIF-mediated astrocytic differentiation. *J Neurosci Res* **59**, 301-11.
- Moore, J. P., Kitchen, S. G., Pugach, P. and Zack, J. A.** (2004). The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 111-26.
- Mukhtar, M., Harley, S., Chen, P., BouHamdan, M., Patel, C., Acheampong, E. et al.** (2002). Primary isolated human brain microvascular endothelial cells express diverse HIV/SIV-associated chemokine coreceptors and DC-SIGN and L-SIGN. *Virology* **297**, 78-88.
- Muller, F. J., Snyder, E. Y. and Loring, J. F.** (2006). Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat Rev Neurosci* **7**, 75-84.
- Muratori, C., Sistigu, A., Ruggiero, E., Falchi, M., Bacigalupo, I., Palladino, C. et al.** (2007). Macrophages transmit human immunodeficiency virus type 1 products to CD4-negative cells: involvement of matrix metalloproteinase 9. *J Virol* **81**, 9078-87.
- Nakano, I. and Kornblum, H. I.** (2003). Stage-Specific and Cell Fate Markers. In *Neural Stem Cells: Development and Transplantation, Chapter 3*, (ed. J. E. Bottenstein), pp. 95-126. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers.
- Nardin, P., Tramontina, F., Leite, M. C., Tramontina, A. C., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L. M. et al.** (2007). S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int* **50**, 774-82.
- Nath, A.** (2002). Human immunodeficiency virus (HIV) proteins in neuropathogenesis of HIV dementia. *J Infect Dis* **186 Suppl 2**, S193-8.
- Nath, A., Hartloper, V., Furer, M. and Fowke, K. R.** (1995). Infection of human fetal astrocytes with HIV-1: viral tropism and the role of cell to cell contact in viral transmission. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**, 320-30.
- Nath, A. and Sacktor, N.** (2006). Influence of highly active antiretroviral therapy on persistence of HIV in the central nervous system. *Curr Opin Neurol* **19**, 358-61.
- Navarro-Galve, B., Villa, A., Bueno, C., Thompson, L., Johansen, J. and Martinez-Serrano, A.** (2005). Gene marking of human neural stem/precursor cells using green fluorescent proteins. *J Gene Med* **7**, 18-29.
- Neil, S. J., Aasa-Chapman, M. M., Clapham, P. R., Nibbs, R. J., McKnight, A. and Weiss, R. A.** (2005). The promiscuous CC chemokine receptor D6 is a functional coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 on astrocytes. *J Virol* **79**, 9618-24.
- Nekhai, S. and Jeang, K. T.** (2006). Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev. *Future Microbiol* **1**, 417-26.

- Neumann, M., Afonina, E., Ceccherini-Silberstein, F., Schlicht, S., Erfle, V., Pavlakis, G. N. et al.** (2001). Nucleocytoplasmic transport in human astrocytes: decreased nuclear uptake of the HIV Rev shuttle protein. *J Cell Sci* **114**, 1717-29.
- Neumann, M., Felber, B. K., Kleinschmidt, A., Froese, B., Erfle, V., Pavlakis, G. N. et al.** (1995). Restriction of human immunodeficiency virus type 1 production in a human astrocytoma cell line is associated with a cellular block in Rev function. *J Virol* **69**, 2159-67.
- Neumann, M., Harrison, J., Saltarelli, M., Hadziyannis, E., Erfle, V., Felber, B. K. et al.** (1994). Splicing variability in HIV type 1 revealed by quantitative RNA polymerase chain reaction. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 1531-42.
- Ni, H. T., Hu, S., Sheng, W. S., Olson, J. M., Cheeran, M. C., Chan, A. S. et al.** (2004). High-level expression of functional chemokine receptor CXCR4 on human neural precursor cells. *Brain Res Dev Brain Res* **152**, 159-69.
- Nunnari, G., Otero, M., Dornadula, G., Vanella, M., Zhang, H., Frank, I. et al.** (2002). Residual HIV-1 disease in seminal cells of HIV-1-infected men on suppressive HAART: latency without on-going cellular infections. *Aids* **16**, 39-45.
- Nuovo, G. J., Gallery, F., MacConnell, P. and Braun, A.** (1994). In situ detection of polymerase chain reaction-amplified HIV-1 nucleic acids and tumor necrosis factor-alpha RNA in the central nervous system. *Am J Pathol* **144**, 659-66.
- O'Callaghan, J. P. and Sriram, K.** (2005). Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* **4**, 433-42.
- Obregon, E., Punzon, C., Fernandez-Cruz, E., Fresno, M. and Munoz-Fernandez, M. A.** (1999). HIV-1 infection induces differentiation of immature neural cells through autocrine tumor necrosis factor and nitric oxide production. *Virology* **261**, 193-204.
- Okamoto, S., Kang, Y. J., Brechtel, C. W., Siviglia, E., Russo, R., Clemente, A. et al.** (2007). HIV/gp120 decreases adult neural progenitor cell proliferation via checkpoint kinase-mediated cell-cycle withdrawal and G1 arrest. *Cell Stem Cell* **1**, 230-6.
- Olivetta, E., Percario, Z., Fiorucci, G., Mattia, G., Schiavoni, I., Dennis, C. et al.** (2003). HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation. *J Immunol* **170**, 1716-27.
- Orrell, C.** (2005). Antiretroviral adherence in a resource-poor setting. *Curr HIV/AIDS Rep* **2**, 171-6.
- Palmer, T. D., Schwartz, P. H., Taupin, P., Kaspar, B., Stein, S. A. and Gage, F. H.** (2001). Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* **411**, 42-3.
- Pekny, M. and Pekna, M.** (2004). Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol* **204**, 428-37.
- Peng, H., Erdmann, N., Whitney, N., Dou, H., Gorantla, S., Gendelman, H. E. et al.** (2006). HIV-1-infected and/or immune activated macrophages regulate astrocyte SDF-1 production through IL-1beta. *Glia* **54**, 619-29.
- Peng, H., Huang, Y., Rose, J., Erichsen, D., Herek, S., Fujii, N. et al.** (2004). Stromal cell-derived factor 1-mediated CXCR4 signaling in rat and human cortical neural progenitor cells. *J Neurosci Res* **76**, 35-50.
- Peng, H., Whitney, N., Wu, Y., Tian, C., Dou, H., Zhou, Y. et al.** (2008). HIV-1-infected and/or immune-activated macrophage-secreted TNF-alpha affects human fetal cortical neural progenitor cell proliferation and differentiation. *Glia* **56**, 903-16.
- Pereira, L. A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M. J. and Deacon, N. J.** (2000). A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* **28**, 663-8.
- Persaud, D., Ray, S. C., Kajdas, J., Ahonkhai, A., Siberry, G. K., Ferguson, K. et al.** (2007). Slow human immunodeficiency virus type 1 evolution in viral reservoirs in infants treated with effective antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**, 381-90.
- Persidsky, Y. and Poluektova, L.** (2006). Immune privilege and HIV-1 persistence in the CNS. *Immunol Rev* **213**, 180-94.
- Picard-Riera, N., Nait-Oumesmar, B. and Baron-Van Evercooren, A.** (2004). Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system. *J Neurosci Res* **76**, 223-31.

- Pollock, K., Stroemer, P., Patel, S., Stevanato, L., Hope, A., Miljan, E. et al.** (2006). A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol* **199**, 143-55.
- Poluektova, L., Meyer, V., Walters, L., Paez, X. and Gendelman, H. E.** (2005). Macrophage-induced inflammation affects hippocampal plasticity and neuronal development in a murine model of HIV-1 encephalitis. *Glia* **52**, 344-53.
- Pomerantz, R. J. and Horn, D. L.** (2003). Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat Med* **9**, 867-73.
- Pomerantz, R. J., Kuritzkes, D. R., de la Monte, S. M., Rota, T. R., Baker, A. S., Albert, D. et al.** (1987). Infection of the retina by human immunodeficiency virus type I. *N Engl J Med* **317**, 1643-7.
- Popovic, M., Read-Connole, E. and Gallo, R. C.** (1984). T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III. *Lancet* **2**, 1472-3.
- Popovic, M., Tenner-Racz, K., Pelsler, C., Stellbrink, H. J., van Lunzen, J., Lewis, G. et al.** (2005). Persistence of HIV-1 structural proteins and glycoproteins in lymph nodes of patients under highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14807-12.
- Price, J. and Thurlow, L.** (1988). Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development* **104**, 473-82.
- Price, R. W., Brew, B., Sidtis, J., Rosenblum, M., Scheck, A. C. and Cleary, P.** (1988). The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science* **239**, 586-92.
- Qi, X., Koya, Y., Saitoh, T., Saitoh, Y., Shimizu, S., Ohba, K. et al.** (2007). Efficient induction of HIV-1 replication in latently infected cells through contact with CD4+ T cells: involvement of NF-kappaB activation. *Virology* **361**, 325-34.
- Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotin, S. et al.** (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* **494**, 415-34.
- Radja, F., Kay, D. G., Albrecht, S. and Jolicoeur, P.** (2003). Oligodendrocyte-specific expression of human immunodeficiency virus type 1 Nef in transgenic mice leads to vacuolar myelopathy and alters oligodendrocyte phenotype in vitro. *J Virol* **77**, 11745-53.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. and Nitsche, A.** (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 856-62.
- Rajan, P. and McKay, R. D.** (1998). Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* **18**, 3620-9.
- Rakic, P.** (1985). Limits of neurogenesis in primates. *Science* **227**, 1054-6.
- Ransohoff, R. M.** (2003). Snip-snip, kill-kill: truncated SDF-1 and HIV-associated neurodegeneration. *Nat Neurosci* **6**, 1009-11.
- Rao, M. S.** (1999). Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *Anat Rec* **257**, 137-48.
- Rao, M. S., Noble, M. and Mayer-Proschel, M.** (1998). A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3996-4001.
- Rappaport, J., Joseph, J., Croul, S., Alexander, G., Del Valle, L., Amini, S. et al.** (1999). Molecular pathway involved in HIV-1-induced CNS pathology: role of viral regulatory protein, Tat. *J Leukoc Biol* **65**, 458-65.
- Rethwilm, A.** (2007). Foamy virus vectors: an awaited alternative to gammaretro- and lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* **7**, 261-71.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S.** (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707-10.
- Ridet, J. L., Malhotra, S. K., Privat, A. and Gage, F. H.** (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* **20**, 570-7.
- Rostasy, K., Egles, C., Chauhan, A., Kneissl, M., Bahrani, P., Yiannoutsos, C. et al.** (2003). SDF-1alpha is expressed in astrocytes and neurons in the AIDS dementia complex: an in vivo and in vitro study. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**, 617-26.

- Rubio, F. J., Bueno, C., Villa, A., Navarro, B. and Martinez-Serrano, A.** (2000). Genetically perpetuated human neural stem cells engraft and differentiate into the adult mammalian brain. *Mol Cell Neurosci* **16**, 1-13.
- Rudge, J. S., Morrissey, D., Lindsay, R. M. and Pasnikowski, E. M.** (1994). Regulation of ciliary neurotrophic factor in cultured rat hippocampal astrocytes. *Eur J Neurosci* **6**, 218-29.
- Ryder, E. F., Snyder, E. Y. and Cepko, C. L.** (1990). Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J Neurobiol* **21**, 356-75.
- Saadoun, S., Papadopoulos, M. C., Watanabe, H., Yan, D., Manley, G. T. and Verkman, A. S.** (2005). Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci* **118**, 5691-8.
- Sabri, F., Tresoldi, E., Di Stefano, M., Polo, S., Monaco, M. C., Verani, A. et al.** (1999). Nonproductive human immunodeficiency virus type 1 infection of human fetal astrocytes: independence from CD4 and major chemokine receptors. *Virology* **264**, 370-84.
- Sacktor, N.** (2002). The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Neurovirol* **8 Suppl 2**, 115-21.
- Sacktor, N., Lyles, R. H., Skolasky, R., Kleeberger, C., Selnes, O. A., Miller, E. N. et al.** (2001). HIV-associated neurologic disease incidence changes:: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998. *Neurology* **56**, 257-60.
- Sacktor, N., Nakasujja, N., Robertson, K. and Clifford, D. B.** (2007). HIV-associated cognitive impairment in sub-Saharan Africa--the potential effect of clade diversity. *Nat Clin Pract Neurol* **3**, 436-43.
- Sacktor, N. C., Wong, M., Nakasujja, N., Skolasky, R. L., Selnes, O. A., Musisi, S. et al.** (2005). The International HIV Dementia Scale: a new rapid screening test for HIV dementia. *Aids* **19**, 1367-74.
- Sah, D. W., Ray, J. and Gage, F. H.** (1997). Bipotent progenitor cell lines from the human CNS. *Nat Biotechnol* **15**, 574-80.
- Saksena, N. K. and Potter, S. J.** (2003). Reservoirs of HIV-1 in vivo: implications for antiretroviral therapy. *AIDS Rev* **5**, 3-18.
- Sanai, N., Tramontin, A. D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N. M., Gupta, N., Kunwar, S. et al.** (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* **427**, 740-4.
- Sanchez-Ramon, S., Bellon, J. M., Resino, S., Canto-Nogues, C., Gurbindo, D., Ramos, J. T. et al.** (2003). Low blood CD8+ T-lymphocytes and high circulating monocytes are predictors of HIV-1-associated progressive encephalopathy in children. *Pediatrics* **111**, E168-75.
- Sarkar, I., Hauber, I., Hauber, J. and Buchholz, F.** (2007). HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase. *Science* **316**, 1912-5.
- Sauvageot, C. M. and Stiles, C. D.** (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 244-9.
- Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R. and Bushman, F.** (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521-9.
- Schwartz, L., Civitello, L., Dunn-Pirio, A., Ryschkewitsch, S., Berry, E., Cavert, W. et al.** (2007). Evidence of human immunodeficiency virus type 1 infection of nestin-positive neural progenitors in archival pediatric brain tissue. *J Neurovirol* **in press**.
- Schwartz, L. and Major, E. O.** (2006). Neural progenitors and HIV-1-associated central nervous system disease in adults and children. *Curr HIV Res* **4**, 319-27.
- Schweighardt, B., Shieh, J. T. and Atwood, W. J.** (2001). CD4/CXCR4-independent infection of human astrocytes by a T-tropic strain of HIV-1. *J Neurovirol* **7**, 155-62.
- Seelamgari, A., Maddukuri, A., Berro, R., de la Fuente, C., Kehn, K., Deng, L. et al.** (2004). Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci* **9**, 2388-413.
- Seifert, G., Schilling, K. and Steinhauser, C.** (2006). Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* **7**, 194-206.

- Sen, J. and Belli, A.** (2007). S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J Neurosci Res* **85**, 1373-80.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S. and Alvarez-Buylla, A.** (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* **21**, 7153-60.
- Shaheduzzaman, S., Krishnan, V., Petrovic, A., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J. et al.** (2002). Effects of HIV-1 Nef on cellular gene expression profiles. *J Biomed Sci* **9**, 82-96.
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T. and Gould, E.** (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* **410**, 372-6.
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y. and Gould, E.** (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* **12**, 578-84.
- Siliciano, J. D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J. B. et al.** (2003). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* **9**, 727-8.
- Simon, V., Ho, D. D. and Abdool Karim, Q.** (2006). HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* **368**, 489-504.
- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J. and Wojtowicz, J. M.** (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* **130**, 843-52.
- Song, H., Stevens, C. F. and Gage, F. H.** (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417**, 39-44.
- Song, M. R. and Ghosh, A.** (2004). FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci* **7**, 229-35.
- Sonza, S. and Crowe, S. M.** (2001). Reservoirs for HIV infection and their persistence in the face of undetectable viral load. *AIDS Patient Care STDS* **15**, 511-8.
- Speth, C., Schabetsberger, T., Mohsenipour, I., Stockl, G., Wurzner, R., Stoiber, H. et al.** (2002). Mechanism of human immunodeficiency virus-induced complement expression in astrocytes and neurons. *J Virol* **76**, 3179-88.
- St Hillaire, C., Vargas, D., Pardo, C. A., Gincel, D., Mann, J., Rothstein, J. D. et al.** (2005). Aquaporin 4 is increased in association with human immunodeficiency virus dementia: implications for disease pathogenesis. *J Neurovirol* **11**, 535-43.
- Stavrou, D., Bise, K., Groeneveld, J., Stocker, U., Kretzschmar, H. A., Keiditsch, E. et al.** (1989). Antigenic heterogeneity of human brain tumors defined by monoclonal antibodies. *Anticancer Res* **9**, 1489-96.
- Steiner, B., Kronenberg, G., Jessberger, S., Brandt, M. D., Reuter, K. and Kempermann, G.** (2004). Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* **46**, 41-52.
- Steiner, J., Bernstein, H. G., Bielau, H., Berndt, A., Brisch, R., Mawrin, C. et al.** (2007). Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci* **8**, 2.
- Strain, M. C., Gunthard, H. F., Havlir, D. V., Ignacio, C. C., Smith, D. M., Leigh-Brown, A. J. et al.** (2003). Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: intrinsic stability predicts lifelong persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4819-24.
- Su, M., Hu, H., Lee, Y., d'Azzo, A., Messing, A. and Brenner, M.** (2004). Expression specificity of GFAP transgenes. *Neurochem Res* **29**, 2075-93.
- Su, Z. Z., Kang, D. C., Chen, Y., Pekarskaya, O., Chao, W., Volsky, D. J. et al.** (2002). Identification and cloning of human astrocyte genes displaying elevated expression after infection with HIV-1 or exposure to HIV-1 envelope glycoprotein by rapid subtraction hybridization, RaSH. *Oncogene* **21**, 3592-602.
- Su, Z. Z., Kang, D. C., Chen, Y., Pekarskaya, O., Chao, W., Volsky, D. J. et al.** (2003). Identification of gene products suppressed by human immunodeficiency virus type 1 infection or gp120 exposure of primary human astrocytes by rapid subtraction hybridization. *J Neurovirol* **9**, 372-89.
- Sulyok, E., Vajda, Z., Doczi, T. and Nielsen, S.** (2004). Aquaporins and the central nervous system. *Acta Neurochir (Wien)* **146**, 955-60.
- Svendsen, C. N., Caldwell, M. A. and Ostenfeld, T.** (1999). Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. *Brain Pathol* **9**, 499-513.

- Svendsen, C. N., Clarke, D. J., Rosser, A. E. and Dunnett, S. B.** (1996). Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. *Exp Neurol* **137**, 376-88.
- Takahashi, K., Wesselingh, S. L., Griffin, D. E., McArthur, J. C., Johnson, R. T. and Glass, J. D.** (1996). Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/in situ hybridization and immunocytochemistry. *Ann Neurol* **39**, 705-11.
- Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M. et al.** (2001). DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* **1**, 749-58.
- Tamula, M. A., Wolters, P. L., Walsek, C., Zeichner, S. and Civitello, L.** (2003). Cognitive decline with immunologic and virologic stability in four children with human immunodeficiency virus disease. *Pediatrics* **112**, 679-84.
- Tardieu, M., Le Chenadec, J., Persoz, A., Meyer, L., Blanche, S. and Mayaux, M. J.** (2000). HIV-1-related encephalopathy in infants compared with children and adults. French Pediatric HIV Infection Study and the SEROCO Group. *Neurology* **54**, 1089-95.
- Taupin, P. and Gage, F. H.** (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* **69**, 745-9.
- Thomas, S. K., Messam, C. A., Spengler, B. A., Biedler, J. L. and Ross, R. A.** (2004). Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **279**, 27994-9.
- Thompson, K. A., Churchill, M. J., Gorry, P. R., Sterjovski, J., Oelrichs, R. B., Wesselingh, S. L. et al.** (2004). Astrocyte specific viral strains in HIV dementia. *Ann Neurol* **56**, 873-7.
- Tornatore, C., Meyers, K., Atwood, W., Conant, K. and Major, E.** (1994). Temporal patterns of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in human fetal astrocytes. *J Virol* **68**, 93-102.
- Tornatore, C., Nath, A., Amemiya, K. and Major, E. O.** (1991). Persistent human immunodeficiency virus type 1 infection in human fetal glial cells reactivated by T-cell factor(s) or by the cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta. *J Virol* **65**, 6094-100.
- Torres-Munoz, J., Stockton, P., Tacoronte, N., Roberts, B., Maronpot, R. R. and Petito, C. K.** (2001). Detection of HIV-1 gene sequences in hippocampal neurons isolated from postmortem AIDS brains by laser capture microdissection. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 885-92.
- Tran, P. B. and Miller, R. J.** (2005). HIV-1, chemokines and neurogenesis. *Neurotox Res* **8**, 149-58.
- Tran, P. B., Ren, D. and Miller, R. J.** (2005). The HIV-1 coat protein gp120 regulates CXCR4-mediated signaling in neural progenitor cells. *J Neuroimmunol* **160**, 68-76.
- Tran, P. B., Ren, D., Veldhouse, T. J. and Miller, R. J.** (2004). Chemokine receptors are expressed widely by embryonic and adult neural progenitor cells. *J Neurosci Res* **76**, 20-34.
- Trillo-Pazos, G., Diamanturos, A., Rislove, L., Menza, T., Chao, W., Belem, P. et al.** (2003). Detection of HIV-1 DNA in microglia/macrophages, astrocytes and neurons isolated from brain tissue with HIV-1 encephalitis by laser capture microdissection. *Brain Pathol* **13**, 144-54.
- Truckenmiller, M. E., Kulaga, H., Coggiano, M., Wyatt, R., Snyder, S. H. and Sweetnam, P. M.** (1993). Human cortical neuronal cell line: a model for HIV-1 infection in an immature neuronal system. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 445-53.
- Tsuchiya, R., Yoshiki, F., Kudo, Y. and Morita, M.** (2002). Cell type-selective expression of green fluorescent protein and the calcium indicating protein, yellow cameleon, in rat cortical primary cultures. *Brain Res* **956**, 221-9.
- Tureyen, K., Vemuganti, R., Bowen, K. K., Sailor, K. A. and Dempsey, R. J.** (2005). EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain. *Neurosurgery* **57**, 1254-63; discussion 1254-63.
- Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V. et al.** (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14720-5.

- Van Lint, C., Quivy, V., Demonte, D., Chariot, A., Vanhulle, C., de Walque, S. et al.** (2004). Molecular mechanisms involved in HIV-1 transcriptional latency and reactivation: implications for the development of therapeutic strategies. *Bull Mem Acad R Med Belg* **159**, 176-89.
- van Marle, G., Antony, J. M., Silva, C., Sullivan, A. and Power, C.** (2005). Aberrant cortical neurogenesis in a pediatric neuroAIDS model: neurotrophic effects of growth hormone. *Aids* **19**, 1781-91.
- Venkatesan, A., Nath, A., Ming, G. L. and Song, H.** (2007). Adult hippocampal neurogenesis: regulation by HIV and drugs of abuse. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2120-32.
- Ventura, R. E. and Goldman, J. E.** (2007). Dorsal radial glia generate olfactory bulb interneurons in the postnatal murine brain. *J Neurosci* **27**, 4297-302.
- Verkman, A. S.** (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci* **118**, 3225-32.
- Vescovi, A. L., Parati, E. A., Gritti, A., Poulin, P., Ferrario, M., Wanke, E. et al.** (1999). Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* **156**, 71-83.
- Vicenzi, E., Biswas, P., Mengozzi, M. and Poli, G.** (1997). Role of pro-inflammatory cytokines and beta-chemokines in controlling HIV replication. *J Leukoc Biol* **62**, 34-40.
- Victoriano, A. F., Asamitsu, K., Hibi, Y., Imai, K., Barzaga, N. G. and Okamoto, T.** (2006). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in latently infected cells by a novel IkappaB kinase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 547-55.
- Villa, A., Navarro, B. and Martinez-Serrano, A.** (2002). Genetic perpetuation of in vitro expanded human neural stem cells: cellular properties and therapeutic potential. *Brain Res Bull* **57**, 789-94.
- Villa, A., Navarro-Galve, B., Bueno, C., Franco, S., Blasco, M. A. and Martinez-Serrano, A.** (2004). Long-term molecular and cellular stability of human neural stem cell lines. *Exp Cell Res* **294**, 559-70.
- Villa, A., Rubio, F. J., Navarro, B., Bueno, C. and Martinez-Serrano, A.** (2001). Human neural stem cells in vitro. A focus on their isolation and perpetuation. *Biomed Pharmacother* **55**, 91-5.
- Villa, A., Snyder, E. Y., Vescovi, A. and Martinez-Serrano, A.** (2000). Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS. *Exp Neurol* **161**, 67-84.
- Volterra, A. and Meldolesi, J.** (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* **6**, 626-40.
- Walz, W.** (2000). Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia* **31**, 95-103.
- Wang, Z., Pekarskaya, O., Bencheikh, M., Chao, W., Gelbard, H. A., Ghorpade, A. et al.** (2003). Reduced expression of glutamate transporter EAAT2 and impaired glutamate transport in human primary astrocytes exposed to HIV-1 or gp120. *Virology* **312**, 60-73.
- Wang, Z., Trillo-Pazos, G., Kim, S. Y., Canki, M., Morgello, S., Sharer, L. R. et al.** (2004). Effects of human immunodeficiency virus type 1 on astrocyte gene expression and function: potential role in neuropathogenesis. *J Neurovirol* **10 Suppl 1**, 25-32.
- Wegner, M.** (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* **27**, 1409-20.
- Wegner, M. and Stolt, C. C.** (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci* **28**, 583-8.
- Weiss, S., Reynolds, B. A., Vescovi, A. L., Morshead, C., Craig, C. G. and van der Kooy, D.** (1996). Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci* **19**, 387-93.
- Widera, D., Mikenberg, I., Elvers, M., Kaltschmidt, C. and Kaltschmidt, B.** (2006). Tumor necrosis factor alpha triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-kappaB signaling. *BMC Neurosci* **7**, 64.
- Wiley, C. A., Achim, C. L., Christopherson, C., Kidane, Y., Kwok, S., Masliah, E. et al.** (1999). HIV mediates a productive infection of the brain. *Aids* **13**, 2055-9.

- Wiley, C. A., Baldwin, M. and Achim, C. L.** (1996). Expression of HIV regulatory and structural mRNA in the central nervous system. *Aids* **10**, 843-7.
- Willey, S. J., Reeves, J. D., Hudson, R., Miyake, K., Dejuqc, N., Schols, D. et al.** (2003). Identification of a subset of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), HIV-2, and simian immunodeficiency virus strains able to exploit an alternative coreceptor on untransformed human brain and lymphoid cells. *J Virol* **77**, 6138-52.
- Williams, S. A., Kwon, H., Chen, L. F. and Greene, W. C.** (2007). Sustained induction of NF-kappa B is required for efficient expression of latent human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **81**, 6043-56.
- Wolff, H., Brack-Werner, R., Neumann, M., Werner, T. and Schneider, R.** (2003). Integrated functional and bioinformatics approach for the identification and experimental verification of RNA signals: application to HIV-1 INS. *Nucleic Acids Res* **31**, 2839-51.
- Wolff, H., Hadian, K., Ziegler, M., Weierich, C., Kramer-Hammerle, S., Kleinschmidt, A. et al.** (2006). Analysis of the influence of subcellular localization of the HIV Rev protein on Rev-dependent gene expression by multi-fluorescence live-cell imaging. *Exp Cell Res* **312**, 443-56.
- Wu, Y., Beddall, M. H. and Marsh, J. W.** (2007). Rev-dependent lentiviral expression vector. *Retrovirology* **4**, 12.
- Ying, Q. L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M. and Smith, A.** (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* **21**, 183-6.
- Yoneda, K., Yamamoto, N., Asai, K., Sobue, K., Fujita, Y., Fujita, M. et al.** (2001). Regulation of aquaporin-4 expression in astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* **89**, 94-102.
- Yoshida, M.** (2001). Intermediate filament proteins define different glial subpopulations. *J Neurosci Res* **63**, 284-9.
- Zaitseva, M., Peden, K. and Golding, H.** (2003). HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1614**, 51-61.
- Zhang, H., Dornadula, G., Beumont, M., Livornese, L., Jr., Van Uiter, B., Henning, K. et al.** (1998). Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy. *N Engl J Med* **339**, 1803-9.
- Zhang, K., McQuibban, G. A., Silva, C., Butler, G. S., Johnston, J. B., Holden, J. et al.** (2003a). HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* **6**, 1064-71.
- Zhang, K., Rana, F., Silva, C., Ethier, J., Wehrly, K., Chesebro, B. et al.** (2003b). Human immunodeficiency virus type 1 envelope-mediated neuronal death: uncoupling of viral replication and neurotoxicity. *J Virol* **77**, 6899-912.
- Zhang, Q., Qin, H., Lang, B., Liu, H., Han, H. and Ju, G.** (2005). Different regions of the mouse nestin enhancer may function differentially in nestin expression in an NSC-like cell line and astrocytes. *Neurosci Lett* **379**, 90-5.
- Zheng, J., Thylin, M. R., Ghorpade, A., Xiong, H., Persidsky, Y., Cotter, R. et al.** (1999). Intracellular CXCR4 signaling, neuronal apoptosis and neuropathogenic mechanisms of HIV-1-associated dementia. *J Neuroimmunol* **98**, 185-200.
- Zhou, B. Y., Liu, Y., Kim, B., Xiao, Y. and He, J. J.** (2004). Astrocyte activation and dysfunction and neuron death by HIV-1 Tat expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci* **27**, 296-305.
- Zimmerman, L., Parr, B., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Gavin, B. et al.** (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* **12**, 11-24.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.d.	Aqua destillata (doppelt-deionisiertes Wasser)
AIDS	<i>Aquired Immuno Deficiency Syndrom</i>
AK	Antikörper
ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, USA
ATP	Adenosintriphosphat
AQP	Aquaporin
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CA	Kapsid-Protein (<i>capsid</i>)
CCR5	<i>chemokine receptor 5</i>
cDNA	komplementäre DNA (hergestellt durch reverse Transkription)
CIP	alkalische Phosphatase („ <i>calf intensine phosphatase</i> “)
CMV	Cytomegalovirus
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CXCR4	<i>chemokine receptor 4</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat (N steht für eine der vier Basen)
DOC	Natrium-Desoxycholate
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (<i>enhanced chemoluminescence</i>)
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Env	Virales Hüllglykoprotein (<i>envelope</i>)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphatdehydrogenase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HAD	<i>HIV associated dementia</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HNSC	<i>human neural stem cell</i>
HTLV	<i>human T-cell leukemia virus</i>
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
kb, kbp	Kilobasen, Kilobasenpaare

kD, kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Bakterienmedium nach Luria-Bertani
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
Lsg.	Lösung
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
m	milli
M	Mol
MA	Matrix-Protein
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	Multiple Klonierungssequenz (" <i>multiple cloning site</i> ")
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (" <i>messenger ribonucleic acid</i> ")
n	nano
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappaB</i>
NC	Nukleokapsid-Protein (<i>nucleocapsid</i>)
NES	Kernexportsignal (" <i>nuclear export signal</i> ")
NLS	Kernlokalisierungssignal (" <i>nuclear localisation signal</i> ")
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
p	p-Wert der statistischen Signifikanz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (" <i>phosphate buffered saline</i> ")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (" <i>polymerase chain reaction</i> ")
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pol	Polymerase-Gen
REV	" <i>regulator of expression of virion proteins</i> "
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RPII	RNA Polymerase II
rpm	<i>rounds per minute</i>
RRE	<i>rev response element</i>
RT	Reverse Transkriptase bzw. Raumtemperatur
SDF1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (" <i>sodiumdodecylsulfate</i> ")
SFFV	<i>spleen focus forming virus</i>
Sek.	Sekunde
SOC	Bakterienvollmedium
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAR	<i>tat activation response element</i>
<i>TNF-α</i>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TE	Tris-EDTA
Tm	Schmelzpunkt
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
μ	Mikro
U/min	Umdrehungen pro Minute
UNO	<i>United Nations Organization</i>
w/v	Gewicht/Volumen-Verhältnis
ZNS	Zentrales Nervensystem

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Ina Julia Rothenaigner
Gärtnerstr.30
D-82194 Gröbenzell
ina.rot@gmx.de
* 22. Juli 1978 in München

Ausbildung

- | | |
|-------------------|--|
| seit 05/2004 | Doktorandin am Institut für Virologie, Helmholtz Zentrum München in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Ruth Brack-Werner
Thema: "HIV-1 Persistenz in humanen neuronalen Progenitorpopulationen" |
| 10/1998-02/2004 | Diplomstudium Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
Hauptfach: Genetik, Nebenfächer: Anthropologie und Humangenetik, Physiologische Botanik und Immunologie
Abschluss: Diplom-Biologin |
| 09/1989 - 06/1998 | Gymnasium in Puchheim
Abschluss: Abitur |

Weiterbildungen

- | | |
|---------|--|
| 12/2005 | Fortbildungsveranstaltung "Schutz und Vermarktung von Forschungsergebnissen" |
| 12/2006 | Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für die Biologische Sicherheit |

Veröffentlichungen

Publikationen

Kramer-Hämmerle S., Rothenaigner I., Brack-Werner R., **Differenzierung einer humanen neuronalen Stammzelllinie unter verschiedenen Wachstumsbedingungen**, Biospektrum-6/04-10.Jahrgang, 2004

Kramer-Hämmerle S., Rothenaigner I., Wolff H., Bell J.E., Brack-Werner R., **Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus**, Virus Research 111, 194-213, 2005, Review-Artikel

Rothenaigner I.*, Kramer S.*, Ziegler M., Wolff H., Kleinschmidt A., Brack-Werner R., **Long-term HIV-1 infection of neural progenitor populations**, AIDS 21, 2271-2281, 2007 (*gleichberechtigte Autoren)

Rothenaigner I.*, Kramer S.*, Meggendorfer M., Rethwilm A., Brack-Werner R., **Transduction of human neural progenitor cells with foamy virus vectors for differentiation-dependent gene expression** (*gleichberechtigte Autoren), *eingereicht*

Vorträge

Rothenaigner I., Brack-Werner R., Erle V., Rethwilm A., Kramer-Hämmerle S., **Cell-specific gene expression in human neural stem cells using foamy viral vectors**, Workshop „Viral Vectors“ of the Society of Virology (GfV) and Annual Meeting of the German Society of Gene Therapy, Würzburg, 2005

Rothenaigner I., Kramer S., Kleinschmidt A., Brack-Werner R., **HIV-infection of astrocytic progenitor cells**, Annual meeting of the Society of Virology (GfV), München, 2006

Rothenaigner I., Kramer S., Ziegler M., Wolff H., Kleinschmidt A., Brack-Werner R., **HIV persistence in neural progenitor cell populations**, International Symposium on Neurovirology, San Diego, California, USA, 2007

Poster

Rothenaigner I., Kramer-Hämmerle S., Wolff H., Kleinschmidt A., Brack-Werner R., **HIV-1 Rev activity in a human neural stem cell line**, Annual meeting of the Society of Virology (GfV), Hannover, 2005

Rothenaigner I., Kramer S., Kleinschmidt A., Wolff H., Brack-Werner R., **HIV-1 infection of astrocytic progenitor cells**, International Symposium on Neurovirology, Philadelphia, USA, 2006

Rothenaigner I., Kramer S., Ziegler M., Wolff H., Brack-Werner R., **HIV-1 Infection of Neural Progenitor Cells**, Second HIV Infection and the Central Nervous System: Developed and Resource-Limited Settings & Evolving Mechanisms of HIV Neuropathogenesis in the HAART era: Domestic and Global Issues, Venedig, Italien, 2007

Rothenaigner I., Kramer S., Ziegler M., Wolff H., Brack-Werner R., **HIV-1 Infection Neural Progenitor Cells**, Euroglia Meeting, London, UK, 2007

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zu dieser Dissertationsarbeit beigetragen haben:

Frau Prof. Dr. Ruth Brack-Werner gebührt großer Dank für die Bereitstellung des spannenden Themas meiner Dissertation und die Betreuung meiner Arbeit. Ihr Interesse und ihre Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Benedikt Grothe, der sich bereit erklärt hat diese Arbeit zu begutachten.

Herzlich danken möchte ich auch Frau Dr. Manja Megendorfer, für ihre Hilfe bei den Light-Cycler-Analysen, welche diese Arbeit um einiges reicher gemacht haben und auch Herrn Dr. Horst Wolff für seine Hilfe bei der Auswertung von Hunderten von Zellen.

Bei Herrn Prof. Dr. Axel Rethwilm möchte ich mich für die erfolgreiche Kollaboration und für die schönen Tage in Würzburg bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Susanne Kramer, die mich in dieses Projekt eingeführt hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, auch aus weiter Ferne.

Danken möchte ich auch Frau Michelle Vincendeau: eine bessere Bürogemeinschaft kann man sich nicht wünschen! Und Herrn Kamyar Hadian danke ich dafür, dass wir unsere Doktoranden-Zeit nun gemeinsam erfolgreich durchgestanden haben.

Ich bin furchtbar froh und stolz, in Euch dreien so gute, hilfsbereite Freunde gefunden zu haben. Ich freue mich schon auf unseren nächsten gemeinsamen Urlaub!

Auch bei allen anderen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die zahlreichen Hilfestellungen bedanken. Sie alle haben dazu beigetragen, dass ich gerne ins Labor gekommen bin. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Ursula Voll, Frau Hildegard Witte und dem Team der Spülküche, Frau Karin Eberl, Frau Anna Hauptkorn und Frau Ana Grenner bedanken, welche die Arbeit im Labor sehr erleichtert haben.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Mama und Michi für ihre Unterstützung während der gesamten Zeit und ihre Liebe.

Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Mittel und Quellen angefertigt wurde. Desweiteren erkläre ich, dass die vorgelegte Dissertation weder ganz noch in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde. Ich habe mich anderweitig keiner Doktorprüfung unterzogen.

München im Mai 2008

Ina Rothenaigner