

Untersuchungen zur Rolle des HIV-1-Tat-Proteins in der AIDS-assoziierten Vaskulopathie

Dissertation

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

vorgelegt von

Kathrin Matzen

Juni 2003, München

Die Arbeit wurde am Institut für Molekulare Virologie, in der Abteilung Virale Vaskulopathie
(Leitung: Univ. Prof. Dr. Michael Stürzl), des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und
Gesundheit, München, durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Ruth Brack-Werner
 2. Gutachter: PD Dr. Brian Salmons
- Sondergutachter: Univ. Prof. Dr. Michael Stürzl
- Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.03

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Der Aufbau von HIV-1	3
2.2. Endothelzellschädigungen bei HIV-1-infizierten Patienten	5
2.2.1. Pathomorphologische Veränderungen des Aortenendothel bei HIV-1-infizierten Patienten	6
2.2.2. Die Endothelzellschädigungen der Blut-Hirn-Schranke bei HIV-1-infizierten Patienten	7
2.2.3. Das Kaposi-Sarkom und seine Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese	8
2.3. Die Rolle von inflammatorischen Zytokinen in der AIDS-assoziierten Vaskulopathie	10
2.4. Die Rolle von angiogenen Wachstumsfaktoren in der AIDS-assoziierten Vaskulopathie	12
2.5. Das HIV-1-Tat-Protein	13
2.5.1. Der Aufbau von HIV-1-Tat	14
2.5.2. Die Rolle von HIV-1-Tat in der AIDS-assoziierten Vaskulopathie	15
2.5.3. HIV-1-Tat-Effekte durch Bindung an Oberflächen-Rezeptoren	15
2.5.4. HIV-1-Tat-Effekte durch Transaktivierung	16
2.5.5. Die angiogenen Eigenschaften von HIV-1-Tat	17
2.6. Molekulare Mechanismen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	18
2.7. Fragestellung und Zielsetzung	20
3. Ergebnisse	22
3.1. HIV-1-Tat und TNF- α erhöhten synergistisch die Adhäsion von U937-Zellen an HMVEZ	22
3.2. HIV-1-Tat und TNF- α erhöhten synergistisch die Adhäsion von PBMZ an HMVEZ	25
3.3. TNF- α erhöhte die Adhäsionskompetenz von HMVEZ für Monozyten, T-Zellen und B-Zellen gleichermaßen	27
3.4. HIV-1-Tat aktivierte spezifisch die Adhäsion von T-Zellen und Monozyten auf TNF- α -stimulierte HMVEZ	29
3.5. HIV-1-Tat und TNF- α erhöhten synergistisch die Adhäsion von Leukozyten auf das Endothel <i>in vivo</i>	31

3.6. Zusammenfassung des Kapitels 3.1 - 3.5.: TNF- α und HIV-1-Tat erhöhen synergistisch die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	33
3.7. Untersuchungen zur Wirkung des HIV-1-Tat-Proteins auf die Genexpression in Monozyten	33
3.7.1. Die SSH-Methode zur Isolierung differentiell exprimierter Gene	34
3.7.1.1. Anwendung der SSH-Methode zur Identifizierung HIV-1-Tat-supprimierter Gene in Monozyten	37
3.7.1.1.1. Identifizierung HIV-1-Tat-supprimierter Gene in U937-Zellen	37
3.7.1.1.2. Nachweis differentiell exprimierter cDNA-Sequenzen mittels <i>Southern blot</i> -Analyse	38
3.7.1.1.3. HIV-1-Tat hemmt die OGT-Expression in U937-Zellen	39
3.7.1.1.4. VEGF ₁₂₁ hemmt in U937-Zellen die Expression von OGT auf mRNA-Ebene und Protein-Ebene	43
3.7.1.1.5. Die OGT-Expression in U937-Zellen wird selektiv durch HIV-1-Tat und VEGF ₁₂₁ gehemmt	45
3.7.1.1.6. Die Hemmung der OGT-Expression durch HIV-1-Tat wird über Flt-1 vermittelt	46
3.7.1.1.7. Die Abnahme des zellulären OGT-Proteins durch HIV-1-Tat wird nicht durch den Abbau im Proteasom bewirkt	47
3.7.1.1.8. Untersuchung des Effekts von HIV-1-Tat auf die OGT-Expression in PBMZ	50
3.8. Zusammenfassung des Kapitels 3.7: Identifizierung eines HIV-1-Tat-regulierten Gens in Monozyten	52
4. Diskussion	54
4.1. Beeinflussung der Adhäsionsfähigkeit von Leukozyten an Endothelzellen durch HIV-1-Tat und TNF- α	55
4.2. Wirkung des HIV-1-Tat-Proteins auf die Genexpression in Monozyten	59
5. Material und Methoden	64
5.1. Material	64
5.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel	64
5.1.2. Antikörper	66
5.1.3. Proteaseinhibitoren	67
5.1.4. Radiochemikalien	67

5.1.5. Enzyme	67
5.1.6. Vektoren und Plasmide	67
5.1.7. Biologisches Material	68
5.1.7.1. Bakterienstämme	68
5.1.7.2. Eukaryontische Zellen	68
5.2. Methoden	69
5.2.1. Allgemein benötigte Puffer, Lösungen und Medien	69
5.2.2. Zellbiologische Methoden	70
5.2.2.1. Allgemeine Zellkultur	70
5.2.2.2. Isolierung von PBMZ aus dem Blut	72
5.2.2.3. <i>In vitro</i> -Adhäsionstest	72
5.2.2.4. <i>Intravital</i> -Mikroskopie	73
5.2.3. Handhabung des HIV-1-Tat-Proteins	74
5.2.4. Bakterienkultivierung	75
5.2.5. Proteinchemische Methoden	75
5.2.5.1. Quantitative Proteinbestimmung der RIPA-Extrakte nach Bradford	75
5.2.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	76
5.2.5.3. Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	78
5.2.5.4. Elektrotransfer von Proteinen	78
5.2.5.5. <i>Western blot</i> -Analyse	79
5.2.6. DNA-Technologie	79
5.2.6.1. Plasmidisolierung	79
5.2.6.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	80
5.2.6.3. Reinigung und Konzentrierung von DNA-Fragmenten	81
5.2.6.3.1. Phenolbehandlung	81
5.2.6.3.2. Fällern von DNA mit Isopropanol	81
5.2.6.4. Enzymatische Modifikation von DNA-Molekülen	82
5.2.6.4.1. Schneiden der DNA mit Restriktionsendonuklease	82
5.2.6.4.2. Auffüllreaktion	82
5.2.6.4.3. Dephosphorylierung linearer DNA-Moleküle	83
5.2.6.4.4. Ligation von DNA-Molekülen	83
5.2.6.5. Nichtdenaturierende Agarose-Gelelektrophorese	84
5.2.6.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	85
5.2.6.7. Transformation von Bakterien mit Plasmiden	85
5.2.6.7.1. Herstellung kompetenter Zellen für Elektroporation	85
5.2.6.7.2. Elektroporation von Bakterien	86
5.2.6.7.3. Herstellung kompetenter Zellen für die Kalziumchlorid-Transformation	87

5.2.6.7.4. Kalziumchlorid-Transformation von Bakterien	87
5.2.6.8. Synthetische Oligonukleotide	89
5.2.6.9. Polymerasekettenreaktion (PCR)	90
5.2.6.10. Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	91
5.2.6.11. SSH-Methode	91
5.2.6.12. <i>Southern blot</i> -Analyse	93
5.2.6.12.1. Kapillar-Transfer der DNA auf Nitrozellulosemembran	93
5.2.6.12.2. Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschung der Filter	94
5.2.6.13. Herstellung radioaktiv markierter Sonden	95
5.2.6.13.1. Radioaktive Markierung von DNA	95
5.2.6.13.2. Reinigung der radioaktiv markierten Sonden	97
5.2.6.13.3. Bestimmung der spezifischen Aktivität radioaktiv markierter DNA	97
5.2.7. RNA-Technologie	97
5.2.7.1. Isolierung gesamtzellulärer RNA aus eukaryontischen Zellen	97
5.2.7.2. Isolierung polyadenylierter RNA aus gesamtzellulärer RNA	98
5.2.7.3. Nichtdenaturierende Elektrophorese von RNA	98
5.2.7.4. <i>Northern blot</i> -Analyse	99
5.2.7.4.1. Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA	99
5.2.7.4.2. Transfer der RNA auf Nylonmembranen	100
5.2.7.4.3. Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschung	100
5.2.7.4.4. <i>Strip-wash</i>	101
6. Literatur	102
7. Abkürzungen	129
8. Lebenslauf und Publikationsliste	132
9. Danksagung	136

1. Zusammenfassung

Bei Patienten, die mit dem humanen Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) infiziert sind, kommt es häufig zu krankhaften Veränderungen des Endothels, die zu einer Fehlfunktion des Gefäßsystems führen. Klinischer Ausdruck dieser als *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS)-assoziierten Vaskulopathie bezeichneten Veränderungen sind Schädigungen des Aortenendothels, die mit einer erhöhten Adhäsion mononukleärer Zellen an das Endothel einhergehen, Defekte der Blut-Hirn-Schranke, die zur Entstehung von Demenz beitragen, sowie das Kaposi-Sarkom (KS), das durch eine sehr starke Extravasation von T-Zellen und Monozyten gekennzeichnet ist.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass das regulatorische HIV-1-Tat-Protein und das inflammatorische Zytokin TNF- α synergistisch die Adhäsion der promonozytären Zelllinie U937 und von PBMZ an humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVEZ) erhöht. Die adhäsionsfördernde Wirkung wurde selektiv bei HIV-1-Tat beobachtet, andere virale Proteine des HIV-1, wie Negativfaktor (Nef) und das Glykoprotein gp41, hatten keinen Einfluss auf die Adhäsion. Anhand zellspezifischer Marker wurde gezeigt, dass HIV-1-Tat in periphere mononukleäre Blutzellen (PBMZ) spezifisch die Adhäsion von Monozyten und T-Zellen erhöhte, jedoch nicht von B-Zellen. Intravital-mikroskopische Untersuchungen an der Maus bestätigten *in vivo*, dass HIV-1-Tat und TNF- α synergistisch die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel erhöhten.

HIV-1-Tat reguliert die Expression einer großen Anzahl zellulärer Gene. Diese Fehlregulation durch HIV-1-Tat könnte an der Entstehung der AIDS-assoziierten Vaskulopathie beteiligt sein. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die parakrine Wirkung von HIV-1-Tat auf die Genexpression in Monozyten mittels der *suppressed subtractive hybridization* (SSH)-Methode untersucht. Hierbei wurde *O-linked N-Acetylglucosamine-transferase* (OGT) als Gen identifiziert, dessen Expression durch HIV-1-Tat unterdrückt wird. Bisher ist bekannt, dass OGT ein Repressor der basalen Transkription und der SP-1-regulierten Transkription ist.

Die Expression von OGT wurde sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene durch HIV-1-Tat und VEGF₁₂₁ gehemmt, wobei die Regulierung über den VEGF-Rezeptor Flt-1 vermittelt wurde. Weitere Faktoren wie inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ und IL-2), angiogene Wachstumsfaktoren (bFGF und VEGF₁₆₅) und Chemokine (IL-8, MIP-1 α , IP-10, MCP-1 und SDF-1 α) hatten keine hemmende Wirkung auf die OGT-Expression. Die schnelle

Abnahme von intrazellulärem OGT-Protein wurde weder durch lysosomale Proteasen noch durch Proteasen des Proteasoms verursacht. Expressionsstudien an PBMZ von fünf verschiedenen Probanden zeigten, dass bei zwei Probanden die OGT-Konzentration durch HIV-1-Tat zunahm, bei zweien nahm sie ab und bei einer Person gab es keine Veränderung.

Diese Ergebnisse belegen, dass HIV-1-Tat entscheidend an der Entstehung der AIDS-assoziierten Vaskulopathie, insbesondere von KS, beteiligt sein könnte. Die Repression von OGT durch HIV-1-Tat könnte die weitreichende Wirkung des HIV-1-Tat-Proteins auf zelluläre und virale Gene erklären.

2. Einleitung

Das erworbene Immunschwäche-Syndrom *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) wurde 1981 zum ersten Mal bei homosexuellen Männer mit schweren opportunistischen Infektionen beschrieben. 1983 gelang es den Arbeitsgruppen von Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris und von Robert C. Gallo am National Cancer Institut in Bethesda, USA, aus Lymphozyten von AIDS-Patienten das humane Immundefizienzvirus (HIV) zu isolieren. AIDS hat sich in Teilen Afrikas, Indiens und Südostasiens zu einer Pandemie entwickelt. Heute sind nach Schätzungen der WHO 42 Millionen Menschen HIV-1 infiziert (UNAIDS/WHO, 2002).

2.1. Der Aufbau von HIV-1

HIV-1 und das eng verwandte HIV-2 gehören zu den Lentiviren, einer Unterfamilie der Retroviren. HIV-1-Viruspartikel sind im Durchmesser ca. 100 nm groß und enthalten im Innern das Kapsid mit p24-Antigenen, in dem sich zwei Kopien einer 9 kb großen einzelsträngigen RNA befinden, die als Komplex mit den p7-Nukleokapsidproteinen vorliegen (Abb. 1). Im Kapsid befinden sich zudem weitere Enzyme wie z.B. die reverse Transkriptase, Protease und Integrase, die HIV-1 für seine Vermehrung benötigt. Das Kapsid ist über das p6-Linkprotein mit der äußeren Hülle, die von einer Lipidmembran gebildet wird, verbunden. In diese Hülle ist das Protein gp41 integriert. An der viralen Oberfläche bindet das Protein gp120 an gp41.

Für die Replikation benötigt das Virus im wesentlichen drei Gene: *gag*, *pol* und *env*. Die *gag* und *env* Gene kodieren das Nukleokapsid und die Glykoproteine der Virushülle, das *pol* Gen kodiert für die Enzyme. Das Virus enthält zusätzlich noch akzessorische Gene, wie z.B. Negativfaktor (*Nef*) und *viral protein rapid* (*Vpr*), die aber für die Virusreplikation nicht unbedingt erforderlich sind. Der Transaktivator der Transkription (*Tat*) und *regulator of expression of virion* (*Rev*) sind hingegen regulatorische Proteine, die die Transkription von HIV-DNA in RNA, deren Elongation und den Transport vom Zellkern ins Zytoplasma fördern.

Bei der Infektion von T-Zellen und Monozyten/Makrophagen bilden gp120 und gp41 mit dem CD4-Rezeptor einen Komplex auf der Zelloberfläche. Nachfolgend fusioniert die Virushülle mit der Plasmamembran. Beide Vorgänge sind von der Wechselwirkung von Korezeptoren auf der Membran der Wirtszelle mit gp120 abhängig. Makrophagentrope-HIV-1-Stämme benötigen die Chemokinrezeptoren (CCR) CCR-5 und CCR-3 (Ghorpade et al., 1998) als Korezeptoren für die

Infektion von Monozyten/Makrophagen. Lymphtrope-HIV-1-Stämme infizieren Lymphozyten über CXC-Chemokin-Rezeptor-4 (CXCR-4) als Korezeptor (Feng et al., 1996).

Nach der Membranfusion entleeren sich das Kapsid und die Matrixproteine in das Zytoplasma. Die anschließende reverse Transkription von viraler RNA in provirale DNA im Zytoplasma der Wirts-Zelle geschieht durch das Enzym reverse Transkriptase. Nach dem Transport der proviralen DNA und den daran gebundenen viralen Proteinen als sogenannter Prä-Integrationskomplex in den Zellkern erfolgt durch die virale Integrase der Einbau in das zelluläre Genom, was die Voraussetzung für die Synthese neuer Virionen ist. Die Bildung neuer Viruspartikel erfolgt zunächst an der Innenseite der Zellmembran. Nach Fertigstellung des Kapsids kommt es zum Austritt aus der Zelle, wobei die Zellmembran der Wirtszelle die äussere Hülle von HIV-1 bildet.

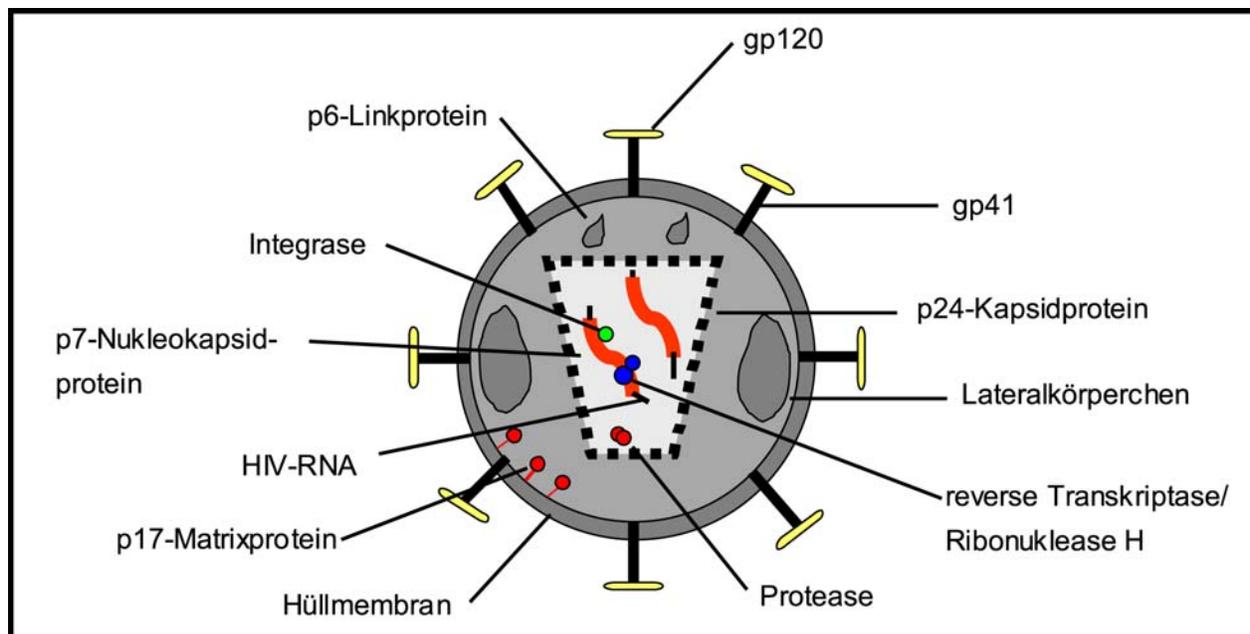


Abbildung 1: Aufbau des humanen Immunschwächevirus Typ-1. Im Inneren des Viruspartikels befinden sich zwei Kopien der HIV-1-RNA, die im Komplex mit den p7-Nukleokapsidproteinen vorliegen, sowie Enzyme wie z.B. die reverse Transkriptase, Protease und Integrase. Die Enzyme und die RNA sind von einer Kapsidhülle bestehend aus p24-Kapsidproteinen umgeben. Das Kapsid ist über das p6-Linkprotein mit der Hüllmembran verbunden, deren Innenseite mit einer Schicht p17-Membranproteinen ausgekleidet ist. In die

Hüllmembran ist das transmembrane Glykoprotein gp41 eingebettet, welches mit dem externen Glykoprotein gp120 verbunden ist.

2.2. Endothelzellschädigungen bei HIV-1-infizierten Patienten

Bei der AIDS-assoziierten Vaskulopathie handelt es sich um eine systemische Störung des Endothelverbandes (Calabrese et al., 1989), die sich in unterschiedlichen klinischen Erscheinungsformen manifestieren kann. Dabei handelt es sich um systemische Endothelschädigungen, die sich besonders auffällig am Endothel der Aorta mit zahlreichen adhärennten mononukleären Zellen (Zietz et al., 1996) äußern. Auch im Zentralnervensystem (ZNS) wurden Veränderungen auf Grund einer Fehlfunktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS) beobachtet (Petito and Cash, 1992). Der offensichtlichste klinische Marker in der AIDS-assoziierten Vaskulopathie ist das Kaposi-Sarkom (KS), ein angio-proliferativer Tumor mit zahlreichen infiltrierten Monozyten und T-Zellen (Übersichtsartikel (Stürzl et al., 2001)). Aber auch die Mikrovaskulatur des Augenhintergrunds (Geier et al., 1993; Holland et al., 1983), der Niere (Rao et al., 1984) und des Nagelfalz' (Xiu et al., 1991) ist bei HIV-1-Infizierten deutlich verändert.

Durch die Behandlung von HIV-1-infizierten Patienten mit der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) konnte deren Lebenserwartung deutlich erhöht werden (Medrano et al., 1998; Passalaris et al., 2000; Powderly, 2002), dies ist jedoch mit Nebenwirkungen wie Dyslipidämie und Diabetes verbunden. Daneben stieg bei den infizierten Patienten die Häufigkeit von Gefäßerkrankungen. So stieg zum Beispiel die Zahl der an kardiovaskulären Erkrankungen verstorbenen AIDS-Patienten auf 10% (Bonnet et al., 2002), und bei 75% der an Dyslipidämie erkrankten AIDS-Patienten tritt Atherosklerose (Acevedo et al., 2002) und eine erhöhte Rate an pulmonaler Hypertension (Pellicelli et al., 2001) auf.

Wahrscheinlich sind die kardiovaskulären Manifestationen während einer HIV-1-Infektion auf das Virus zurückzuführen (Neumann et al., 2002). Opportunistische Erkrankungen bei auftretender Immunschwäche, aber auch HAART durch seine Nebenwirkungen, können verstärkend dazu beitragen (Neumann et al., 2002; Passalaris et al., 2000).

Allen diesen Erscheinungsformen der AIDS-assoziierten Vaskulopathie ist gemeinsam:

- (1) Veränderungen der Endothelzellschicht, die sich in einer verstärkten Gefäßpermeabilität äußert, was im Falle des KS zur begleitenden Ödembildung führt (Ziegler, 1993).

- (2) Eine erhöhte Proliferationsaktivität der Endothelzellen. Dies kann entweder eine Regenerationsreaktion für Bereiche darstellen, in denen die Endothelzellen abgestorben sind, oder im Falle des KS zu tumorigenem Wachstum führen (Ensoli et al., 2001; Zietz et al., 1996).
- (3) Eine erhöhte Adhäsionskompetenz des Endothels für mononukleäre Zellen, was aufgrund von sezernierten Faktoren durch mononukleäre Zellen zu Endothelzellschädigungen führt (Lafrenie et al., 1997; Zietz et al., 1996) und für eine mögliche Ausbreitung der HIV-1-Infektion ins ZNS und von HHV-8 in die KS-Läsionen ausschlaggebend sein könnte (Hurwitz et al., 1994; Perry et al., 1994).
- (4) Die Gefäßschädigungen sind auf eine chronische Aktivierung des Endothels zurückzuführen.

In den folgenden Abschnitten werden die wichtigsten pathologischen Erscheinungsbilder der AIDS-assoziierten Vaskulopathie vorgestellt. Es handelt sich dabei um Schädigungen der Aorten, der Blut-Hirn-Schranke, sowie das Kaposi-Sarkom.

2.2.1. Pathomorphologische Veränderungen des Aortenendothels bei HIV-1-infizierten Personen

Am Aortenendothel von HIV-1-infizierten Patienten wurde eine chronische Aktivierung und massive Zerstörung des Endothels nachgewiesen (Zietz et al., 1996). Während das Aortenendothel einer nicht infizierten Person eine regelmäßige, kopfsteinpflasterartig angeordnete Struktur mit isomorphen Zellkernen aufwies ((Zietz et al., 1996), (Abb. 2, A)), wurden im Endothel HIV-1-infizierter Patienten große Löcher in der Endothelschicht beobachtet, und die vorhandenen Endothelzellen wiesen polymorphe, teils ballonisierte, teils pyknotisch verdichtete Zellkerne auf oder waren teilweise polynukleär ((Zietz et al., 1996), (Abb. 2, B)). In Bereichen, in denen das Endothel noch intakt war, wurde eine erhöhte Adhäsion von mononukleären Zellen an das Aortenendothel beobachtet, die an Hand zelltypischer Marker in der Mehrzahl als Monozyten/Makrophagen identifiziert wurden ((Zietz et al., 1996), (Abb. 2 C)). Die erhöhte Adhäsion stand in Verbindung mit einer erhöhten Expression der Adhäsionsmoleküle *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *endothelial leukocyte adhesion molecule-1* (ELAM-1) und des Gewebeantigens *human leukocyte antigen* (HLA)-DR auf den Endothelzellen (Zietz et al., 1996). Die verstärkte Expression dieser durch inflammatorischer Zytokin (IZ)-aktivierten Gene wies darauf hin, dass das Endothel dieses Patienten erhöhten Konzentrationen an IZ ausgesetzt war.



Abbildung 2: Histologische Charakterisierung des Aortenendothels und Nachweis adhärerender mononukleärer Zellen am Endothel HIV-1-infizierter Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen anhand von Häutchenpräparaten. Im Vergleich zum Endothel nicht-infizierter Personen (**A**) weist das Endothel HIV-1-infizierter Patienten (**B**, **C**) deutliche histologische Unterschiede auf. **A:** Die Struktur des Aortenendothels der Kontrollpersonen ist regelmäßig. Die Endothelzellen sind kopfsteinpflasterartig angeordnet mit isomorphen Zellkernen. **B:** Die regelmäßige Struktur des Endothelverbandes ist bei HIV-1-infizierten Patienten deutlich gestört. Auch mehrkernige Zellen werden gefunden. Dazwischen befinden sich weitgehend zellfreie Bereiche (schwarze Pfeile). **C:** In den Bereichen des Aortenendothels HIV-1-infizierter Patienten, in denen die morphologische Struktur noch weitgehend erhalten ist, lassen sich große Mengen adhärerender mononukleärer Zellen nachweisen. Giemsa-Färbung; **A:** x 120, **B:** x 180, **C:** x 180 nach (Zietz et al., 1996).

2.2.2. Die Endothelzellschädigungen der Blut-Hirn-Schranke bei HIV-1-infizierten Patienten

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) besteht aus Kapillarendothel, das von Astrozyten umgeben ist und erfüllt eine wichtige Schutzfunktion des ZNS. Im Gegensatz zum übrigen Endothel wird die Barrierefunktion der BHS aber wesentlich von den Astrozyten bestimmt. Das intakte Endothel kontrolliert jedoch die Permeabilität der Kapillaren des ZNS für Makromoleküle wie z. B. Immunglobuline (Cunha-Vaz et al., 1966; Lum and Malik, 1994; Shakib and Cunha-Vaz, 1966). Bei 50% aller AIDS-Patienten hingegen treten auf Grund einer verminderten Barrierefunktion des Endothels vermehrt Immunglobuline und Fibrinogen im Gehirn auf (Petito and Cash, 1992; Rhodes, 1991).

Autopsieuntersuchungen haben gezeigt, dass bis zu 75% der mit AIDS infizierten Patienten eine Schädigung des ZNS aufweisen (Gray et al., 1988; Simpson and Berger, 1996). Diese

Schädigungen können mit einer fortschreitenden Demenz und mit schweren sensorischen und motorischen Fehlfunktionen einhergehen. Histologisch äußert sich die AIDS-assoziierte Demenz in einer großen Anzahl infiltrierter HIV-1-infizierter Monozyten/Makrophagen im ZNS, in Entzündungen und Demyelinierung der weißen und grauen Substanz, dem Verlust neuronaler Zellen und Aktivierung von Astrozyten (Nottet and Gendelman, 1995a; Nuovo and Alfieri, 1996; Petito, 1988; Petito and Cash, 1992; Price et al., 1988). In der akuten Phase der Infektion korrelierte das Auftreten AIDS-assoziiierter neurologischer Erkrankungen mit einem Anstieg an HIV-1-Antigenen und HIV-1-RNA im Gehirn und in der Zerebrospinalflüssigkeit (ZSF) (Davis et al., 1992; Goudsmit et al., 1986). Der Eintritt von HIV-1 in das ZNS erfolgt vermutlich über HIV-1-infizierte Monozyten/Makrophagen (Hurwitz et al., 1994; Perry et al., 1994).

2.2.3. Das Kaposi-Sarkom und seine Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Eine wichtige, klinisch bedeutende Ausprägung der AIDS-assoziierten Vaskulopathie ist das Kaposi-Sarkom (KS) (Abb. 3). Es ist der am häufigsten auftretende Tumor bei AIDS-Patienten.



Abbildung 3: KS bei einem AIDS-Patienten. Das KS tritt in Form rötlicher Tumoren, voenehmlich am Rumpf und an den Extremitäten der Patienten auf.

Das KS lässt sich in vier klinisch-epidemiologische Varianten einteilen. Die klassische Form des KS (CKS) ist wenig aggressiv und tritt überwiegend im Mittelmeerraum bei älteren Männern auf. Das Afrikanische KS (AKS) ist in weiten Teilen Afrikas verbreitet und macht bis zu 10% der dort

auftretenden Tumore aus (Slavin et al., 1969). Das iatrogene KS tritt bei Transplantationspatienten auf, die sich einer immunsuppressiven Behandlung mit Zyklosporinen und Kortikosteroiden unterziehen (Penn, 1979). Das AIDS-assoziierte KS ist der am häufigsten auftretende Tumor bei HIV-1-infizierten Patienten und ist gleichzeitig die aggressivste Form des KS (Haverkos and Drotman, 1985). Das Risiko von AIDS-Patienten, an KS zu erkranken ist 20.000 mal höher (34% - 49% der HIV-1-Infizierten) (Hengge et al., 2002) als bei nicht infizierten Personen und bis zu 300 mal höher als bei anderen immunsupprimierten Personen (Strelow et al., 1998). Dennoch stellt KS nur in seltenen Fällen die Todesursache von AIDS-Patienten dar (Chachoua et al., 1989; Haverkos and Drotman, 1985).

Das KS lässt sich in drei Stadien einteilen. Am Anfang steht das *Patch-* (Fleck-) Stadium. Dieses Stadium ist histologisch durch unregelmäßige, dilatierte Gefäße und infiltrierte T-Zellen und Monozyten gekennzeichnet (Ackerman, 1979). Im folgenden Stadium, dem *Plaque-* (Linsen-) Stadium, sind die KS-Läsionen durch spindelförmige Zellen charakterisiert, die als die eigentlichen Tumorzellen des KS betrachtet werden. Neben einer starken Vaskularisierung können auch in diesem Stadium Infiltrate aus Lymphozyten und Monozyten beobachtet werden (Roth et al., 1992). Das späteste Stadium des KS ist das noduläre- (knotige) Stadium. Es ist durch KS-Spindelzellen charakterisiert. Die Spindelzellen sind in charakteristischen, bündelförmigen Straßen organisiert, in deren Zwischenräumen zahlreiche Erythrozyten vorhanden sind. Die Gefäße im KS enthalten keine Perizyten mehr und haben eine fragmentierte Basallamina (McNutt et al., 1983).

Die meisten Spindelzellen bei KS-Läsionen exprimieren Endothelzellmarker, wie zum Beispiel CD31 und CD34 (Stürzl et al., 2001). Andererseits konnten aber auch Marker für glatte Muskelzellen (*smooth muscle alpha-actin*) (Weich et al., 1991), Makrophagen (CD68) (Fiorelli et al., 1998) und dendritischen Zellen (Faktor XIIIa) (Huang et al., 1993) nachgewiesen werden. Die Heterogenität der Spindelzellen weist auf die Möglichkeit hin, dass sich das KS aus unterschiedlichen Zellen im Rahmen eines reaktiven Prozesses entwickelt hat (Bussolino et al., 2001; Stürzl et al., 1992).

Das humane Herpesvirus-8 (HHV-8) wird als ätiologisches Agens des KS betrachtet. Alle bisher untersuchten KS-Patienten sind mit HHV-8 infiziert, und die geographische Verbreitung von HHV-8 korreliert mit der relativen Häufigkeit von KS in der Bevölkerung (Übersichtsartikel (Stürzl et al., 2001)). Epidemiologische Studien zeigten jedoch, dass in einigen geographischen Regionen HHV-8 bei bis zu 50% der Normalbevölkerung nachweisbar ist (Lennette et al., 1996;

Monini et al., 1996). Weit weniger Personen entwickeln jedoch KS, was darauf hinweist, dass HHV-8 einen notwendigen Kofaktor darstellt, aber keinen hinreichenden. HIV-1-RNA-Transkripte werden hingegen nur selten in KS-Läsionen nachgewiesen (Mahoney et al., 1991). Daher scheinen HIV-1-Partikel selbst nicht das KS auszulösen. Das bis zu 20.000-fach erhöhte Risiko von HIV-1-Infizierten an KS zu erkranken, unterstützt jedoch die wichtige Rolle von HIV-1 im Rahmen der KS-Entstehung.

2.3. Die Rolle von inflammatorischen Zytokinen in der AIDS-assoziierten Vaskulopathie

Die in Kapitel 2.2. aufgeführten pathologischen Veränderungen der Endothelzellen in der AIDS-assoziierten Vaskulopathie weisen auf eine Wirkung von HIV-1 auf das Gefäßsystem hin. Ein direkter Einfluß der HIV-1-Replikation kann ausgeschlossen werden, da eine produktive Infektion von Endothelzellen nur selten nachgewiesen werden konnte (Schmitt-Graff et al., 1990). Ein indirekter Einfluß könnte durch erhöhte Konzentrationen zirkulierender Antigene und Immunkomplexe (Krapf et al., 1990), ein verändertes Zytokinmilieu (Caruso et al., 1990; Lepezuniga et al., 1987) und das HIV-1-Tat-Protein (Hofman et al., 1994; Sinicco et al., 1993) ausgeübt werden.

Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Boten-Proteinen, die von Zellen abgegeben werden und sowohl parakrin als auch autokrin wirken können. Zytokine wirken im Allgemeinen über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zielzelle und steuern häufig die Expression von Genen, die an der Regulierung der Zell-Proliferation oder Differenzierung beteiligt sind. Wichtige Zytokinproduzenten im Organismus sind aktivierte CD4⁺-Zellen und Monozyten/Makrophagen, die eine große Anzahl verschiedener Zytokine freisetzen. Unter diesen sind Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumor Nekrosis Faktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ) und IL-6 die wichtigsten inflammatorischen Zytokine (IZ), die sowohl die lokale als auch die systemische Immunantwort steuern (Breen, 2002).

Eine direkte Verbindung zwischen IZ und der HIV-1-Infektion wurde erstmals gezeigt, als Monozyten mit HIV-1-Partikeln kultiviert wurden, was zu einer erhöhten Produktion von IZ (IL-1 β , IL-6 und TNF- α) führte, ohne dass die Zellen infiziert worden wären (Merrill et al., 1989; Nakajima et al., 1989). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Bindung des Virus' an Zelloberflächenrezeptoren ausreicht, um die Produktion von IZ zu induzieren. IL-1 β , IL-6 und vor allem TNF- α erhöhen die HIV-1-Replikation in infizierten Zellen (Fauci, 1996; Poli, 1999). Das

lässt darauf schließen, dass die erhöhte Synthese dieser IZ in Monozyten und T-Zellen direkt zur Entwicklung von AIDS beitragen kann.

Es konnte gezeigt werden, dass in der akuten Phase der Infektion mit HIV-1 IL-1 β und IFN- γ in erhöhten Serumkonzentrationen auftreten (Rinaldo et al., 1990; Sinicco et al., 1993; Ullum et al., 1997), wohingegen erhöhte Serumkonzentration von TNF- α mit dem Fortschreiten der Krankheit einhergehen (Kobayashi et al., 1990; Lahdevirta et al., 1988; Medrano et al., 1998). Auch im Serum und in Zellkulturüberständen von Zellen HIV-1-positiver Patienten, wurden erhöhte Konzentrationen an IL-1 β , IL-6, IFN- γ und TNF- α gemessen (Breen et al., 1990; Fauci, 1996; Kobayashi et al., 1990; Roux-Lombard et al., 1989; Ullum et al., 1997). Die drei wichtigsten IZ für die AIDS-assoziierte Vaskulopathie werden im folgenden dargestellt.

IL-1 β besteht aus einer Polypeptidkette mit einer Größe von 33 kDa. Es wird von aktivierten T-Zellen und Monozyten/Makrophagen produziert und ist ein pleiotroper Botenstoff bei inflammatorischen Prozessen. IL-1 β hemmt die Proliferation von Endothelzellen *in vivo* und erhöht die Permeabilität des Endothelzellverbandes *in vitro* (Guenzi et al., 2001; Pober and Cotran, 1990). Zudem konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen, die mit IL-1 β stimuliert wurden, vermehrt Matrixmetalloproteasen (MMP)-1, -2, -3 und -9 exprimierten (Hanemaaijer et al., 1993). Insbesondere aber erhöhte IL-1 β die Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1 und ELAM-1) in Endothelzellen und KS-Zellen (Pober and Cotran, 1990; Regezi et al., 1993).

IFN- γ ist ein von aktivierten Lymphozyten exprimiertes 20-25 kDa großes Protein. IFN- γ hemmte ebenfalls die Proliferation von Endothelzellen und erhöhte die Expression von MHC I- und II-Antigenen auf Endothelzellen (Hughes et al., 1990). Wie IL-1 β induzierte es auf Endothelzellen die Expression von ICAM-1 und zusätzlich auf Lymphozyten die Expression von LFA-1 (Berman et al., 1990).

TNF- α ist ein 25 kDa großes Peptid, dass ebenfalls von aktivierten T-Zellen sowie Monozyten/Makrophagen exprimiert wird. TNF- α induzierte die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ELAM-1, ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen und KS-Zellen (Haraldsen et al., 1996; Kalogeris et al., 1999; Pober and Cotran, 1991; Regezi et al., 1993) und auf Monozyten stimulierte es die Expression von β_2 -Integrinen (Lafrenie et al., 1996a). Zudem

konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen, die mit TNF- α stimuliert wurden, vermehrt Matrixmetalloproteasen (MMP-1, -2, -3 und -9) exprimierten (Hanemaaijer et al., 1993).

Besonders aufgrund ihres Einflusses auf die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen und Monozyten könnten IZ eine wichtige Rolle bei der verstärkten Adhäsion von Leukozyten an das Endothel HIV-1-infizierter spielen. Da erhöhte Serumkonzentration von TNF- α mit der AIDS-Progression einhergehen (Kobayashi et al., 1990; Lahdevirta et al., 1988), wurde vor allem die Rolle dieses Zytokins in dieser Arbeit untersucht.

2.4. Die Rolle von angiogenen Wachstumsfaktoren in der AIDS-assoziierten Vaskulopathie

Bei der Angiogenese kommt es zur Ausbildung neuer Blutgefäße durch Aussprossung aus der bereits bestehenden Vaskulatur. Dieser Vorgang ist charakterisiert durch Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen (Jih et al., 2001) und ist ein wichtiger Bestandteil normaler physiologischer Prozesse, wie Wundheilung und embryonaler Gefäßentwicklung (Lingen, 2001). *Basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *vascular endothelial cell growth factor-A* (VEGF-A) sind die beiden wichtigsten Angiogenesefaktoren (Ferrara and Henzel, 1989; Shing et al., 1984).

Im Serum von HIV-1-infizierten Patienten wurden erhöhte Konzentrationen von bFGF nachgewiesen und *in vitro* wurde gezeigt, dass infizierte T-Zellen in erhöhtem Maße VEGF-A produzieren (Ascherl et al., 1999; Ascherl et al., 2001).

bFGF, auch als FGF-2 bezeichnet, gehört zur Gruppe der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren (Gospodarowicz et al., 1989; Shing et al., 1984). bFGF stimuliert die Proliferation vieler Zellarten, insbesondere die von vaskulären Endothelzellen und Fibroblasten (Gospodarowicz, 1990; Montesano et al., 1986; Schweigerer et al., 1987) und aktiviert zudem die Migration von Endothelzellen (Gospodarowicz, 1991; Montesano et al., 1986; Presta et al., 1986). Auf Kollagengelen induzierte bFGF die Ausbildung von Kapillaren und in Matrigelimplantaten in der Maus die Sprossung von Gefäßen (Cornali et al., 1996; Gospodarowicz, 1984; Montesano et al., 1986).

VEGF-A ist ein wichtiger Angiogenesefaktor im Rahmen physiologischer Prozesse, wie zum Beispiel bei der Vaskularisierung des *Corpus luteum*, der embryonalen Gefäßentwicklung und

der Wundheilung (Brown et al., 1997). VEGF-A erhöht die Permeabilität des mikrovaskulären Endothels und induziert zugleich die Migration von Endothelzellen und Monozyten (Barleon et al., 1996; Esser et al., 1998; Nicosia et al., 1994; Pepper et al., 1992). Darüber hinaus induziert VEGF-A die Gefäßsprossung in der Hornhaut des Kaninchens (Phillips et al., 1994).

Die biologische Aktivität von VEGF-A wird über die Bindung an je zwei Rezeptoren, dem VEGFR-1/Flt-1 und dem VEGFR-2/Flk-1 vermittelt, wobei Neuropilin-1, -2 und Heparansulfat-Proteoglykane als Korezeptoren dienen (de Vries et al., 1992; Neufeld et al., 1999; Poltorak et al., 2000; Terman et al., 1992). Das humane VEGF-A-Gen besteht aus acht Exons. Durch alternatives RNA-Splicing entstehen fünf verschiedene VEGF-Moleküle (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) (Houck et al., 1991). VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ werden mengenmäßig am stärksten in den Zellen exprimiert und sind die häufigsten Isoformen. Alle VEGF-A-Varianten außer VEGF₁₂₁ binden an Heparansulfat-Proteoglykane an der Zelloberfläche (Cohen et al., 1995).

Den angiogenen Wachstumsfaktoren wird auch in der KS-Entwicklung eine wichtige Rolle zugeschrieben. Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, daß die ausgeprägte Mikrovaskularisierung der KS-Läsionen, ähnlich wie bei der Tumor-assoziierten Angiogenese, durch angiogene Faktoren, die von den KS-Spindelzellen produziert werden, induziert wird. AIDS-KS-Spindelzellen synthetisieren *in vitro* große Mengen bFGF und VEGF-A (Cornali et al., 1996; Samaniego et al., 1998). Die synergistische Wirkung von bFGF und VEGF-A bei der Angiogenese *in vivo* wurde im Maus-Modell bestätigt (Cornali et al., 1996).

2.5. Das HIV-1-Tat-Protein

In diesem Kapitel wird der HIV-1-kodierte Faktor Tat beschrieben. HIV-1-Tat übt auf Endothelzellen und Monozyten vielfältige Wirkungen aus und könnte aus diesem Grunde eine wichtige Rolle in der AIDS-assoziierten Vaskulopathie spielen.

2.5.1. Der Aufbau von HIV-1-Tat

HIV-1-Tat ist ein kleines nukleäres Protein von 14-16 kDa, mit stark konservierten Domänen, das bei allen Lentiviren der Primaten auftritt (Jeang et al., 1991). Die Primärstruktur von HIV-1-Tat wird in folgende Regionen eingeteilt (Abb. 4):

- 1) Die N-terminale Region von Aminosäure (As) 1 - 22.
- 2) Eine Cystein-reiche Region (As 23 - 38).
- 3) Eine *core*-Region (As 39 – 49) mit hydrophoben Aminosäuren, über die unter anderem die DNA-Bindung erfolgt (Karn, 1999).
- 4) Eine basische Region (As 50 - 60), die sechs Arginine und zwei Lysine enthält, welche für die Bindung an die RNA und für die nukleäre Lokalisation des Proteins nötig ist (Rana and Jeang, 1999).
- 5) Eine Glutamin-reiche Region (As 61 - 72), die noch vom ersten Exon kodiert wird und die ebenfalls an der DNA-Bindung beteiligt ist (Karn, 1999).
- 6) Der vom zweiten Exon kodierte Bereich (As 73 – 101), welcher die Aminosäureabfolge Arginin-Glycin-Asparaginsäure enthält (RGD-Motiv) und an der Transaktivierung beteiligt ist (Verhoef et al., 1998). Über das RGD-Motiv bindet HIV-1-Tat an die Integrinrezeptoren VLA-5 und $\alpha_v\beta_3$ (Barillari et al., 1999) und an Proteine der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin und Vitronectin, (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987; Yamada et al., 1984).

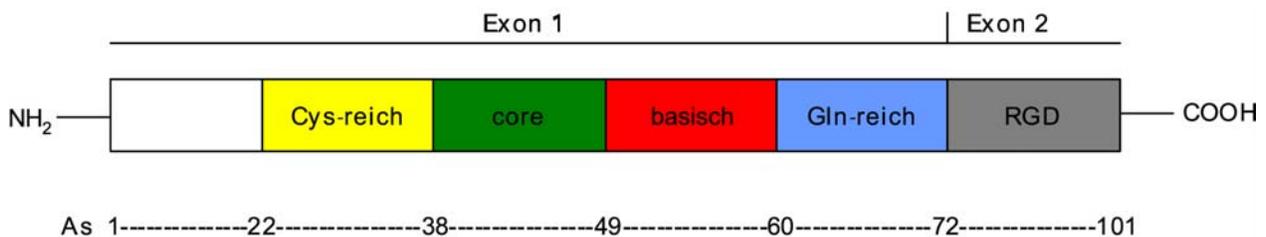


Abbildung 4: Aufbau des HIV-1-Tat-Proteins. N-terminal liegen die vom ersten Exon kodierten Regionen: eine Cystein-reiche Region (As 22 - 38), gefolgt von einer *core*-Region (AS 39-49) über die unter anderem die DNA-Bindung stattfindet, einer basischen Region (As 50 - 60), die für die Bindung an die RNA und nukleären Lokalisation verantwortlich ist und einer Glutamin-reichen Region (As 61 - 72), die ebenfalls an der DNA-Bindung beteiligt ist. Daran schließt sich die vom zweiten Exon kodierte Region an, die ein RGD-Motiv enthält (AS 72 - 101) über das es an Integrinrezeptoren und Proteine der extrazellulären Matrix binden kann.

Die HIV-1-Transkription wird durch den Transaktivator der Transkription HIV-1-Tat kontrolliert. HIV-1-Tat ist das erste Beispiel für einen Faktor, der die virale Genexpression durch Kontrolle der Elongation durch die RNA-Polymerase II reguliert (Karn, 1999). Dabei bindet HIV-1-Tat an einen spezifischen Bereich auf der RNA, das *transactivation responsive element* (TAR-Element), welche sich am 5'-Ende im *long-terminal-repeat* (LTR) aller HIV-1-Transkripte befindet (Berkhout and Jeang, 1989) und einen Promotor der RNA-Polymerase II darstellt. Bei diesem Prozess dienen *histone acetyltransferasen* (HATs), wie z.B. CREB-binding protein (CBP)/p300 und p300/CBP-associating factor (CAF), die an HIV-1-Tat binden, als Koaktivatoren (Deng et al., 2000; Kiernan et al., 1999). HIV-1-Tat spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Transkription des viralen Genoms und der Erhöhung der Viruslast (Karn, 1999).

2.5.2. Die Rolle von HIV-1-Tat in der AIDS-assoziierten Vaskulopathie

HIV-1-Tat wird während der akuten Phase der Infektion mit HIV-1 von infizierten T-Zellen sezerniert (Chang et al., 1997; Ensoli et al., 1990; Ensoli et al., 1993). Sezerniertes HIV-1-Tat kann sowohl von infizierten als auch von nicht infizierten Zellen aufgenommen werden (Hofman et al., 1993; Tyagi et al., 2001). Darüber hinaus kann im Serum HIV-1-infizierter Patienten HIV-1-Tat in Konzentrationen von 1 ng/ml - 40 ng/ml nachgewiesen werden (Westendorp et al., 1995; Xiao et al., 2000). Im Zusammenhang mit der AIDS-assoziierten Vaskulopathie ist sowohl die Bindung von HIV-1-Tat an zelluläre Rezeptoren (2.5.3.) als auch die Beeinflussung der Transkription zellulärer Gene (2.5.4.) von Bedeutung.

2.5.3. HIV-1-Tat-Effekte durch Bindung an Oberflächen-Rezeptoren

HIV-1-Tat bindet über das RGD-Motiv an Integrine (VLA-5 und $\alpha_v\beta_3$) sowie Flk-1/VEGFR-2 (Barillari et al., 1999; Mitola et al., 2000) und über die basische Region an Heparansulfat-Proteoglykane (Chang et al., 1997). Auf diese Weise induziert es die Proliferation, Migration und Invasion von KS-Zellen und aktivierten Endothelzellen (Albini et al., 1995; Albini et al., 1996; Barillari et al., 1992; Barillari et al., 1999; Ensoli et al., 1990; Ensoli et al., 1994a; Mitola et al., 2000). Darüber hinaus induziert HIV-1-Tat die Adhäsion aber auch die Migration von Monozyten über die *core*- und die basische Region (Albini et al., 1998; Benelli et al., 2000; Lafrenie et al., 1996; Lafrenie et al., 1996a; Mitola et al., 2000). Der Effekt von HIV-1-Tat auf die Migration von Monozyten wird durch Bindung von HIV-1-Tat an Flt-1/VEGFR-1 vermittelt (Mitola et al., 1997).

2.5.4. HIV-1-Tat-Effekte durch Transaktivierung

HIV-1-Tat stimuliert in Endothelzellen die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1) (Dhawan et al., 1997). In Monozyten induziert HIV-1-Tat die Expression von IZ, was nachfolgend zu einer verstärkten Expression von β_2 -Integrinen führt (Lafrenie et al., 1996a; Lafrenie et al., 1997). Letzteres führt *in vitro* zu einer erhöhten Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen durch HIV-1-Tat (Lafrenie et al., 1996). Zusätzlich induziert HIV-1-Tat die Sekretion von proteolytischen Enzymen (Albini et al., 1995; Barillari et al., 1992; Dhawan et al., 1992; Fiorelli et al., 1995), wie die Matrixmetalloproteasen (MMP), in Endothelzellen. MMP spielen bei der Invasion von Zellen eine entscheidende Rolle. Es ist gezeigt worden, dass sowohl die Expression von MMP-9 in Monozyten (Lafrenie et al., 1996a) als auch die Expression von MMP-1 in Endothelzellen (Albini et al., 1995; Ensoli et al., 1994a) nach Inkubation mit HIV-1-Tat verstärkt ist. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass die schädigende Wirkung von HIV-1-Tat auf Endothelzellen unter anderem durch IZ und MMP vermittelt wird (Lafrenie et al., 1996a). So führte eine Kokultivierung von HIV-1-Tat-stimulierten Monozyten mit Endothelzellen zu einer veränderten Morphologie der Endothelzellen und zu einem unregelmäßig ausgebildeten Endothelzellverband (Lafrenie et al., 1996a). Neben zellfreien Bereichen (Abb. 5, A) waren unter anderem Bereiche zu erkennen, bei denen die morphologische Struktur der Endothelzellen erhalten war. In diesen Bereichen war eine große Anzahl an adhärierenden Monozyten zu beobachten (Abb. 5, B). Diese Veränderungen stehen im Einklang zu den Veränderungen des Aortenendothels von HIV-1-infizierten Patienten (Abb. 2). Diese Beobachtungen weisen auf eine wichtige Rolle von HIV-1-Tat und von HIV-1-Tat-induzierten zellulären Faktoren in der AIDS-assoziierten Vaskulopathie hin.

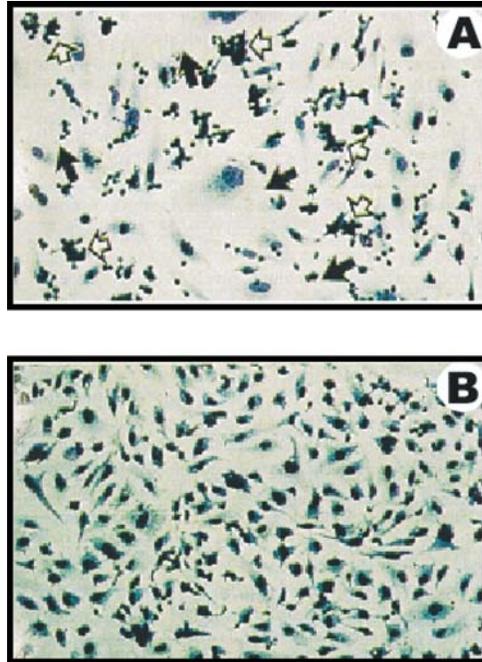


Abbildung 5: Wirkung HIV-1-Tat-stimulierter, adhärerender Monozyten auf Endothelzellen *in vitro*. 24 h mit HIV-1-Tat-stimulierte (A) oder nicht-stimulierte (B) Monozyten werden mit Endothelzellen über 18 h kokultiviert. Die HIV-1-Tat Stimulation bewirkt eine deutliche Veränderung der Morphologie der Endothelzellen und eine starke Zerstörung der regelmäßigen Struktur des Endothelzellverbandes mit zellfreien Bereichen (schwarze Pfeile, A). In Bereichen, in denen die morphologische Struktur der Endothelzellen noch erhalten ist, sind adhärende Monozyten zu erkennen (weiße Pfeile, A). (nach (Lafrenie et al., 1996a)).

2.5.5. Die angiogenen Eigenschaften von HIV-1-Tat

HIV-1-Tat besitzt angiogene Wirkungen. Es kann in Matrigelimplantaten bei der Maus Angiogenese induzieren und bei Mäusen wurde gezeigt, dass HIV-1-Tat die Ausbildung von KS-ähnlichen Läsionen induzierte (Albini et al., 1994; Ensoli et al., 1994a). Darüber hinaus kann es die Proliferation und Migration von Endothelzellen induzieren (Albini et al., 1996; Barillari et al., 1999a). Ein wichtiges Wirkungsprinzip ist hierbei, dass HIV-1-Tat Moleküle der extrazellulären Matrix stimulieren und dadurch bFGF aus der EZM freisetzen kann (Barillari et al., 1999a). Zusätzlich bindet HIV-1-Tat wie VEGF-A unter Beteiligung von Heparansulfat-Proteoglykanen an Flk-1/VEGFR-2 und übt so eine angiogene Wirkung auf Endothelzellen aus (Albini et al., 1996;

Chang et al., 1997). Damit stellt HIV-1-Tat einen wichtigen Faktor im Rahmen der AIDS-assoziierten Vaskulopathie dar.

2.6. Molekulare Mechanismen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die bei AIDS-Patienten verstärkte Adhäsion von mononukleären Zellen an das Endothel stellt einen wichtigen Forschungsgegenstand dieser Arbeit dar. Die Leukozyten-Transmigrations-Kaskade lässt sich in Annäherung, Rollen, Adhäsion und Transmigration unterteilen (Abb. 6). Die Annäherung der Leukozyten an das Endothel wird durch Chemokine mit chemotaktischer Wirkung wie zum Beispiel *stromal-derived factor-1 α* (SDF-1 α), *interferon- α inducible protein-10* (IP-10), *macrophage inflammatory protein -1 α* (MIP-1 α), IL-8 und MCP-1 induziert (Übersichtsartikel (McDermott and Murphy, 2000)). Bei der anschließenden Leukozyten-Endothelzell-Wechselwirkung sind mehrere Adhäsionsmoleküle beteiligt. Erste Leukozyten-Endothelzell-Wechselwirkungen finden über P-Selektin auf Seite der Endothelzellen und P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) auf Seite der Leukozyten statt. Beim Rollvorgang sind zusätzlich auf Seite der Endothelzellen auch L-Selektin und E-Selektin beteiligt. Die Liganden auf Seite der Leukozyten sind CD34 und E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1). Auch die von Endothelzellen exprimierte Chemokine, wie z.B. IL-8, MCP-1 und RANTES, sind am Rollen der Leukozyten beteiligt (Jung et al., 1998; Lloyd et al., 1996).

Beim Übergang vom Rollen zur Adhäsion ist E-Selektin beteiligt (Ley et al., 1995). Die feste Adhäsion findet vor allem über die Adhäsionsmoleküle *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) auf Seite der Endothelzellen und dem β_1 -Integrin VLA-4 und den β_2 -Integrinen LFA-1, Mac-1 und p150 auf Seite der Leukozyten statt, wobei die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 die stärkste ist (Scharffetter-Kochanek et al., 1998).

Die Transmigration und deren Geschwindigkeit ist ebenfalls von Chemokinen an der Endothelzelloberfläche abhängig (Furie et al., 1991).

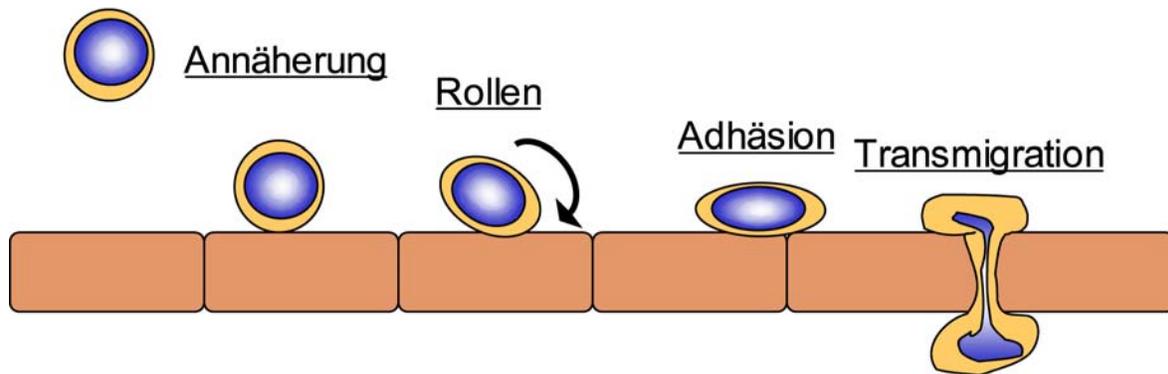
Leukozyt

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Leukozyten-Transmigrations-Kaskade. Die Leukozyten-Transmigrations-Kaskade lässt sich in vier Schritte unterteilen: Annäherung, Rollen, Adhäsion und Transmigration.

2.7. Fragestellung und Zielsetzung

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, kann in der AIDS-assoziierten Vaskulopathie eine erhöhte Anzahl adhärenter mononukleärer Zellen am Endothel der Aorta und eine Schädigung des Endothels beobachtet werden (Zietz et al., 1996). Im Gewebe von KS wurden eine große Anzahl infiltrierter Monozyten und T-Zellen (Regezi et al., 1993; Stürzl et al., 1992; Tabata et al., 1993; Uccini et al., 1997) nachgewiesen und im Gehirn HIV-1-Infizierter konnte eine Schädigung der BHS und ebenfalls eine erhöhte Infiltration von Monozyten/Makrophagen nachgewiesen werden (Hurwitz et al., 1994; Perry et al., 1994).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von HIV-1-Tat auf die Adhäsion von Leukozyten an IZ-stimulierten Endothelzellen zu untersuchen:

- (1) Es sollte mit einer promonozytären Zelllinie (U937-Zellen) bestätigt werden, dass wie von Lafrenie et al. 1996 gezeigt, HIV-1-Tat und TNF- α synergistisch die Adhäsion von Monozyten an HMVEZ erhöhen.
- (2) Erweiternd sollten die Effekte von HIV-1-Tat auf die Adhäsionsfähigkeit von PBMZ untersucht werden, um der *in vivo*-Situation näher zu kommen.
- (3) Im nächsten Schritt sollte die Frage geklärt werden, ob HIV-1-Tat die Adhäsionsfähigkeit von sowohl Monozyten als auch B-Zellen und T-Zellen gleichermaßen aktiviert oder spezifisch auf einer dieser Zellpopulationen wirkt.
- (4) Abschließend sollte die Bedeutung der von HIV-1-Tat und TNF- α induzierten Effekte auf die Adhäsion von Leukozyten anhand eines *in vivo*-Modellsystems an der Maus untersucht werden.

Da die Stimulierung von Monozyten mit HIV-1-Tat einerseits zu einer erhöhten Adhäsion an Endothelzellen führte und andererseits die Kokultivierung dieser Zellen zu morphologischen Veränderungen der Endothelzellen führte (Lafrenie et al., 1996a), sollten in einem zweiten Teil der Arbeit die molekularen Mechanismen der parakrinen Wirkung von HIV-1-Tat auf Monozyten untersucht werden. HIV-1-Tat aktiviert eine große Anzahl von Genen. Die Hemmung eines Gens, das selber ein Repressor der Signaltransduktion ist, könnte auf nachfolgende Gene eine exressionsfördernde Wirkung haben. Es sollte mit der SSH in U937-Zellen nach Genen gesucht werden, deren Expression kurze Zeit nach der Applikation von HIV-1-Tat in Monozyten erniedrigt ist. Die Wirkung von HIV-1-Tat auf diese Gene sollte auf RNA- und Protein-Ebene bestätigt werden. Die für die HIV-1-Tat-Wirkung verantwortlichen Rezeptoren sollten untersucht werden und die Ergebnisse sollten in PBMZ weiter überprüft werden.

Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollte die zellbiologische Charakterisierung der HIV-1-Tat-Wirkung im Rahmen der AIDS-assoziierten Vaskulopathie unter Einbeziehung der *in vivo*-Situation sein. Darüber hinaus sollten molekulare Mechanismen, die die vielschichtigen Wirkungen von HIV-1-Tat erklären könnten, untersucht werden.

3. Ergebnisse

Die chronische Aktivierung und massive Zerstörung des Endothels bei HIV-1-infizierten Patienten geht einher mit einer erhöhten Adhäsion von Monozyten/Makrophagen an das Aortenendothel (Zietz et al., 1996). Zudem konnten im AIDS-assoziierten KS zahlreiche infiltrierte Monozyten und T-Zellen nachgewiesen werden (Kapitel 2.2.3.). IZ und HIV-1-Tat sind lösliche Mediatoren, die im Serum von HIV-1-infizierten in erhöhten Konzentrationen vorliegen (Kobayashi et al., 1990; Lahdevirta et al., 1988; Medrano et al., 1998) und könnten daher an der Entstehung dieser pathogenen Effekte beteiligt sein. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Wirkung der Kombination von HIV-1-Tat und TNF- α auf die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel untersucht.

3.1. HIV-1-Tat und TNF- α erhöhten synergistisch die Adhäsion von U937-Zellen an HMVEZ

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst HMVEZ und die monozytäre Zelllinie U937 eingesetzt. Die HMVEZ wurden mit TNF- α stimuliert, da sie in den Gefäßen direkt dem Blutstrom ausgesetzt sind und somit dem darin in erhöhten Konzentrationen vorliegendem TNF- α . PBMZ bestehen zum größten Teil aus Lymphozyten. Diese befinden sich vorwiegend im lymphatischen Gewebe, wo eine erhöhte Konzentration von HIV-1-Tat im Vergleich zum Blut zu erwarten ist. Aus diesem Grund wurden die U937-Zellen und PBMZ mit HIV-1-Tat stimuliert.

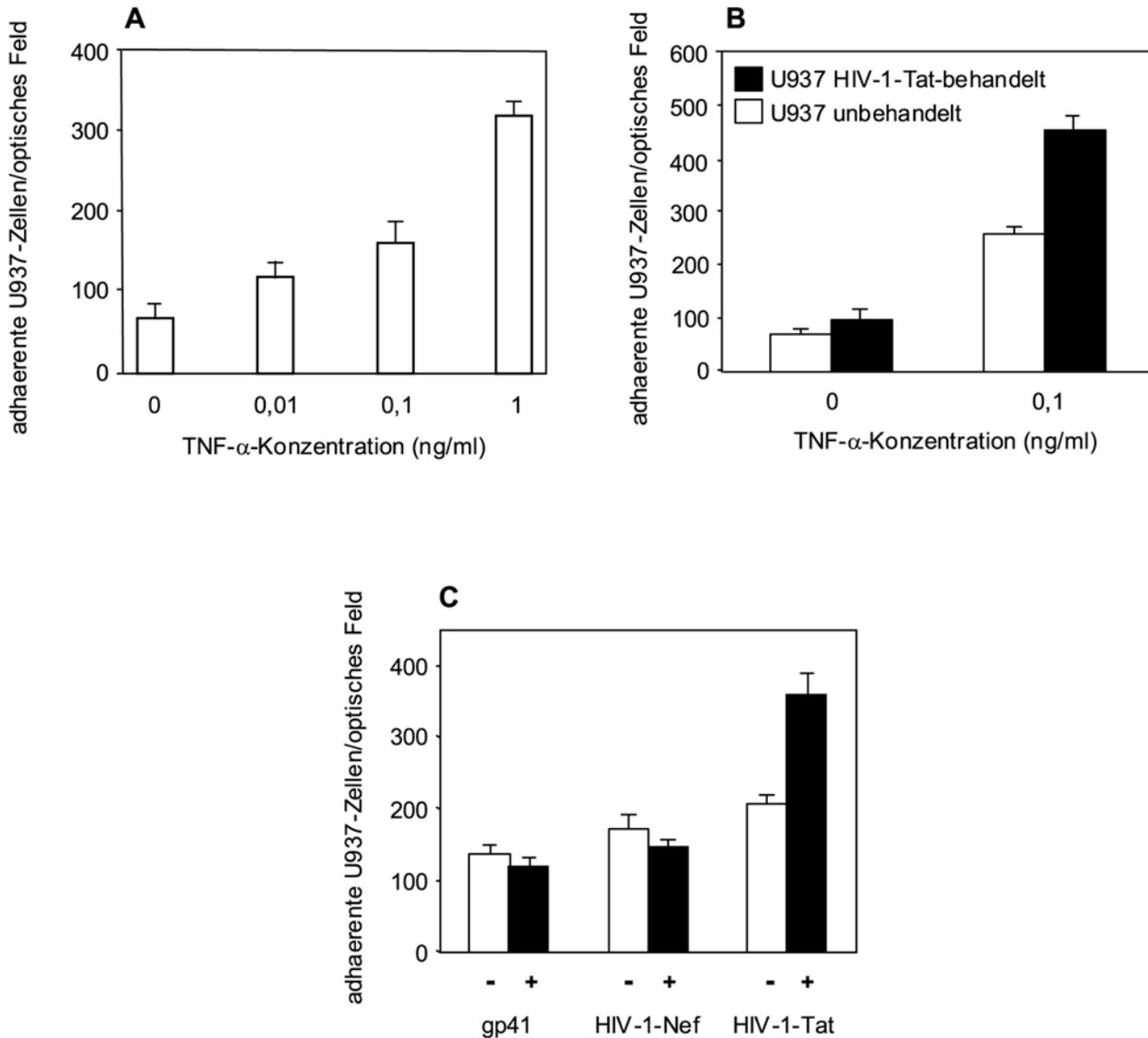
Vorversuche hatten gezeigt, dass die Behandlung von HMVEZ mit TNF- α in einer Konzentration von 1 ng/ml eine maximale Adhäsionsfähigkeit dieser Zellen für U937-Zellen bewirkte (Daten nicht gezeigt). Um mögliche synergistische Wirkungen von TNF- α und HIV-1-Tat erfassen zu können, wurde zunächst die Konzentration an TNF- α ermittelt, mit der eine halbmaximale Adhäsionsfähigkeit von HMVEZ erreicht wurde. Hierzu wurden HMVEZ über 6 h mit aufsteigenden Konzentrationen von TNF- α (0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml und 1 ng/ml) inkubiert und die Adhäsion nicht-stimulierter U937-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass bei einer Stimulierung mit 0,1 ng/ml im Vergleich zur Stimulierung mit 1 ng/ml TNF- α halb so viele U937-Zellen adhärten (Abb. 7, A). Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden deshalb jeweils 0,1 ng/ml TNF- α zur Stimulierung der HMVEZ eingesetzt.

Weitere Vorversuche hatten gezeigt, dass HIV-1-Tat in einer Konzentration von 100 ng/ml die Adhäsion von U937-Zellen an HMVEZ nachweisbar erhöht. Die Stimulierung von U937-Zellen mit HIV-1-Tat (100 ng/ml) führte zu einer 1,3-fach erhöhten Adhäsion an nicht-stimulierte HMVEZ (Abb. 7, B, linke Balken). Eine Stimulierung der HMVEZ mit TNF- α führte zu einer 3,1-fachen Erhöhung der Adhäsion nicht-stimulierter U937-Zellen (Abb. 7, B, weiße Balken). Simultane Stimulierung von U937-Zellen mit HIV-1-Tat und von HMVEZ mit TNF- α resultierte in einer 6,9-fachen Erhöhung der Adhäsion (Abb. 7, B, linker weißer und rechter schwarzer Balken).

Um zu untersuchen, ob andere HIV-1-kodierte Proteine einen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit von U937-Zellen haben, wurden U937-Zellen jeweils 24 h mit äquimolaren Konzentrationen (10 nM) an HIV-1-Tat, gp41 und HIV-1-Nef stimuliert oder unbehandelt gelassen. HIV-1-Tat erhöhte die Anzahl der adhärenen Monozyten um das 1,7-fache (Abb. 7, C, rechts, weißer und schwarzer Balken). Im Gegensatz dazu erhöhten weder gp41 (Abb. 7, C, links, weißer und schwarzer Balken) noch HIV-1-Nef (Abb. 7, C, Mitte, weißer und schwarzer Balken) die Adhäsion von U937-Zellen an TNF- α -stimulierte HMVEZ. Diese Ergebnisse zeigten, dass HIV-1-Tat und TNF- α synergistisch auf die Adhäsion von U937-Zellen wirken und dass die adhäsionsfördernde Wirkung selektiv von HIV-1-Tat induziert wird.

Abbildung 7: HIV-1-Tat und TNF- α erhöhten synergistisch die Adhäsion von U937-Zellen auf HMVEZ. U937-Zellen wurden 24 h ohne oder mit HIV-1-Tat inkubiert und anschließend auf HMVEZ, die 6 h ohne oder mit TNF- α aktiviert wurden, gegeben. Nach dem Abwaschen nicht adhärerender Zellen wurde die Zahl der adhärenen U937-Zellen bestimmt. **A:** HMVEZ wurden mit 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml und 1 ng/ml TNF- α stimuliert. Stimulierung mit 0,1 ng/ml TNF- α führte zu halbmaximaler Adhäsion unstimulierter U937-Zellen. **B:** Stimulierung von U937-Zellen mit 100 ng/ml HIV-1-Tat führte zu einer 1,3-fach erhöhten Adhäsion auf unstimulierten HMVEZ (linke Balken). Aktivierung der HMVEZ mit 0,1 ng/ml TNF- α führte zu einer 3,1-fachen Erhöhung der Adhäsion unstimulierter U937-Zellen (weiße Balken). Simultane Stimulierung von U937-Zellen mit HIV-1-Tat und HMVEZ mit TNF- α führte zu einer 6,9-fachen synergistischen Erhöhung der Adhäsion (links, weißer Balken und rechts, schwarzer Balken). **C:** Stimulierung von U937-Zellen mit 100 ng/ml HIV-1-Tat führte zu 1,7-facher Erhöhung der Adhäsion auf mit 0,1 ng/ml TNF- α aktivierten HMVEZ (rechts, weißer und schwarzer Balken). Stimulierung mit zu HIV-1-Tat äquimolaren Mengen (10 nM) gp41 (links, weißer und schwarzer Balken) und HIV-1-Nef (Mitte, weißer und schwarzer Balken) hatten keinen Effekt auf die Adhäsion von U937-

Zellen auf mit 0,1 ng/ml TNF- α -stimulierten HMVEZ. Dargestellt sind die Durchschnittswerte dreier unabhängiger Versuche.



3.2. HIV-1-Tat und TNF- α erhöhten synergistisch die Adhäsion von PBMZ an HMVEZ

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss von HIV-1-Tat auf das Adhäsionsverhalten von PBMZ untersucht. Wie für U937-Zellen wurde auch hier für PBMZ die TNF- α -Konzentration ermittelt, die zu halbmaximaler Adhäsion führte. HMVEZ wurden über 6 h mit aufsteigenden Konzentrationen an TNF- α (0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml und 1 ng/ml) inkubiert und die Adhäsion nicht-

stimulierter PBMZ untersucht. Wie für U937-Zellen führte auch für PBMZ eine Stimulierung mit 0,1 ng/ml TNF- α zu halbmaximaler Adhäsion (Abb. 8, A).

Die Stimulierung von PBMZ mit HIV-1-Tat (100 ng/ml) führte zu 1,4-fach erhöhter Adhäsion an nicht-stimulierte HMVEZ (Abb. 8, B, linke Balken und C). Stimulierung der HMVEZ mit TNF- α führte zu 4,0-facher Erhöhung der Adhäsion nicht-stimulierter PBMZ (Abb. 8, B, weiße Balken und D). Simultane Stimulierung von PBMZ mit HIV-1-Tat und von HMVEZ mit TNF- α resultierte in 7,8-facher Erhöhung der Adhäsion (Abb. 8, B, linker weißer und rechter schwarzer Balken und E).

Auch für PBMZ wurde untersucht, ob gp41 und HIV-1-Nef einen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit haben. PBMZ wurden jeweils 24 h mit 100 ng/ml HIV-1-Tat und äquimolaren Mengen (10 nM) gp41 und HIV-1-Nef stimuliert oder unbehandelt gelassen. Im Vergleich zu HIV-1-Tat erhöhte weder gp41 (Abb. 8, F, links weißer und schwarzer Balken) noch HIV-1-Nef (Abb. 8, F, mitte weißer und schwarzer Balken) die Adhäsion von PBMZ auf TNF- α -stimulierte HMVEZ. HIV-1-Tat dagegen erhöhte die Anzahl der adhärenen PBMZ, wie bei U937-Zellen, um das 1,6-fache (Abb. 8, F, rechts weißer und schwarzer Balken). Diese Ergebnisse zeigten, dass, ähnlich wie für U937-Zellen HIV-1-Tat und TNF- α einen synergistischen Effekt auf die Adhäsion von PBMZ ausübten, während andere HIV-1-kodierte Faktoren keinen Einfluss hatten.

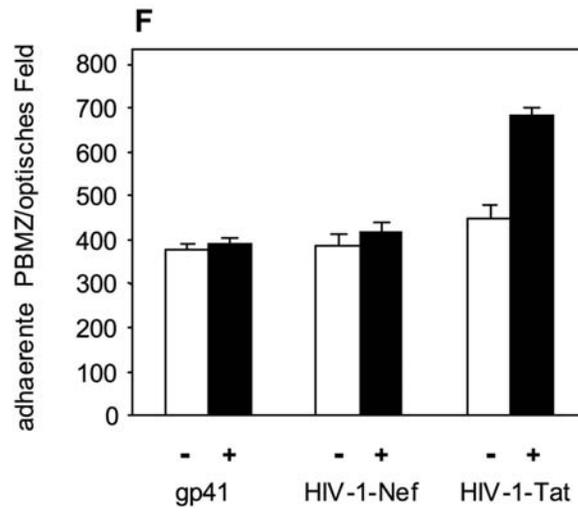
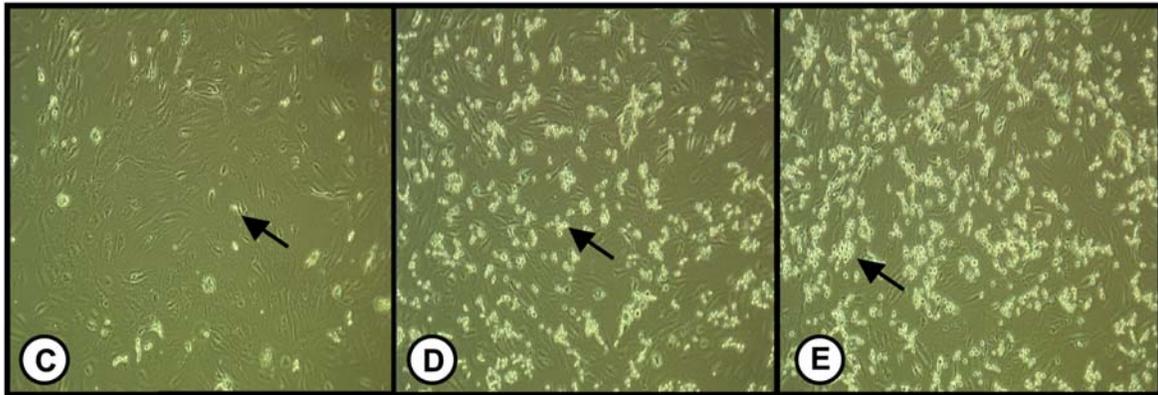
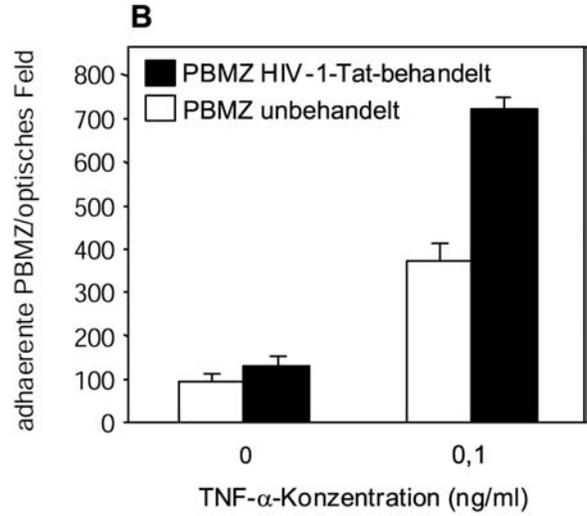
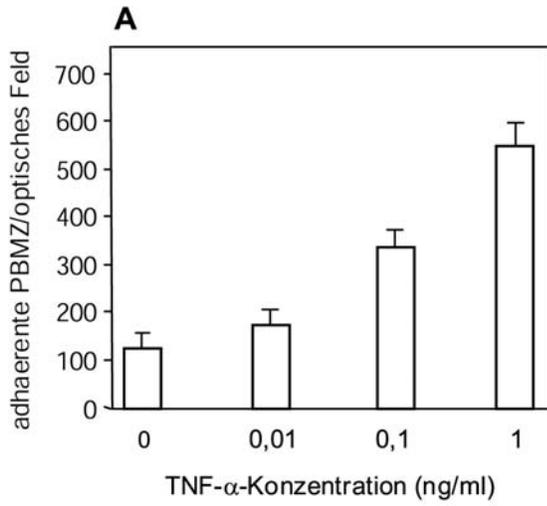


Abbildung 8: HIV-1-Tat erhöhte synergistisch mit TNF- α die Adhäsionsfähigkeit von PBMZ an HMVEZ. PBMZ wurden 24 h ohne oder mit HIV-1-Tat inkubiert und auf HMVEZ, die 6 h ohne oder mit TNF- α behandelt wurden, gegeben. Nach dem Abwaschen nicht-adhärerender Zellen wurde die Zahl der adhärerenden PBMZ bestimmt. **A:** HMVEZ wurden mit 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml und 1 ng/ml TNF- α stimuliert. Stimulierung mit 0,1 ng/ml TNF- α bewirkte eine halbmaximale Adhäsion unstimulierter PBMZ. **B:** Die Stimulierung von PBMZ mit 100 ng/ml HIV-1-Tat führte zu 1,4-fach erhöhter Adhäsion an unbehandelten HMVEZ (linke Balken). Aktivierung der HMVEZ mit 0,1 ng/ml TNF- α führte zu 4,0-facher Erhöhung der Adhäsion unbehandelter U937-Zellen (links und rechts, weiße Balken). Simultane Stimulierung von PBMZ mit HIV-1-Tat und HMVEZ mit TNF- α führte zu 7,8-facher synergistischer Erhöhung der Adhäsion (links, weißer und rechts, schwarzer Balken). **C:** Photographische Darstellung adhärer HIV-1-Tat-stimulierter PBMZ (Pfeil) auf nicht-stimulierten HMVEZ. **D:** Photographische Darstellung adhärer nicht-stimulierter PBMZ (Pfeil) auf TNF- α -stimulierten HMVEZ. **E:** Photographische Darstellung adhärer HIV-1-Tat-stimulierter PBMZ (Pfeil) auf TNF- α -stimulierten HMVEZ. **F:** Stimulierung von PBMZ mit 100 ng/ml HIV-1-Tat führte zu 1,6-facher Erhöhung der Adhäsion auf mit 0,1 ng/ml TNF- α aktivierten HMVEZ (rechts, weißer und schwarzer Balken). Behandlung der PBMZ mit zu HIV-1-Tat äquivalenten Mengen (10 nM) gp41 (links, weißer und schwarzer Balken) und HIV-1-Nef (Mitte, weißer und schwarzer Balken) hatten keinen Effekt auf die Adhäsion von PBMZ. Dargestellt sind die Durchschnittswerte dreier unabhängiger Versuche.

3.3. TNF- α erhöhte die Adhäsionskompetenz von HMVEZ für Monozyten, T-Zellen und B-Zellen gleichermaßen

Um zu analysieren, welche Zellarten aus PBMZ, an den Endothelzellen adhärten, wurde die Endothelzellschicht mit den adhären PBMZ abgelöst. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen Zelltyp-spezifische Antigene markiert und der jeweilige Anteil der verschiedenen Zellarten mit Durchfluss-Zytometrie bestimmt.

Zunächst wurde dieser Versuchsansatz mit TNF- α -stimulierten Endothelzellen und unstimulierten PBMZ durchgeführt. TNF- α -Stimulierung der HMVEZ erhöhte die Adhäsion der Leukozyten (CD45⁺-Zellen) um das 1,6-fache (Abb. 9, A und B). Hierbei erhöhte sich die Adhäsion von T-Zellen (CD3⁺) um das 1,5-fache (Abb. 9, E und F), und die von B-Zellen (CD20⁺) und Monozyten (CD14⁺) jeweils um das 2,25-fache (Abb. 9, G und H, Abb. 9, I und K).

Entsprechend der Zunahme der PBMZ ($CD45^+$) nahm der Anteil der Endothelzellen ($CD45^-$) im Verhältnis zur Gesamtpopulation auf das 0,7-fache ab (Abb. 9, C und D). Isotypkontrollen für die verwendeten FITC-IgG1-Antikörper (Abb. 9, L und M) und für die PerCP-IgG2b-Antikörper (Abb. 9, N und O) belegten die Spezifität der Antikörperbindung. Die Berechnung der Anzahl der adhärenen Zellen pro 1.000 HMVEZ zeigte, dass die Adhäsion von PBMZ und die der einzelnen Zell-Arten an $TNF-\alpha$ -stimulierten HMVEZ gleichermaßen um das 2-fache anstieg (Abb. 9, P).

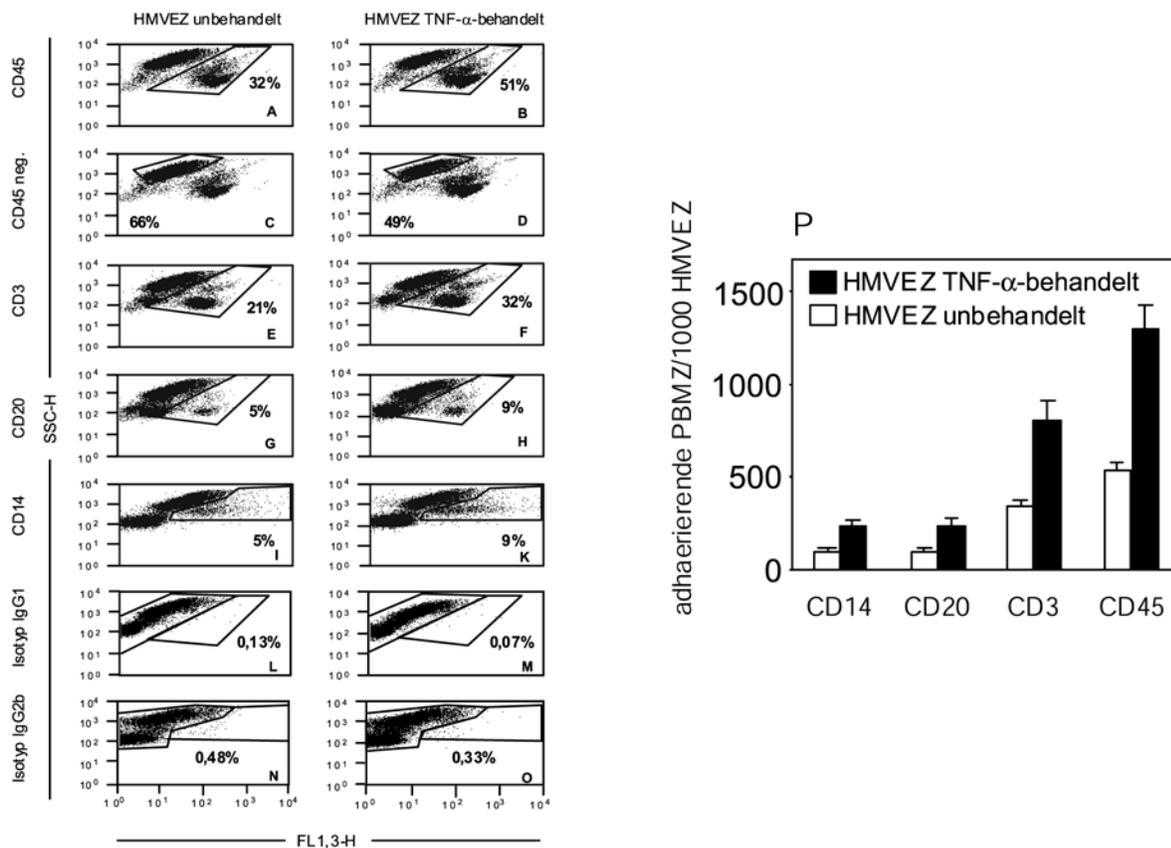


Abbildung 9: Die Stimulierung von HMVEZ mit $TNF-\alpha$ erhöhte die Adhäsion von T-Zellen, B-Zellen und Monozyten. HMVEZ wurden 6 h ohne (A, C, E, G, I, L, N) oder mit 0,1 ng/ml $TNF-\alpha$ (B, D, F, H, K, M, O) inkubiert. Nach der Adhäsion nicht-stimulierter PBMZ wurde der Anteil von Leukozyten (A und B), sowie die darin enthaltenen Anteile an T-Zellen (E und F), B-Zellen (G und H) und Monozyten (I und K) bestimmt. Hierbei wurde nach dem Adhäsionsexperiment die HMVEZ und die adhärenen PBMZ abgelöst und mit FITC-gekoppelten Antikörpern gegen CD45 (A und B), CD3 (E und F), CD20 (G und H) und einem

PerCP-gekoppelten Antikörper gegen CD14 (**I und K**) gefärbt und im Durchfluss-Zytometer quantitativ analysiert. HMVEZ wurden als CD45⁻-Zellen bestimmt (**C und D**). Isotypkontrollen mit FITC-IgG1 (**L und M**) und PerCP-IgG2b (**N und O**) bestätigten die Spezifität der Färbung. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. In **P** ist die Anzahl an CD45⁺-, CD3⁺-, CD20⁺- und CD14⁺-Zellen pro 1.000 HMVEZ dargestellt. Die Adhäsion der PBMZ und jeder einzelnen Zellart war durch Stimulierung der HMVEZ mit TNF- α (schwarze Balken) um das 2-fache im Vergleich zu nicht-stimulierten HMVEZ (weiße Balken) erhöht. Die Ergebnisse repräsentieren den Durchschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

3.4. HIV-1-Tat aktivierte spezifisch die Adhäsion von T-Zellen und Monozyten auf TNF- α -stimulierte HMVEZ

Im folgenden Versuch wurde die Zusammensetzung von adhärierenden, nicht-stimulierten (Abbildung 10, A, C, E, G, I, L, N) und mit HIV-1-Tat-stimulierten (Abbildung 10, B, D, F, H, K, M, O) PBMZ an TNF- α -aktivierte HMVEZ untersucht. HIV-1-Tat erhöhte die Adhäsion von PBMZ (CD45⁺) an TNF- α -stimulierte HMVEZ um das 1,3-fache (Abb. 10, A und B). Dabei erhöhte HIV-1-Tat die Adhäsion von T-Zellen (CD3⁺) um das 1,1-fache (Abb. 10, E und F) und von Monozyten (CD14⁺) um das 1,6-fache (Abb. 10, I und K), nicht jedoch die von B-Zellen (CD20⁺) (Abb. 10, G und H). Entsprechend der Zunahme der PBMZ (CD45⁺) nahm der Anteil der Endothelzellen (CD45⁻) relativ zur Gesamtpopulation um das 0,65-fache ab (Abb. 10, C und D). Isotypkontrollen für die FITC-IgG1-Antikörper (Abb. 10, L und M) und für die PerCP-IgG2b-Antikörper (Abb. 10, N und O) belegten die Spezifität der Antikörperbindung. Die Berechnung der adhärenen PBMZ pro 1.000 HMVEZ zeigte (Abb. 10, P), dass die Adhäsion von PBMZ durch HIV-1-Tat um das 1,8-fache anstieg. Die Anzahl adhärenen T-Zellen (Abb. 10, P) und Monozyten erhöhte sich jeweils um das 2,2-fache durch die Behandlung der PBMZ mit HIV-1-Tat (Abb. 10, P). HIV-1-Tat hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion von B-Zellen (Abb. 10, P).

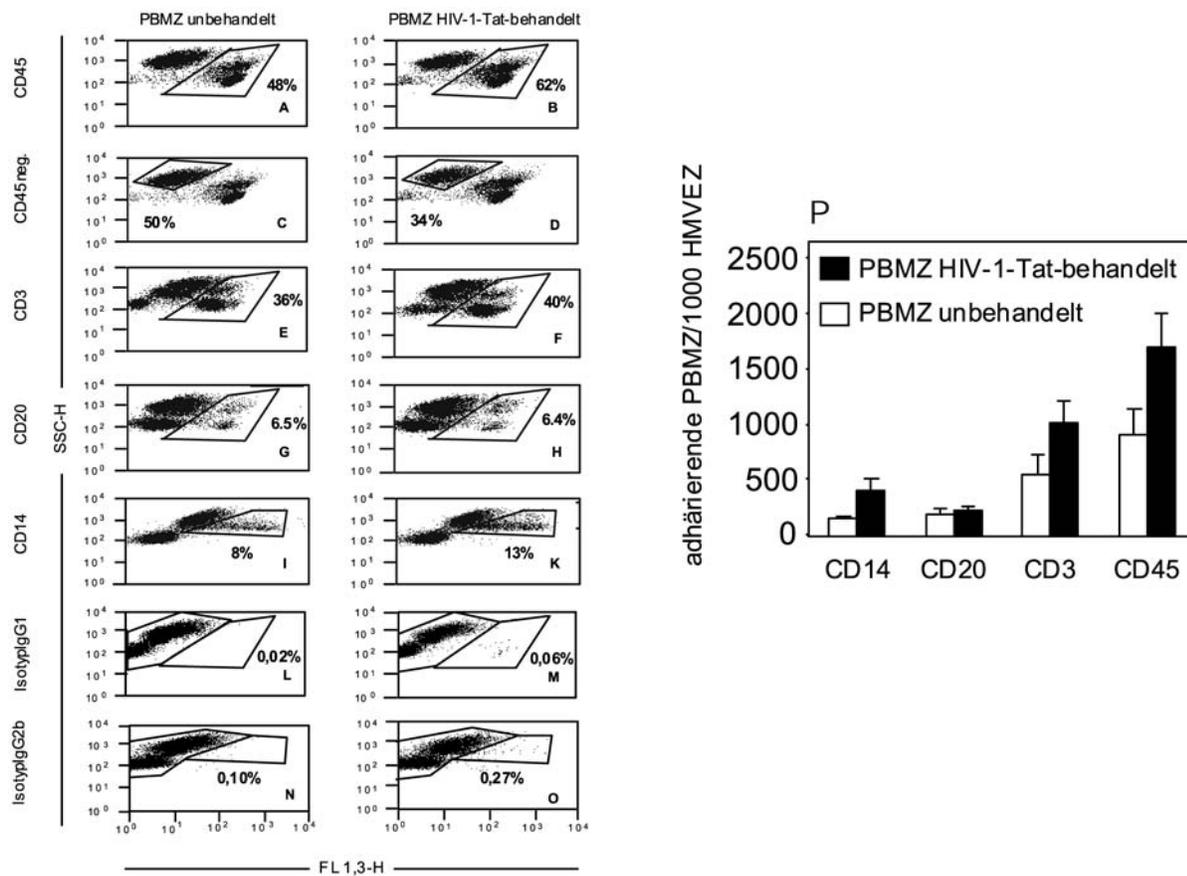


Abbildung 10: Stimulierung von PBMZ mit HIV-1-Tat erhöhte selektiv die Adhäsion von Monozyten und T-Zellen an TNF- α -stimulierte HMVEZ. HMVEZ wurden 6 h mit 0,1 ng/ml TNF- α inkubiert. PBMZ wurden nicht (A, C, E, G, I, L, N) oder 24 h mit 100 ng/ml Tat (B, D, F, H, K, M, O) behandelt und die Zusammensetzung der an HMVEZ adhärierenden Zell-Arten bestimmt. Nach dem Adhäsionsexperiment wurden die HMVEZ und die adhärenen PBMZ mit FITC-gekoppelten Antikörpern gegen CD45 (A und B), CD3 (E und F), CD20 (G und H), und einem PerCP-gekoppelten Antikörper gegen CD14 (I und K) gefärbt und im Durchfluss-Zytometer quantitativ analysiert. HMVEZ wurden als CD45⁻-Zellen bestimmt (C und D). Isotypkontrollen mit FITC-IgG1 (L und M) und PerCP-IgG2b (N und O) bestätigten die Spezifität der Färbung. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse, eines von drei unabhängigen Experimenten. Die Anzahl an CD45⁺-, CD3⁺-, CD20⁺- und CD14⁺-Zellen pro 1000 HMVEZ wurde in P dargestellt. Die Adhäsion von CD45⁺-Zellen und CD3⁺-Zellen wurde durch Stimulierung mit

HIV-1-Tat um das 1,8-fache, von CD14⁺-Zellen um das 2,2-fache erhöht, die von B-Zellen wurde nicht erhöht (schwarze Balken). Die Ergebnisse repräsentieren den Durchschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

3.5. HIV-1-Tat und TNF- α erhöhten synergistisch die Adhäsion von Leukozyten auf das Endothel *in vivo*

Um den Effekt von HIV-1-Tat und TNF- α auf die Adhäsion *in vivo* zu untersuchen, wurde Intravital-Mikroskopie am Ohr von Mäusen durchgeführt und die Zahl der rollenden und der adhätierenden Leukozyten bestimmt (Kap.: 5.2.2.4, Versuchsparameter). In diesem System erhöhte TNF- α bei einer Konzentration von 500 ng (i.p.) pro Maus signifikant die Adhäsion von Leukozyten (Carvalho-Tavares et al., 2000; Zhang and Thorlacius, 2000). Um einen synergistischen Effekt nachweisen zu können, wurde TNF- α in submaximaler Konzentration (100 ng) eingesetzt. In dieser Konzentration erhöhte es den Median der rollenden Leukozyten auf Endothelzellen um das 2,1-fache ($p \leq 0,001$) (Abb. 11, A). Injektion von 20 μ g HIV-1-Tat pro Maus erhöhte ähnlich wie TNF- α den Median der rollenden Leukozyten 2,2-fach ($p \leq 0,001$) (Abb. 11, A). Injizierte man beide Faktoren bei der Maus, konnte kein verstärkter Effekt auf das Rollen im Vergleich zur Referenz beobachtet werden (Abb. 11, A, siehe unten).

Auf die Adhäsion der Leukozyten hatte TNF- α im Vergleich zur Kontrolle keinen Effekt, während HIV-1-Tat einen nicht signifikanten Anstieg der adhätierenden Zellen von 0 auf 94 stimulierte (Abb. 11, B). Die gleichzeitige Applikation beider Faktoren (HIV-1-Tat 20 μ g und TNF- α 100 ng) erhöhte synergistisch die Anzahl der adhätierenden Leukozyten an das Endothel von 0 auf 350 (Abb. 11, B, $p \leq 0,001$). Die Adhäsion der Leukozyten könnte unter diesen Bedingungen so effizient gewesen sein, dass die Leukozyten bei Kontakt mit dem Endothel sehr schnell (vergleiche Abb. 11, A und B) adhätierten.

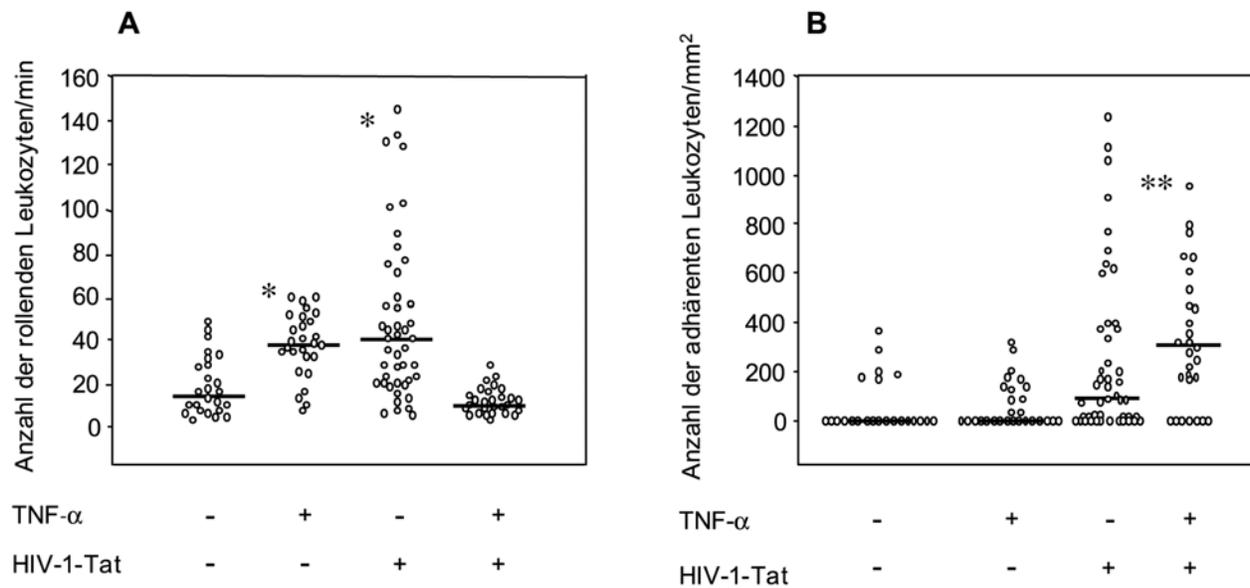


Abbildung 11: HIV-1-Tat und TNF- α erhöhten *in vivo* synergistisch die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel. C57Bl/6 Mäusen wurden entweder TNF- α (100 ng/Maus, n = 3), HIV-1-Tat (20 μ g/Maus, n = 3), beide Faktoren in Kombination (n = 2) oder als Referenz PBS/0,1% BSA (n = 2) i.p. injiziert. Durch Intravital-Mikroskopie wurde vier Stunden nach der Injektion sowohl die Anzahl der rollenden Leukozyten pro Minute (**A**) als auch die Anzahl der adhärenen Leukozyten in 100 μ m langen Segmenten der Vene (**B**) bestimmt. TNF- α erhöhte die Anzahl der rollenden Leukozyten 2,1-fach ($p < 0,001$), nicht jedoch die Anzahl der adhärenen Leukozyten. HIV-1-Tat erhöhte die Anzahl der rollenden Leukozyten um das 2,2-fache ($p < 0,001$, **A**) und die Anzahl der adhärenen Leukozyten nicht signifikant im Median von 0 auf 94 (**B**). TNF- α und HIV-1-Tat zusammen erhöhten den Median der adhärenen Leukozyten von 0 auf 360 ($p < 0,001$, **B**), während die Anzahl der rollenden Leukozyten nicht erhöht war. Jeder Kreis stellt den Wert eines Gefäßes dar. Aufgrund ihrer parametrischen Verteilung wurden die Daten als Mediane dargestellt. Die Anzahl der adhärenen Leukozyten ist pro mm² Endothel dargestellt. * $p \leq 0,001$ im Vergleich zu unbehandelten Mäusen; ** $p \leq 0,001$ im Vergleich zu unbehandelten, TNF- α -behandelten und HIV-1-Tat behandelten Mäusen.

3.6. Zusammenfassung der Kapitels 3.1. - 3.5.: TNF- α und HIV-1-Tat erhöhten synergistisch die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel *in vitro* und *in vivo*

Bei HIV-1-Patienten findet man eine dramatisch erhöhte Anzahl adhärenter Monozyten/Makrophagen am Aortenendothel (Zietz et al., 1996). Zudem ist das KS durch eine große Anzahl an infiltrierten Monozyten und T-Zellen (Stürzl et al., 2001) charakterisiert. In Korrelation mit dem Voranschreiten der Krankheit steigen bei AIDS-Patienten die Serumkonzentrationen von TNF- α (Kobayashi et al., 1990; Medrano et al., 1998). Zudem wurde gezeigt, dass HIV-1-Tat von infiltrierenden Zellen freigesetzt wird (Chang et al., 1997; Ensoli et al., 1990; Ensoli et al., 1993) und die Adhäsion von Monozyten an TNF- α -stimulierte Endothelzellen erhöht ist (Lafrenie et al., 1996a). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde hier das Zusammenwirken beider Faktoren bei der Stimulierung der Adhäsion von U937-Zellen und PBMZ an Endothelzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Stimulierung von U937-Zellen und PBMZ mit HIV-1-Tat und von HMVEZ mit TNF- α synergistisch die Adhäsion erhöhte. Andere rekombinante virale Faktoren wie HIV-1-Nef und gp41 hatten keinen Einfluss auf die Adhäsionskompetenz von U937-Zellen und PBMZ. Mittels Durchfluss-Zytometrie wurde gezeigt, dass die Stimulierung von Endothelzellen mit TNF- α die Adhäsionskompetenz der HMVEZ für Monozyten, T-Zellen und B-Zellen gleichermaßen (2-fach) stimulierte. Durch zusätzliche Stimulierung der PBMZ mit HIV-1-Tat wurde die Adhäsion von Monozyten und T-Zellen aber nicht von B-Zellen an TNF- α -stimulierte HMVEZ weiter erhöht. *In vivo*-Versuche am Ohr der Maus zeigten, dass TNF- α und HIV-1-Tat die Anzahl an rollenden Leukozyten am Endothel erhöhten. Beide Faktoren zusammen führten zu einem synergistischen Effekt in der Adhäsion von Leukozyten am Endothel. Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle von HIV-1-Tat bei der Fehlregulierung der Adhäsion von Leukozyten an das Endothel im Rahmen der AIDS-assoziierten Vaskulopathie.

3.7. Untersuchungen zur Wirkung des HIV-1-Tat-Proteins auf die Genexpression in Monozyten

Die Stimulierung von Monozyten mit HIV-1-Tat führte einerseits zu einer erhöhten Adhäsion an Endothelzellen und andererseits führte die Kokultivierung dieser Zellen zu einer veränderten Morphologie der Endothelzellschicht (Lafrenie et al., 1996a).

Um die Wirkung von HIV-1-Tat auf Monozyten auf molekularer Ebene zu analysieren, sollten HIV-1-Tat regulierte Gene in U937-Zellen identifiziert werden. HIV-1-Tat wird von infizierten T-Zellen freigesetzt (Chang et al., 1997; Ensoli et al., 1993) und kann sowohl von infizierten als auch von nicht infizierten Zellen aufgenommen werden (Hofman et al., 1993; Tyagi et al., 2001). In dieser Arbeit stand der parakrine Effekt von HIV-1-Tat auf nicht infizierte Monozyten im Vordergrund. HIV-1-Tat kann über parakrine Wirkung die Expression zahlreicher Gene aktivieren, wie z.B. CCR-5, CXCR4, IL-6, TNF- α , β 2-Integrine, MMP-9 und IL-1 β (Gibellini et al., 1994; Huang et al., 1998; Lafrenie et al., 1996a; Lafrenie et al., 1997). Es sollten bevorzugt Gene identifiziert werden, deren Expression im Rahmen einer frühen Antwort in HIV-1-Tat-behandelten Zellen unterdrückt wird. Solche Gene könnten selber Repressoren darstellen, die auf andere expressionsfördernde Gene wirken. Die Hemmung von Repressoren durch HIV-1-Tat könnte erklären, warum HIV-1-Tat auf zahlreiche Gene eine aktivierende Wirkung ausübt. Für die Isolierung HIV-1-Tat-supprimierter Gene wurde die *suppressed subtractive hybridisation* (SSH)-Methode eingesetzt.

3.7.1. Die SSH-Methode zur Isolierung differentiell exprimierter Gene

Die SSH-Methode ist eine Technik, die es ermöglicht, auf RNA-Ebene Gene zu identifizieren, welche in einer Zellpopulation exprimiert werden, jedoch nicht in einer Vergleichs-Population. Von jeder der zu vergleichenden Populationen wird doppelsträngige cDNA hergestellt und mit dem Restriktionsenzym Rsa I verdaut. Die cDNA, aus der spezifisch exprimierte Gene isoliert werden soll, wird als Test-cDNA bezeichnet und die andere cDNA als Subtraktor-cDNA. Die Test-cDNA wird in getrennten Ansätzen mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotid-Adaptoren ligiert (T_1 und T_2), die nur an die 5'-Enden des cDNA-Strangs anheften. Anschließend werden zwei Hybridisierungen durchgeführt. Zunächst wird ein Überschuss an Subtraktor-cDNA mit jeder der beiden T_1 - und T_2 -ligierten Test-cDNA-Proben hybridisiert, so dass Sequenzen, die in beiden cDNA-Populationen (Test und Subtraktor) auftreten, abgesättigt werden. In den Hybridisierungsansätzen entstehen einzel- und doppelsträngige Produkte verschiedener Zusammensetzung (Abb. 12, a, b, c, d). Zusätzlich zur Absättigung von unverändert exprimierter cDNA mit Subtraktor-cDNA (Abb. 12, Hybridisierungsprodukt c) findet eine Nivellierung der relativen Häufigkeit nicht rehybridisierter einzelsträngiger Moleküle statt. Unter den gewählten Bedingungen folgt die Rehybridisierung beider Stränge der differentiell exprimierten cDNA (Abb. 12, Hybridisierungsprodukt b) einer Kinetik zweiter Ordnung, wobei die Geschwindigkeit der Reaktion von der Konzentration der Reaktionspartner abhängig ist. Daher hybridisieren häufig vorkommende differentiell exprimierte Sequenzen der Test-cDNA schneller als seltene

Sequenzen. Von unterschiedlich exprimierten Genen, die nicht mit der im Überschuss vorhandenen Subtraktor-cDNA abgesättigt werden, bleiben daher weitgehend unabhängig von der Ausgangskonzentration in etwa gleich viele nicht hybridisierte Einzelstränge der Test-cDNA übrig (Abb. 12, Hybridisierungsprodukt a).

Für die zweite Hybridisierung werden die zwei Ansätze der ersten Hybridisierung ohne weitere Denaturierung gemischt und zur vollständigen Absättigung von Sequenzen, die in beiden cDNA-Populationen auftreten, wird weitere Subtraktor-cDNA zugegeben. Einzelsträngige, differentiell exprimierte Sequenzen (Abb. 12, Hybridisierungsprodukt a) der beiden Test-cDNA-Populationen können hybridisieren, und es treten Moleküle mit verschiedenen Adaptoren auf (Abb. 12, Hybridisierungsprodukt e). Das Ziel dieser subtraktiven Hybridisierungsschritte ist die Erzeugung doppelsträngiger cDNA-Fragmente, die an beiden Enden unterschiedliche Adaptoren besitzt. Diese Fragmente sollen für Sequenzen kodieren, die entweder ausschließlich oder im Vergleich zu den Kontrollzellen wesentlich stärker in den Zellen, aus denen die Test-cDNA isoliert wurde, exprimiert werden.

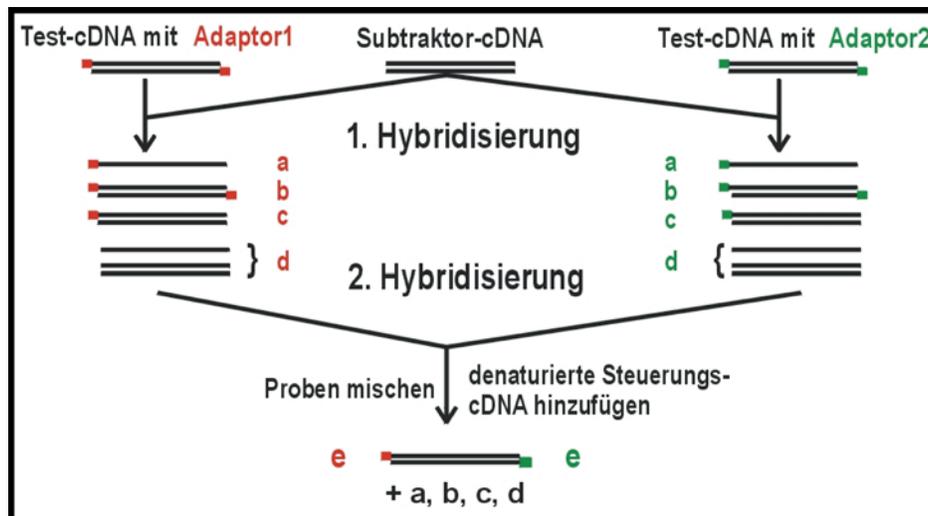


Abbildung 12: Schema der zwei Hybridisierungsschritte der SSH nach der Adaptorligation. Bei der ersten Hybridisierung wird ein Überschuss an Subtraktor-cDNA zu jeder der beiden Test-cDNA-Proben hinzugefügt. Sequenzen, die in beiden cDNA-Populationen (Test und Subtraktor) auftreten, hybridisieren. Nach der ersten Hybridisierung treten vier verschiedene Hybridisierungsprodukte a, b, c und d auf. Für die zweite Hybridisierung werden

die zwei Ansätze der ersten Hybridisierung ohne Denaturierung gemischt und neue denaturierte Subtraktor-cDNA zugegeben. Einzelsträngige subtrahierte, differentiell exprimierte Sequenzen der Test-cDNA-Populationen (Hybridisierungsprodukte a) können hybridisieren, und es treten zusätzlich doppelsträngige Produkte mit verschiedenen Adaptoren (Hybridisierungsprodukte e) auf.

Anschließend werden die 3'-Enden dieser cDNA-Moleküle mittels einer DNA-Polymerase-Reaktion aufgefüllt und durch PCR mit Primern, die an beide Adaptoren binden, amplifiziert. Bei dieser PCR werden die Produkttypen a und d (Abb. 13) nicht amplifiziert, da ihnen die Primerbindungsstellen fehlen. Produkte des Typs b (Abb. 13) zirkularisieren aufgrund der gleichen Adaptor-Sequenzen an beiden Enden, wodurch die Anheftung der *Primer* und somit die Amplifikation verhindert wird. Die Typ c-Produkte (Abb. 13) haben nur eine Bindungsstelle für die Primer und werden nur linear vervielfacht. Ausschließlich Produkte des Typs e (Abb. 13), welche zwei verschiedene Adaptoren tragen und differentiell exprimierte Sequenzen repräsentieren, werden exponentiell amplifiziert und angereichert. Diese cDNA-Fragmente werden in Bakterien transformiert und eine cDNA-Genbank angelegt.

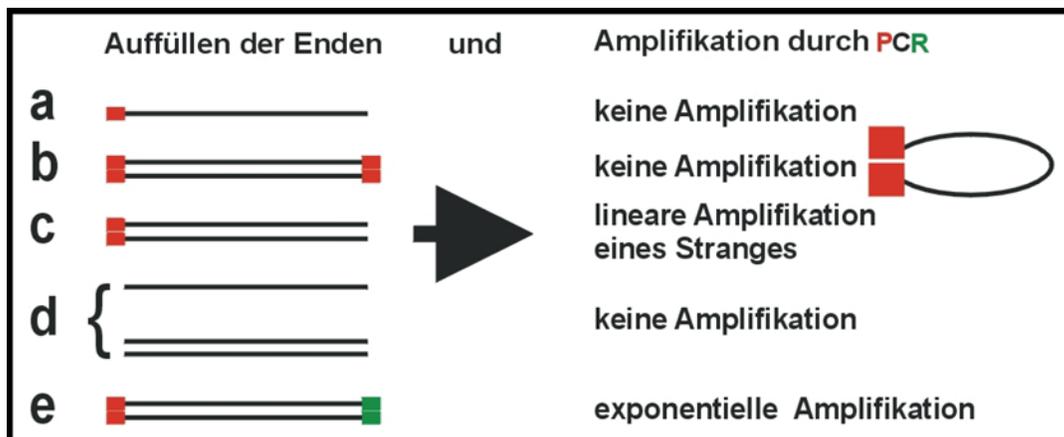


Abbildung 13: Die Hybridisierungsprodukte der zweiten PCR und ihre Amplifikationseigenschaften. Die 3'-Enden der Adaptoren der Produkte der zweiten Hybridisierung werden aufgefüllt und durch PCR amplifiziert. Die Produkttypen a und d werden aufgrund der fehlenden *Primer*-Bindungsstellen nicht amplifiziert und Produkte des Typs b bilden Ringstrukturen aus, die eine Amplifikation unterdrücken. Die Typ-c-Produkte haben nur eine Bindungsstelle für die Primer und werden nur linear vervielfältigt. Ausschließlich Produkte

des Typs e, welche zwei verschiedene Adaptoren tragen und differentiell exprimierte Sequenzen repräsentieren, werden exponentiell amplifiziert.

3.7.1.1. Anwendung der SSH-Methode zur Identifizierung HIV-1-Tat-supprimierter Gene in Monozyten

U937-Zellen wurden über 3 h mit 10 ng/ml HIV-1-Tat oder mit PBS-0,1% BSA inkubiert. Von beiden Zellpopulationen wurde polyadenylierte RNA isoliert und 2 µg für die SSH, wie unter Kapitel 3.7.1. beschrieben, eingesetzt. Die RNA aus unbehandelten Zellen wurde als Test-RNA eingesetzt und die RNA aus HIV-1-Tat-behandelten Zellen als Subtraktor-RNA. In der aus diesem Ansatz generierten cDNA-Genbank sollten cDNA-Sequenzen aus nicht-stimulierten U937-Zellen angereichert sein, die in HIV-1-Tat-stimulierten Monozyten supprimiert sind.

3.7.1.1.1. Identifizierung HIV-1-Tat-supprimierter Gene in U937-Zellen

Polyadenylierte mRNA wurde aus nicht-stimulierten U937-Zellen als Test-RNA und aus HIV-1-Tat-stimulierten U937-Zellen als Subtraktor-RNA isoliert und doppelsträngige cDNA synthetisiert. Anschließend wurden an die Test-cDNA Adaptoren (T_1 und T_2) ligiert. Die Adaptor-ligierten Test-Ansätze (T_1 und T_2) wurden mit dem 5-fachen Volumen Subtraktor-cDNA über 16 h bei 68°C hybridisiert. Dabei sollten Sequenzen, die in beiden Populationen vertreten sind, hybridisieren. Für die zweite Hybridisierung wurden die Test-Populationen (T_1 und T_2) vereint. Um eine vollständige Absättigung der in beiden Populationen exprimierten Sequenzen zu erreichen, wurde nochmals das 5-fache Volumen an Subtraktor-cDNA zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über 22 h bei 68°C. Die Produkte der subtraktiven Hybridisierung wurden mittels PCR amplifiziert. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden unter Verwendung von *nested*-Primern die Produkte der ersten PCR weiter angereichert. Es gibt Anzeichen dafür, dass die Expression von GAPDH durch HIV-1-Tat in Monozyten im Vergleich zu unbehandelten Monozyten nicht beeinflusst wird (Lafrenie et al., 1997). Daher wurde die erforderliche Zyklenzahl für eine optimale subtraktive Amplifikation über die Amplifikation von GAPDH ermittelt. Bei der Verwendung von 30 Zyklen für die erste PCR-Reaktion und von 11 Zyklen für die zweite PCR-Reaktion zeigte die anschließende Subtraktions-Analyse, dass das GAPDH-Gen in der cDNA der nicht subtrahierten Kontrolle (Probe_{nicht sub}) bereits nach 18 Zyklen nachweisbar war, während zum Nachweis des GAPDH-Gens aus dem subtrahierten Ansatzes (Probe_{sub}) 28 Zyklen benötigt wurden (Abb. 14). Das Ergebnis belegt, dass unter den gewählten Bedingungen eine effiziente Subtraktion von gleich exprimierten Genen erreicht wurde.



Abbildung 14: Subtraktions-Effizienz-Analyse mittels GAPDH-Amplifikation. Die PCR-Produkte der subtrahierten cDNA ($Probe_{sub}$) und der nicht-subtrahierten Kontrolle ($Probe_{nicht\ sub}$) wurden mit GAPDH-spezifischen Primern in einer PCR-Reaktion über 18, 23, 28 und 33 Zyklen amplifiziert. Die GAPDH-Bande war bei der Kontrolle ($Probe_{nicht\ sub}$) nach 18 Zyklen sichtbar, wohingegen bei dem subtrahierten Ansatz ($Probe_{sub}$) erst nach 28 Zyklen ein schwaches Signal zu erkennen war. Der Unterschied von ca. 10-15 Zyklen bei der Amplifikation von GAPDH aus der Kontrolle und der subtrahierten Probe weist auf eine erfolgreich durchgeführte Subtraktion hin.

3.7.1.1.2. Nachweis differentiell exprimierter cDNA-Sequenzen mittels *Southern blot*-Analyse

Die aus der SSH gewonnenen Fragmente wurden in Plasmide kloniert und es wurde eine Genbank erstellt. Um Fragmente zu identifizieren, die in HIV-1-Tat-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen supprimiert waren, wurde eine differentielle Hybridisierung durchgeführt. Hierzu wurden 287 Plasmide der erstellten cDNA-Genbank isoliert, mit Rsa I enzymatisch geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt, auf je zwei Nitrozellulosemembranen transferiert und eine *Southern blot*-Hybridisierung durchgeführt. Die Filter wurden anschließend mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden, die aus zwei unterschiedlichen SSH-Ansätzen gewonnen wurden hybridisiert. Für die Herstellung der Sonden wurden zum einen RNA aus unstimulierten U937-Zellen als Tester und RNA aus HIV-1-Tat-stimulierten Zellen als Subtraktor eingesetzt (Sonde $_{BSA\ minus\ HIV-1-Tat}$), und in einem zweiten Ansatz RNA aus HIV-1-Tat-stimulierten Zellen als Tester und RNA aus unstimulierten Zellen als Subtraktor (Sonde $_{HIV-1-Tat\ minus\ BSA}$).

Es wurden insgesamt 5 Plasmide identifiziert, die mit der Sonde $_{HIV-1-Tat\ minus\ BSA}$ ein schwächeres Signal zeigten als mit der Sonde $_{BSA\ minus\ HIV-1-Tat}$. Zwei Beispiele sind in Abbildung 15 dargestellt.

Diese Plasmide könnten cDNA-Fragmente enthalten, die in U937-Zellen durch HIV-1-Tat reprimiert werden.

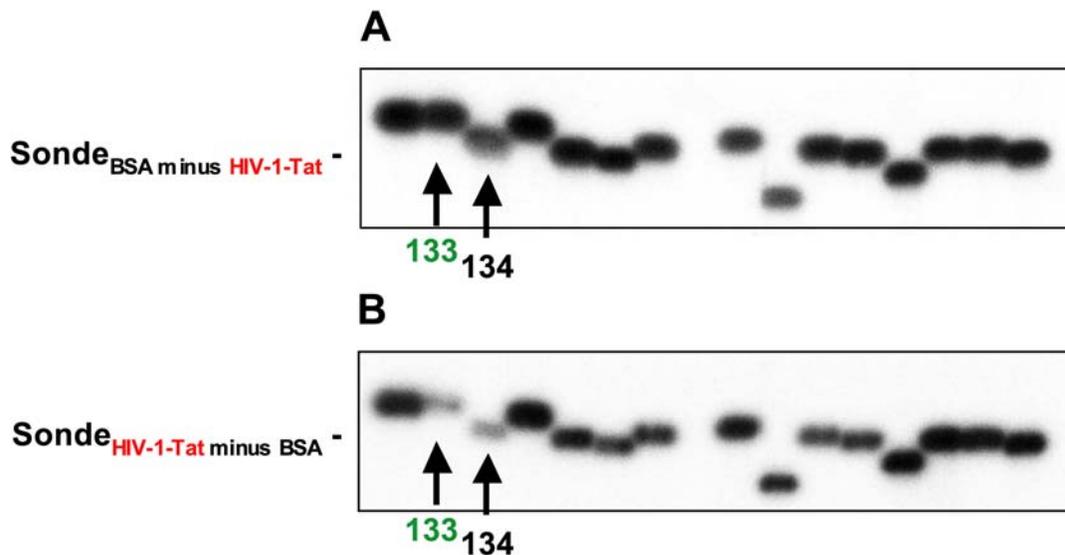


Abbildung 15: Nachweis von cDNA-Fragmenten, die in unbehandelten und in HIV-1-Tat-stimulierten U937-Zellen differentiell exprimiert werden. Rekombinante Plasmide der SSH-Genbank wurden enzymatisch mit Rsa I geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt, auf je zwei Nitrozellulosemembranen transferiert und mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisiert. In **(A)** wurde die Sonde aus der Subtraktion von RNA von unstimulierten U937-Zellen als Tester und RNA von HIV-1-Tat-stimulierten U937-Zellen als Subtraktor (Sonde_{BSA minus HIV-1-Tat}) und in **(B)** die Sonde aus der Subtraktion von RNA aus HIV-1-Tat-stimulierten U937-Zellen als Tester und RNA aus unstimulierten U937-Zellen als Subtraktor (Sonde_{HIV-1-Tat minus BSA}) verwendet. Die cDNA-Fragmente der Klone 133 und 134 gaben mit der in B verwendeten Sonde ein schwächeres Signal (Pfeile) als mit der in A verwendeten Sonde. Dies weist darauf hin, dass die Expression der entsprechenden Gene in HIV-1-Tat-stimulierten U937-Zellen gehemmt sein könnte.

3.7.1.1.3. HIV-1-Tat hemmt die OGT-Expression in U937-Zellen

Um eindeutig eine differentielle Expression der im *Southern blot* unterschiedlich hybridisierenden Fragmente zu bestätigen, wurde eine *Northern blot*-Analyse durchgeführt.

U937-Zellen wurden 3 h ohne oder mit 10 ng/ml oder 100 ng/ml HIV-1-Tat inkubiert. Von den Zellen wurde die gesamtzelluläre RNA isoliert und auf eine Membran transferiert. Als Sonden wurden die entsprechenden Fragmente, die in der *Southern blot*-Analyse eine differentielle Expression zeigten, eingesetzt. Die *Northern blot*-Hybridisierung ergab, dass von den fünf ausgewählten cDNA-Fragmenten, die im ersten Test eine differentielle Hybridisierung aufwiesen, vier gleichermaßen mit der RNA von HIV-1-Tat-stimulierten und von unbehandelten U937-Zellen hybridisierten (Daten nicht gezeigt). Nur die Hybridisierung mit dem PCR-Produkt des Plasmides 133 (Abb. 15) ergab ein unterschiedlich starkes Signal zwischen der RNA von nicht-stimulierten und HIV-1-Tat-stimulierten U937-Zellen (Abb. 16, A und B).

Die Sequenzanalyse des Fragments 133 ergab, dass es für ein Teil der mRNA der humanen *O-linked* N-Acetylglucosamintransferase (OGT) kodierte.

Vom humanen OGT-Gen sind fünf Transkripte bekannt, die eine Größe von 9,4 kb, 7,9 kb, 6,3 kb, 4,4 kb und 4,2 kb haben (Nolte and Muller, 2002). Die mRNA-Größen in der *Northern blot*-Hybridisierung entsprachen der 9,4 kb-, 7,9 kb-, und 4,2 und/oder 4,4 kb-Bande. Eine 6,3 kb-Bande war nicht nachweisbar. Eine Signalabnahme war in der RNA HIV-1-Tat-stimulierter Zellen vor allem bei der 9,4 kb-Bande deutlich zu sehen, konnte aber auch bei der 7,9 kb- und bei der 4,2 kb- bzw. 4,4 kb-Bande beobachtet werden (Abb. 16, A).

Um die Ergebnisse des *Northern blot* zu bestätigen wurde zudem der zeitliche Verlauf der OGT-Expression in nicht-stimulierten und in HIV-1-Tat-stimulierten U937-Zellen mittels RT-PCR untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass nach 2 h und 4 h die OGT-Expression in HIV-1-Tat-stimulierten U937-Zellen im Vergleich zu nicht-stimulierten U937-Zellen deutlich gehemmt ist. Nach 6 h stieg die Expression der mRNA von OGT in HIV-1-Tat-stimulierten U937-Zellen wieder an (Abb. 16, C). Bei diesem Versuch wurden 10 ng/ml und 100 ng/ml HIV-1-Tat eingesetzt. In einem nachfolgenden Versuch wurde gezeigt, dass HIV-1-Tat auch in Konzentrationen von 1 ng/ml, wie sie im Serum HIV-1-Infizierter nachgewiesen wurden, die mRNA-Expression von OGT im Vergleich zu nicht-stimulierten U937-Zellen herunterreguliert (Abb. 16, D).

Humanes OGT besteht aus drei Untereinheiten mit einer Größe von 116 kDa, 103 kDa und 74,5 kDa (Hanover et al., 2003).

Um zu untersuchen, ob HIV-1-Tat die Expression von OGT auch auf Protein-Ebene reguliert, wurde eine *Western blot*-Analyse mit einem spezifischen Antikörper durchgeführt. Hierzu wurden U937-Zellen für unterschiedliche Zeiten und mit verschiedenen Konzentrationen (1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml) an HIV-1-Tat stimuliert (Abb. 16, E). Als Referenz wurden U937-Zellen mit PBS/0,1% BSA inkubiert. In der *Western blot*-Analyse konnte in U937-Zellen eine OGT-spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von 78 kDa nachgewiesen werden. In Zellen, die eine Stunde mit HIV-1-Tat inkubiert worden waren, wies diese Bande keine veränderte Stärke zu der in unbehandelten Zellen auf. Jedoch bereits nach 1,5 h war diese Bande in HIV-1-Tat-behandelten Zellen (10 ng/ml und 100 ng/ml) deutlich schwächer. Die Unterschiede bleiben in Zellen, die bis zu 6 h mit mit HIV-1-Tat behandelt wurden, deutlich bestehen. Die Hemmung der OGT-Expression durch HIV-1-Tat konnte somit auf Proteinebene bestätigt werden und war bei HIV-1-Tat-Konzentrationen von 1 ng/ml bis 100 ng/ml in einem Zeitraum von 1,5 h bis 6 Stunden zu beobachten (Abb. 16, E).

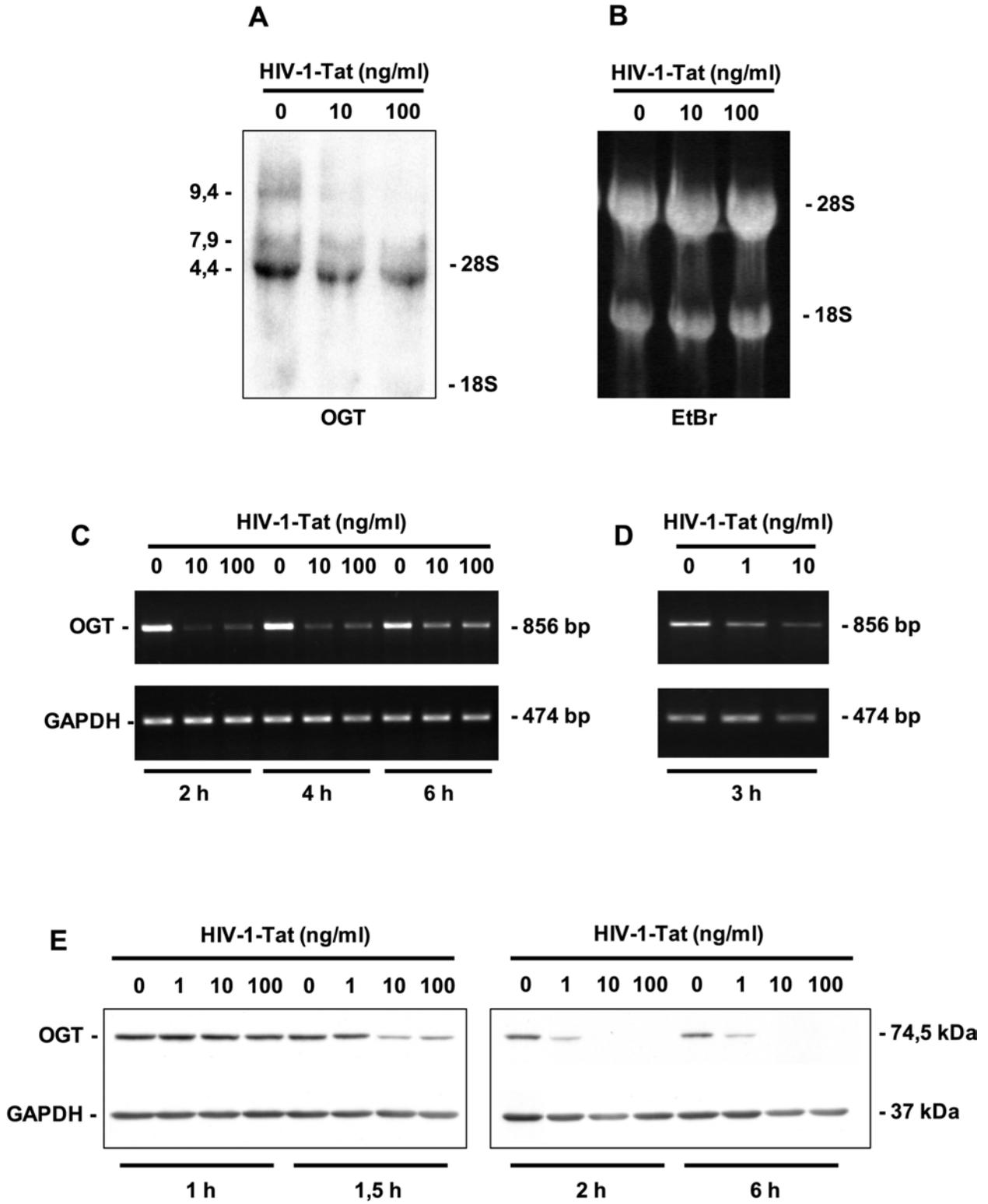


Abbildung 16: HIV-1-Tat hemmt die Expression von OGT auf mRNA- und Protein-Ebene:

Northern blot-Analyse (A, B): **A:** 30 µg Gesamt-RNA von unstimulierten und 3 h mit 10 ng/ml und 100 ng/ml HIV-1-Tat stimulierten U937-Zellen wurden in einem denaturierenden, 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit ³²P-markierter OGT-cDNA, die dem Fragment aus dem Southern blot entspricht, hybridisiert. Die 9,4 kb, 7,9 kb und 4,2 kb und/oder 4,4 kb großen RNA-Moleküle wurden in HIV-1-Tat-stimulierten U937-Zellen schwächer exprimiert. **B:** Die Ethidiumbromidfärbung zeigte, dass gleiche Mengen RNA aufgetragen wurden.

RT-PCR-Analyse (C, D): U937-Zellen wurden 2 h, 4 h und 6 h mit 10 ng/ml und 100 ng/ml **(C)** oder 3 h mit 1 ng/ml und 10 ng/ml **(D)** HIV-1-Tat stimuliert. Als Referenz wurden jeweils U937-Zellen ohne HIV-1-Tat inkubiert. Die aus den Zellen gewonnene Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mit OGT- bzw. GAPDH-spezifischen Primern amplifiziert. **C:** Nach 2 h und 4 h war die Expression der OGT-mRNA durch 10 ng/ml und 100 ng/ml HIV-1-Tat gehemmt, nach 6 h stieg die Expression wieder an. **D:** Physiologische Konzentrationen (1 ng/ml) von HIV-1-Tat hemmten die OGT-Expression. GAPDH-Amplifikate zeigten, dass gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden.

Western blot-Analyse (E): U937-Zellen wurden mit 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml HIV-1-Tat für 1 h, 1,5 h, 2 h und 6 h stimuliert. Die aus den Zellen gewonnen RIPA-Extrakte wurden anschließend im *Western blot* analysiert. **E:** Nach Behandlung von U937-Zellen für 1,5 h mit HIV-1-Tat in Konzentrationen von 10 ng/ml und 100 ng/ml war die OGT-Synthese in diesen Zellen deutlich verringert. Nach 2 h war OGT in Anwesenheit von 1 ng/ml HIV-1-Tat nur noch schwach, bei höheren HIV-1-Tat-Konzentrationen nicht mehr nachweisbar. Färbung mit einem Antikörper gegen GAPDH zeigte, dass gleiche Mengen aufgetragen worden waren.

3.7.1.1.4. VEGF₁₂₁ hemmt in U937-Zellen die Expression von OGT auf mRNA-Ebene und Protein-Ebene

VEGF-A ist ein angiogener Faktor der die Migration von Endothelzellen und Monozyten induziert. HIV-1-Tat und VEGF-A weisen Ähnlichkeiten in den basischen Sequenzen auf (Mitola et al., 1997). Es ist gezeigt worden, dass HIV-1-Tat an dieselben Rezeptoren wie VEGF-A binden kann und auf diese Weise ebenfalls wie VEGF-A die Migration von Monozyten und Endothelzellen induziert. Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob VEGF-A ebenso wie HIV-1-Tat die OGT-Expression hemmen kann. Von VEGF-A existieren 5 Isoformen (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅,

VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆). In den folgenden Versuchen wurde die Isoform VEGF₁₂₁ verwendet, da diese neben VEGF₁₆₅ die am häufigsten beschriebene ist (Neufeld et al., 1999).

U937-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (1 ng/ml und 100 ng/ml) von VEGF₁₂₁ über 2 h und 4 h stimuliert und die Expression von OGT mittels RT-PCR untersucht. Es zeigte sich, dass VEGF₁₂₁ in beiden Konzentrationen die OGT-mRNA-Expression nach 2 h und 4 h deutlich hemmte (Abb. 17, A).

Der Einfluss von VEGF₁₂₁ (1 ng/ml und 100 ng/ml) auf die OGT-Protein-Expression wurde 1 h, 1,5 h, 2 h und 6 h nach VEGF₁₂₁-Gabe untersucht. Nach 1 h wurde kein Effekt von VEGF₁₂₁ auf die OGT-Expression beobachtet. Nach 1,5 h war OGT bei einer Konzentration von 100 ng/ml VEGF₁₂₁ deutlich verringert. Nach 2 h war bei 100 ng/ml VEGF₁₂₁ kein OGT nachweisbar und bei 1 ng/ml VEGF₁₂₁ war eine Verminderung der OGT-Proteinmenge zu beobachten, die auch nach 6 h so bestehen blieb (Abb. 17, B).

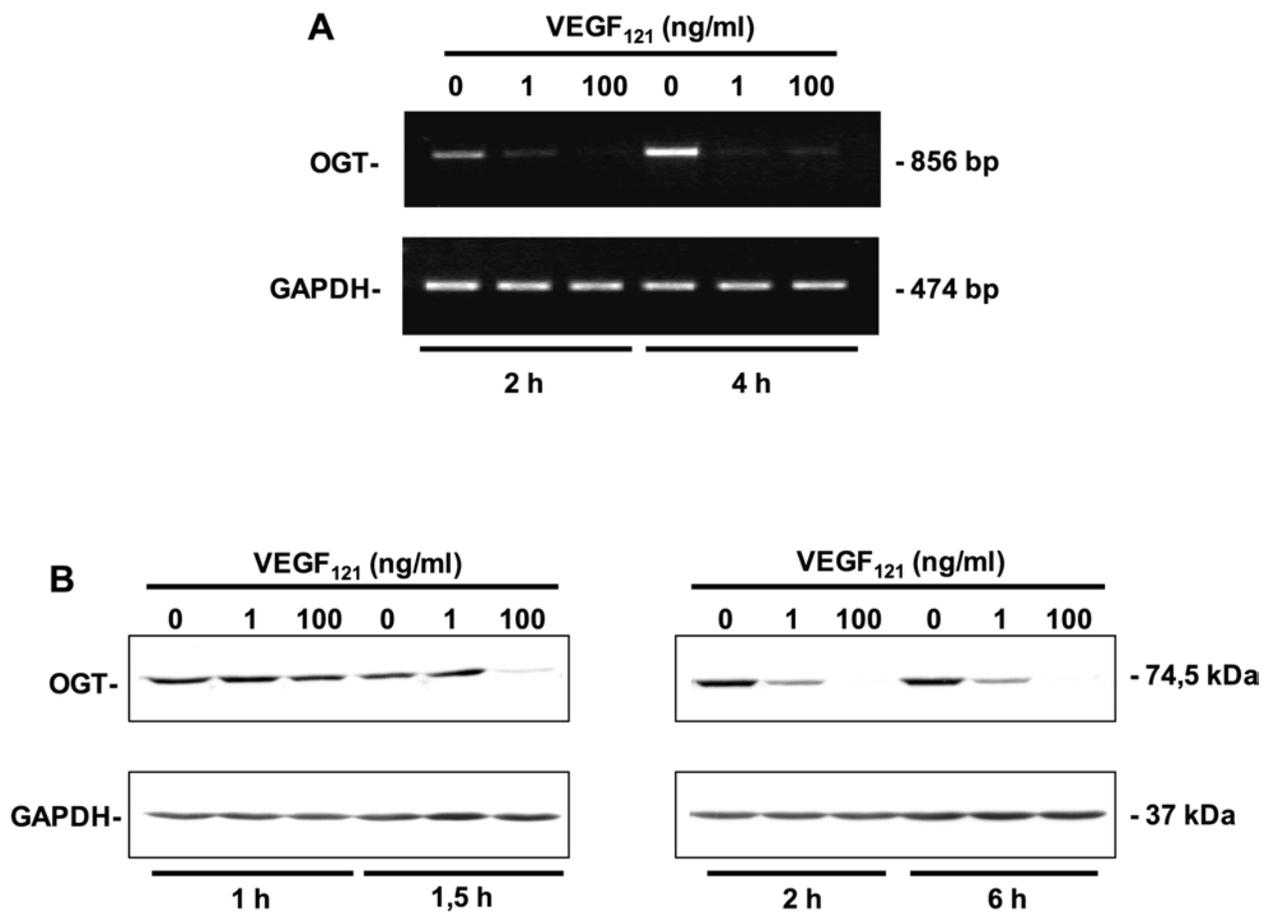


Abbildung 17: VEGF₁₂₁ hemmt die Expression von OGT mRNA und Protein. A: U937-Zellen wurden 2 h und 4 h mit je 1 ng/ml und 100 ng/ml VEGF₁₂₁ stimuliert und eine RT-PCR mit OGT-spezifischen und GAPDH-spezifischen Primern wurde durchgeführt. Sowohl nach 2 h als auch nach 4 h war die Expression der mRNA von OGT deutlich verringert. GAPDH-Amplifikate zeigten, dass gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden. **B:** U937-Zellen wurden mit 1 ng/ml und 100 ng/ml VEGF₁₂₁ über 1 h, 1,5 h, 2 h und 6 h stimuliert und die aus den Zellen gewonnenen Protein-Extrakte im *Western blot* analysiert. Nach 1,5 h war die OGT-Expression bei 100 ng/ml VEGF₁₂₁ deutlich verringert. Nach 2 h und nach 6 h war bei dem Ansatz mit 100 ng/ml VEGF₁₂₁ OGT nicht mehr sichtbar. Im Ansatz mit 1 ng/ml VEGF₁₂₁ war nur noch eine schwache Bande sichtbar. Färbung mit einem Antikörper gegen GAPDH zeigte, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren.

3.7.1.1.5. Die OGT-Expression in U937-Zellen wird selektiv durch HIV-1-Tat und VEGF₁₂₁ gehemmt

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob es sich bei der Hemmung der OGT-Expression um einen spezifischen Effekt von HIV-1-Tat und VEGF₁₂₁ handelte, oder ob auch andere Faktoren einen Einfluss auf die OGT-Expression haben. Dafür wurden verschiedene AIDS-assoziierte Faktoren (Abb. 18) ausgewählt, die über verschiedene Rezeptoren auf Monozyten wirken können. Eine *Western blot*-Analyse zeigte, dass TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-8 und SDF-1 α die Expression von OGT in U937-Zellen im Vergleich zur Referenz erhöhten und andere Faktoren wie IL-2, VEGF₁₆₅, MCP-1, bFGF, IP-10 und MIP-1 α keinen Einfluß auf die Expression von OGT hatten (Abb. 18). Alle Faktoren wurden in Konzentrationen eingesetzt, von denen in der Literatur eine Wirkung auf Monozyten in der Kultur dokumentiert ist (Abraham et al., 2002; Crow et al., 2001; Galboiz et al., 2002; Neumann et al., 1997; Wang et al., 2001; Wu et al., 2000; Zhang and Issekutz, 2002)

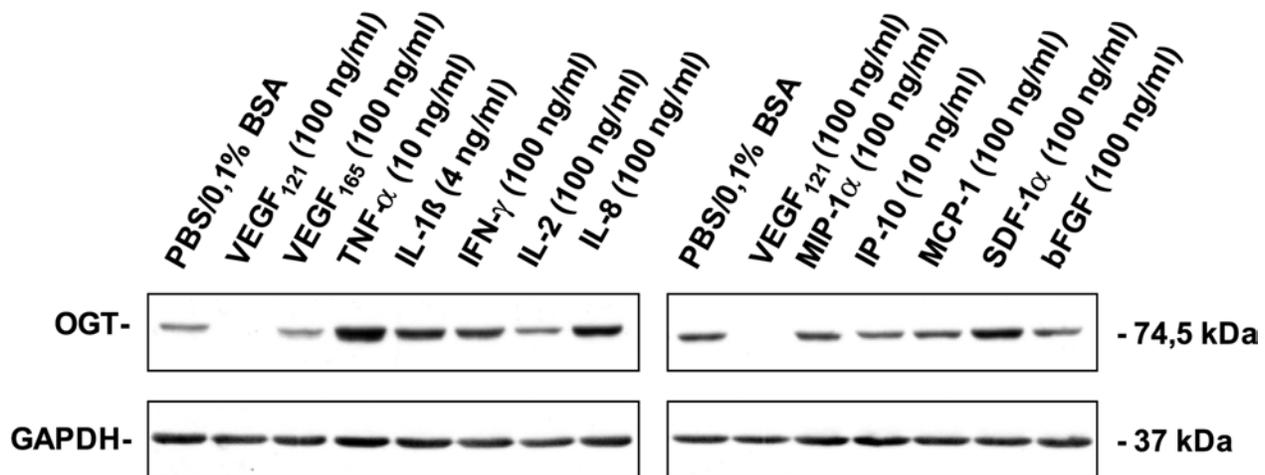


Abbildung 18: Die OGT-Expression wird selektiv durch HIV-1-Tat und VEGF₁₂₁ gehemmt. U937-Zellen wurden 4 h mit verschiedenen Faktoren in den angegebenen Konzentrationen stimuliert und die OGT-Expression mittels *Western blot* analysiert. TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-8 und SDF-1 α erhöhten die Expression von OGT; IL-2, VEGF₁₆₅, MCP-1, bFGF, IP-10 und MIP-1 α hatten keinen Einfluß auf die Expression. VEGF₁₂₁ hingegen hemmte die OGT-Expression. Eine Färbung mit einem Antikörper gegen GAPDH zeigte, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

3.7.1.1.6. Die Hemmung der OGT-Expression durch HIV-1-Tat wird über Flt-1 vermittelt

VEGF₁₂₁ und HIV-1-Tat hemmten beide die OGT-Expression. Flt-1 und Flk-1 sind zwei Rezeptoren, über die VEGF-A und HIV-1-Tat auf Zellen wirken können. HIV-1-Tat und VEGF-A können die Migration von Monozyten durch Bindung des Flt-1 Rezeptors aktivieren (Barleon et al., 1996; Clauss et al., 1996; Mitola et al., 1997) und die Migration von Endothelzellen über die Bindung an Flk-1 (Albini et al., 1996; Ganju et al., 1998). Es wurde daher untersucht, ob die Hemmung der OGT-Expression durch HIV-1-Tat über die VEGF-Rezeptoren Flt-1 oder Flk-1 vermittelt wurde. Um die Bioaktivität von Flt-1 und Flk-1 zu blockieren, wurden U937-Zellen 1 h vor der Stimulierung mit HIV-1-Tat mit spezifischen inhibitorischen Antikörpern gegen Flt-1 und Flk-1 inkubiert. In U937-Zellen, die mit dem Antikörper gegen Flt-1 vorinkubiert wurden, konnte der Effekt von HIV-1-Tat auf die OGT-Protein-Expression aufgehoben werden (Abb. 19). Im Gegensatz dazu konnte der Antikörper gegen Flk-1 die Hemmung der OGT-Expression nicht verhindern. Die Antikörper alleine hatten keinen Effekt auf die Expression von OGT (Abb. 19)

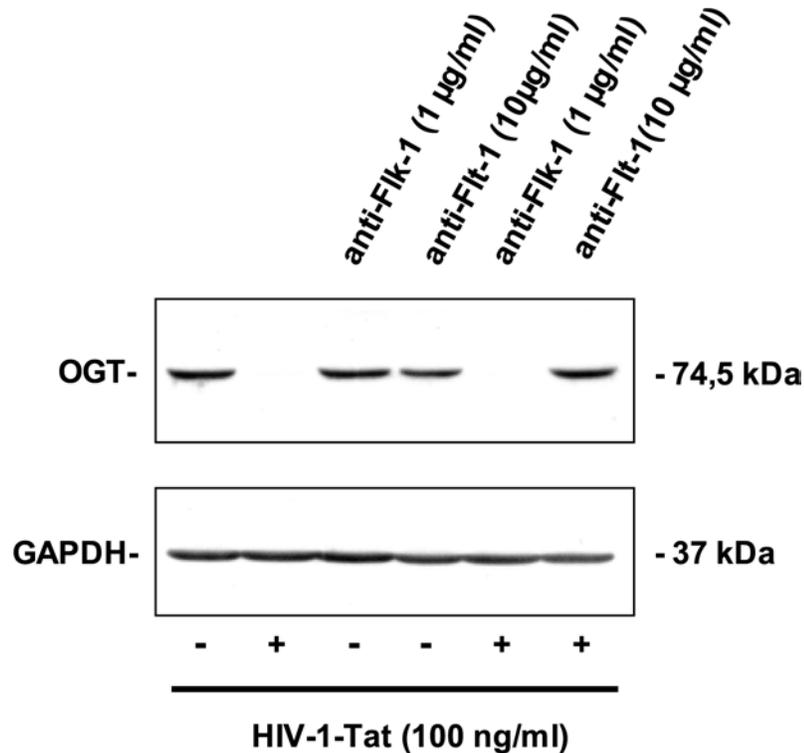


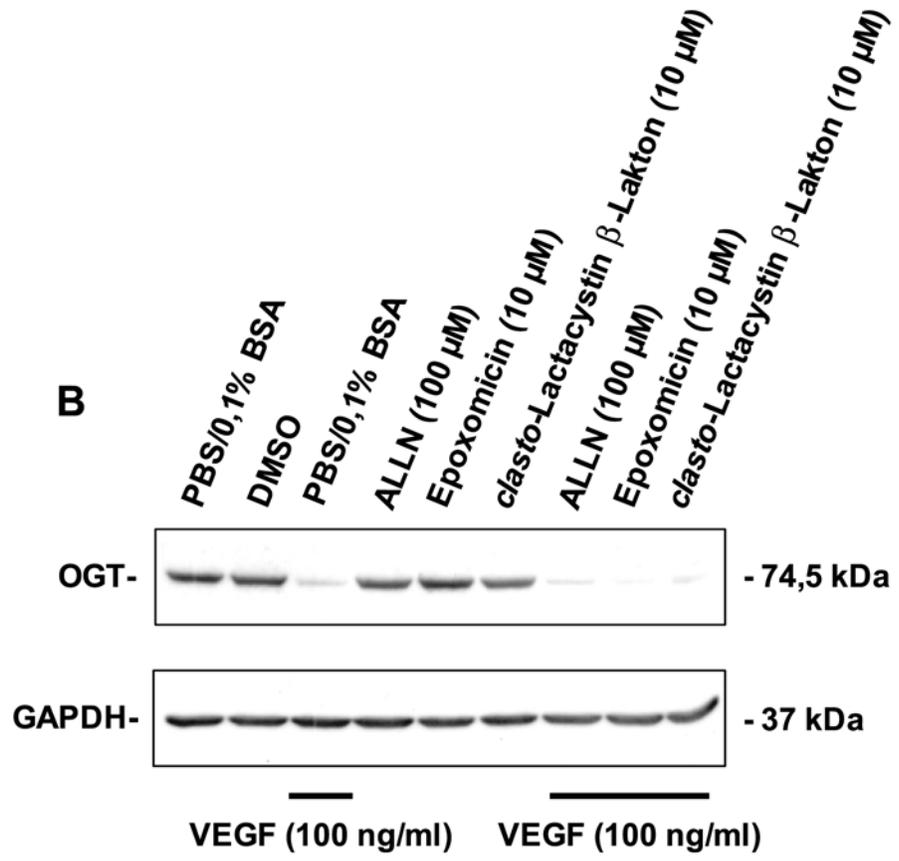
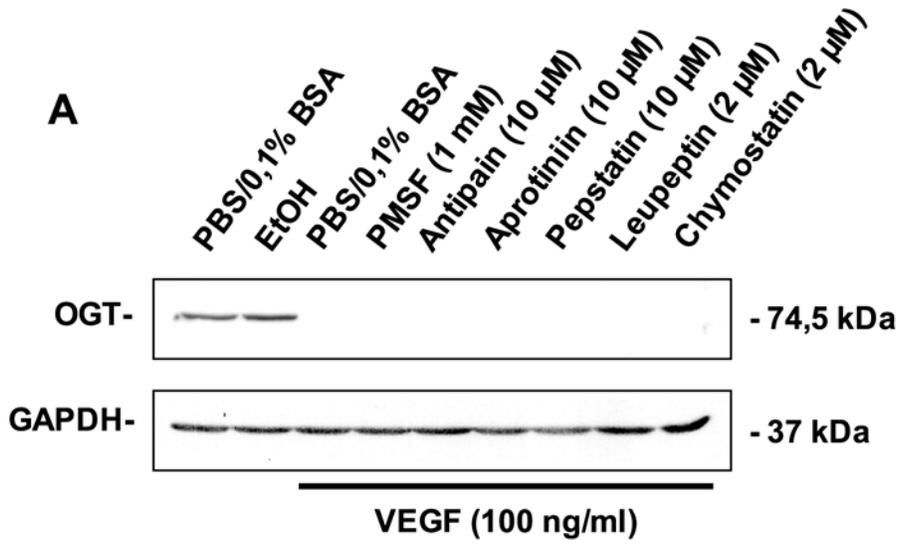
Abbildung 19: HIV-1-Tat hemmt die OGT-Expression über Flt-1. U937-Zellen wurden 1 h in Medium ohne Antikörper, mit anti-humanem Flk-1-Antikörper oder mit anti-humanem Flt-1-Antikörper in den angegebenen Konzentrationen und anschließend 3 h ohne oder mit HIV-1-Tat inkubiert. Anschließend wurde die OGT-Expression in den Zellen im *Western blot* analysiert. Durch Blockierung des Flt-1-Rezeptors konnte die Hemmung der OGT-Expression durch HIV-1-Tat verhindert werden. Im Gegensatz dazu konnte ein gegen humanes Flk-1 gerichteter Antikörper den hemmenden Effekt von HIV-1-Tat auf die OGT-Expression nicht verhindern. Die jeweiligen Antikörper hatten ohne HIV-1-Tat-Stimulierung keinen Effekt auf die OGT-Expression. Eine Färbung mit einem Antikörper gegen GAPDH zeigte, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren.

3.7.1.1.7. Die Abnahme des zellulären OGT-Proteins durch HIV-1-Tat wird nicht durch den Abbau im Proteasom bewirkt

Bereits 1,5 h nach HIV-1-Tat- bzw. VEGF₁₂₁-Behandlung nahm die Konzentration von OGT in U937-Zellen deutlich ab. Diese rasche Abnahme könnte auf proteolytische Degradation zurückzuführen sein, wie sie für Proteine, die am Signaltransduktionsweg beteiligt sind,

beschrieben ist (Hochstrasser, 1996; Tanaka, 1998). Daher wurde die Möglichkeit untersucht, ob die Stimulierung mit HIV-1-Tat oder VEGF₁₂₁ die proteolytische Spaltung von OGT induzieren könnte. Um den Abbau von OGT durch Proteasen zu untersuchen, wurden U937-Zellen 2 h mit verschiedenen Inhibitoren lysosomaler Proteasen in den angegebenen Konzentrationen und danach weitere 3 h mit VEGF₁₂₁ inkubiert (Abb. 20, A). Keiner der Proteaseinhibitoren hemmte die Abnahme von OGT-Protein (Abb. 20, A). Die Wirkkonzentrationen der Proteaseinhibitoren wurden der Literatur entnommen (Fujiwara et al., 2002; Grinde and Seglen, 1980; Nakhoul et al., 1998; Salcedo et al., 1997; Seelmeier et al., 1988). Inkubierte man die Zellen 1 h vor der Stimulierung mit VEGF₁₂₁ mit Proteasom-Inhibitoren in den üblichen Konzentrationen (Blagosklonny et al., 1999; Hwang et al., 2002; Jehn et al., 2002; Meng et al., 1999; Vrana and Grant, 2001), konnte die VEGF₁₂₁-induzierte Abnahme des OGT-Protein ebenfalls nicht gehemmt werden (Abb. 20, B).

Abbildung 20: Weder die Hemmung lysosomaler Proteasen noch die von Proteasen des Proteasoms kann den VEGF₁₂₁-induzierten Abbau des OGT-Proteins verhindern. A: U937-Zellen wurden 2 h mit verschiedenen Inhibitoren lysosomaler Proteasen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und anschließend 3 h mit 100 ng/ml VEGF₁₂₁ stimuliert. Da die Protease-Inhibitoren in Ethanol gelöst wurden, wurde als Kontrolle das höchste Volumen an Ethanol, das zur Stimulierung verwendet wurde, zum Medium gegeben. Das OGT-Protein wurde im *Western blot* nachgewiesen. Keiner der Proteaseinhibitoren konnte den VEGF₁₂₁-induzierten Abbau von OGT verhindern. B: 1 h vor Stimulierung der U937-Zellen mit 100 ng/ml VEGF₁₂₁ für 3 h wurden die Zellen mit jeweils 100 µM N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO (ALLN), 10 µM Epoxomicin und 10 µM *clasto*-Lactacystin β-Lakton inkubiert. Die verwendeten Proteasominhibitoren wurden in DMSO gelöst. Daher wurde als Kontrolle das größte Volumen an DMSO, das zur Stimulierung verwendet wurde, zum Medium gegeben. Anschließend wurde der Nachweis von OGT mittels *Western blot*-Analyse durchgeführt. Keiner der Proteasom-Inhibitoren hatte einen Einfluss auf die Expression von OGT. Eine Färbung mit einem Antikörper gegen GAPDH zeigte, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.



3.7.1.1.8. Untersuchung des Effekts von HIV-1-Tat auf die OGT-Expression in PBMZ

Als Nächstes wurde der Einfluss von HIV-1-Tat auf die OGT-Expression in primären Zellen untersucht. Frisch isolierte PBMZ fünf verschiedener Probanden wurden 3 h mit HIV-1-Tat stimuliert und sowohl die mRNA-Expression mit RT-PCR als auch die Protein-Expression von OGT im *Western blot* untersucht.

In PBMZ wurde die OGT-mRNA-Expression durch HIV-1-Tat auf unterschiedliche Weise beeinflusst. Beim Probanden 1 wurde keine Veränderung der OGT-Expression durch HIV-1-Tat festgestellt (Abb. 21). Bei den Probanden 2 und 3 hingegen war eine erhöhte und bei den Probanden 4 und 5, wie in U937-Zellen, eine verminderte Expression der OGT-mRNA zu beobachten (Abb. 21, A).

Die Ergebnisse der RNA-Expressionsanalyse konnten im *Western blot* auf Protein-Ebene bestätigt werden. Bei dem Probanden 1 war keine signifikante Veränderung der OGT-Expression durch HIV-1-Tat zu beobachten (Abb. 21, B und C). Bei den PBMZ des Probanden 2 stieg die Expression nach Inkubation mit HIV-1-Tat auf 214% und bei dem Probanden 3 auf 159%. Hingegen war die OGT-Expression in HIV-1-Tat-stimulierten PBMZ bei dem Probanden 4 auf 41% und bei dem Probanden 5 auf 13% verringert (Abb. 21, B und C). Die Probandenspezifischen Reaktionen der OGT-Expression auf die Stimulierung mit HIV-1-Tat konnte jeweils in drei unabhängigen Versuchen bestätigt werden.

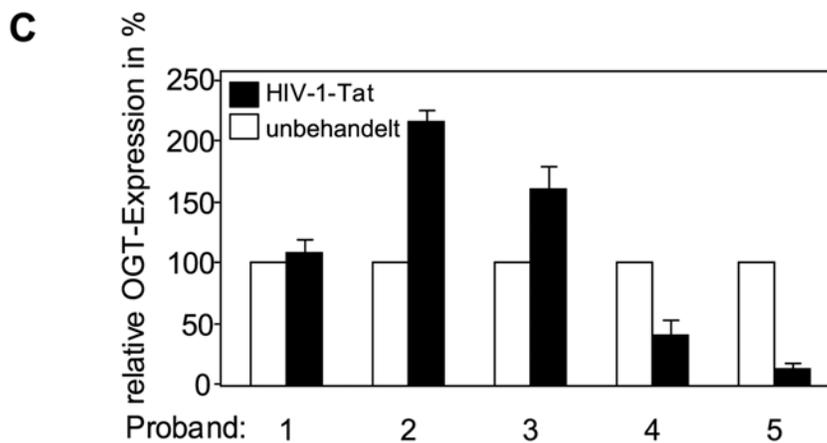
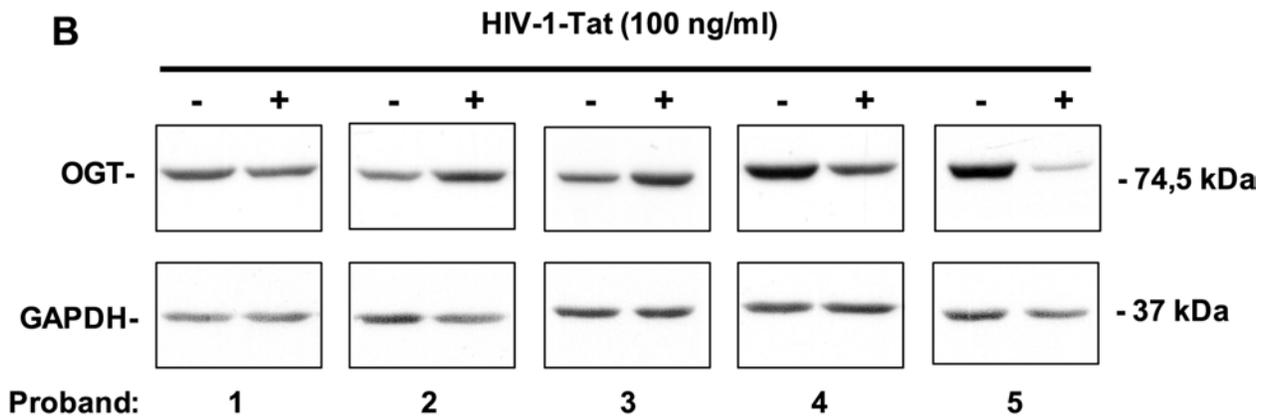
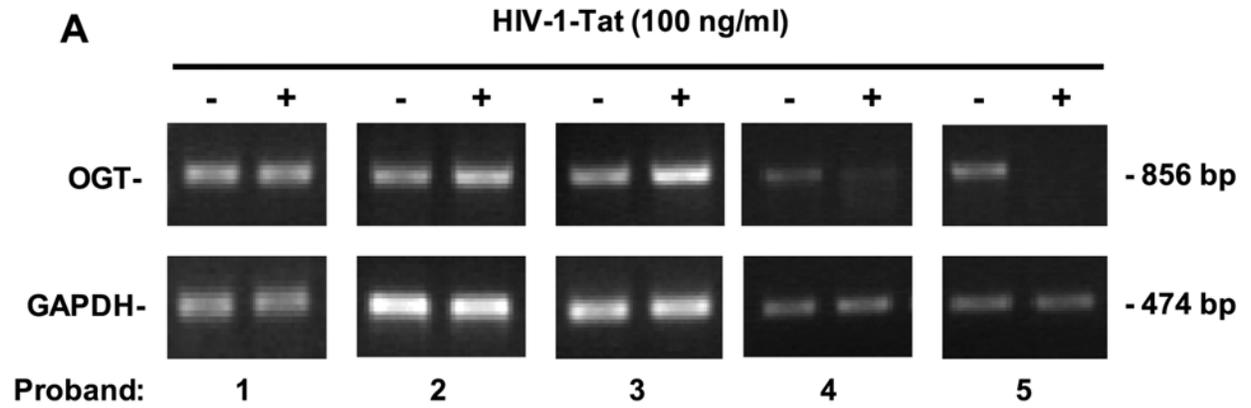


Abbildung 21: Unterschiedliche Regulierung der mRNA- und Protein-Expression von OGT durch HIV-1-Tat in PBMZ verschiedener Probanden. RT-PCR-Analyse: A: Frisch isolierte PBMZ verschiedener gesunder Probanden wurden 3 h ohne oder mit 100 ng/ml HIV-1-Tat inkubiert und OGT und GAPDH mit spezifischen Primern durch RT-PCR nachgewiesen. Bei den Probanden 2 und 3 war die OGT-Expression nach HIV-1-Tat-Stimulation erhöht, bei den Probanden 4 und 5 dagegen verringert. Auf die OGT-Expression in den PBMZ des Probanden 1 hatte HIV-1-Tat keinen Einfluss. **Western blot-Analyse (B, C): B:** Frisch isolierte PBMZ verschiedener gesunder Probanden wurden 4 h entweder ohne (Referenz) oder mit 100 ng/ml HIV-1-Tat inkubiert. Die Expression von OGT war bei Proband 2 auf 214% und bei Proband 3 auf 159% erhöht, während sie bei Proband 4 auf 41% und bei Proband 5 auf 13% erniedrigt war. Auf die OGT-Expression in den PBMZ des Probanden 1 hatte HIV-1-Tat keinen wesentlichen Einfluss. Eine Färbung mit einem Antikörper gegen GAPDH zeigte, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. **C:** Darstellung der relativen OGT-Expression in %. Da für jede Bestimmung der jeweilige Referenzwert gleich 100% gesetzt wurde, wurde dafür keine Standardabweichung ermittelt. Dargestellt ist die durchschnittliche OGT-Expression aus drei unabhängigen Versuchen.

3.8. Zusammenfassung des Kapitels 3.7.: Identifizierung eines HIV-1-Tat-regulierten Gens in Monozyten

Mit der SSH-Methode wurde OGT als HIV-1-Tat-reprimiertes Gen in U937-Zellen identifiziert. In der *Northern blot*-Analyse und RT-PCR wurde gezeigt, dass HIV-1-Tat die Expression von OGT-mRNA in diesen Zellen verringerte. Die Repression von OGT wurde auf Protein-Ebene bestätigt und konnte auch durch physiologische Konzentrationen (Kap.: 2.5.2.) an HIV-1-Tat induziert werden. Ebenso wie durch HIV-1-Tat wurde die Expression von OGT auch durch VEGF₁₂₁ verringert. Die Hemmung der OGT-Expression wurde selektiv durch HIV-1-Tat und VEGF₁₂₁ bedingt, jedoch nicht durch andere Wachstumsfaktoren, IZ und Chemokine. Die Hemmung der OGT-Expression durch HIV-1-Tat wurde über Flt-1 vermittelt. Die schnelle Abnahme der Proteinkonzentration von OGT war weder auf lysosomale Proteasen noch auf einen Abbau im Proteasom zurückzuführen. Untersuchungen der OGT-Expression in PBMZ zeigten, dass die Expression von OGT durch HIV-1-Tat bei verschiedenen Probanden unterschiedlich reguliert wurde.

OGT ist unter anderem ein ubiquitärer Regulator der Transkription und hemmt die SP-1-aktivierte Transkription (Yang et al., 2002). Die Hemmung der OGT-Expression könnte ein möglicher Grund dafür sein, dass zahlreiche Gene durch HIV-1-Tat induziert werden. Es ist zu untersuchen, ob die Person-spezifische Antwort der OGT-Expression auf die HIV-1-Tat-Wirkung kennzeichnend für einen unterschiedlichen klinischen Verlauf der AIDS-Erkrankung in HIV-1-infizierten Personen ist. Darüber hinaus werden zahlreiche Proteine, die an den unterschiedlichsten zellulären Prozessen beteiligt sind, durch OGT modifiziert (Hanover et al., 2001). Die verminderte Expression von OGT kann daher diese Prozesse beeinflussen und zu Funktionsstörungen in der Zelle führen.

4. Diskussion

In klinischen, serologischen und pathomorphologischen Untersuchungen wurden bei HIV-1-Infizierten krankhafte Veränderungen des Gefäßsystems festgestellt, die mit einer verstärkten Extravasation von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen einhergehen. Spezifisch sind hierbei zu nennen: (1) Schädigungen des Aortenendothels mit einer erhöhten Adhäsion mononukleärer Zellen (Zietz et al., 1996), (2) Defekte der Blut-Hirn-Schranke, die mit einer Infiltration von Monozyten/Makrophagen in das Gehirn einhergehen (Nottet and Gendelman, 1995a; Petito and Roberts, 1995) und (3) das Kaposi-Sarkom, das unter anderem durch zahlreiche infiltrierende Monozyten und T-Zellen charakterisiert ist (Stürzl et al., 2001).

Durch die Behandlung von HIV-1-infizierten Patienten mit der seit einiger Zeit verfügbaren hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) konnte deren Lebenserwartung trotz des Auftretens von Nebenwirkungen wie Dyslipidämie und Diabetes deutlich erhöht werden (Medrano et al., 1998; Passalaris et al., 2000; Powderly, 2002). Schon in der Ära vor der HAART-Therapie wurden bei 45% - 66% der AIDS-Patienten koronare Herzkrankheiten nachgewiesen (DeCastro et al., 1992); bei infizierten, mit HAART therapierten Patienten stieg bei den infizierten Patienten die Häufigkeit von Gefäßerkrankungen aber noch weiter an. Dieser Effekt ist hauptsächlich auf die HIV-1-Infektion zurückzuführen (Neumann et al., 2002). Opportunistische Infektionen, ein letztlich verlängerter Krankheitsverlauf und Nebenwirkungen von HAART wirken sich verstärkend aus (Neumann et al., 2002; Passalaris et al., 2000).

Es wird diskutiert, dass als mögliche Auslöser dieser Gefäßveränderungen das bei HIV-1-Infizierten veränderte Zytokinmilieu (Caruso et al., 1990; Lepe-Zuniga et al., 1987), vor allem eine erhöhte Konzentration an TNF- α (Kobayashi et al., 1990; Lahdevirta et al., 1988), eine Rolle spielen könnten. Darüber hinaus wird das HIV-1-kodierte Tat-Protein als möglicher Pathogenesefaktor im Rahmen der AIDS-assoziierten Vaskulopathie diskutiert. HIV-1-Tat kann im Serum von HIV-1-infizierten Patienten in Konzentrationen zwischen 1 ng/ml und 40 ng/ml nachgewiesen werden (Westendorp et al., 1995; Xiao et al., 2000) und parakrin auf infizierte und auf nicht-infizierte Zellen wirken (Chang et al., 1997; Ensoli et al., 1993). Im Mittelpunkt meines Interesses stand die adhäsionsfördernde Wirkung von HIV-1-Tat auf Leukozyten an Endothelzellen, da bei allen Ausprägungsformen der AIDS-assoziierten Vaskulopathie *in vivo* eine verstärkte Anlagerung von mononukleären Zellen an das Endothel nachgewiesen wurde (Geier et al., 1994; Petito and Roberts, 1995; Zietz et al., 1996).

4.1. Beeinflussung der Adhäsionsfähigkeit von Leukozyten an Endothelzellen durch HIV-1-Tat und TNF- α

Es war bekannt, dass Monozyten an TNF- α -stimulierte Endothelzellen verstärkt adhären und dass eine zusätzliche Stimulierung der Monozyten mit HIV-1-Tat deren Anlagerung weiter erhöht (Lafrenie et al., 1996a).

In dieser Arbeit wurde die adhäsionsfördernde Wirkung von HIV-1-Tat im Zusammenspiel mit dem IZ TNF- α weiter untersucht. PBMZ bestehen zu 90% aus Lymphozyten, die sich vorwiegend in lymphatischen Organen und Geweben aufhalten. Hier sollten diese Zellen aufgrund der hohen Anzahl an infizierten Zellen der höchsten Konzentration an HIV-1-Tat ausgesetzt sein. TNF- α zirkuliert im Blut und sollte vorwiegend auf Endothelzellen einwirken. Daher wurde in den Versuchen die PBMZ und U937-Zellen mit HIV-1-Tat stimuliert und die HMVEZ mit TNF- α . Es wurde bestätigt, dass HIV-1-Tat und TNF- α synergistisch die Adhäsion von sowohl U937-Zellen, als auch PBMZ an Endothelzellen erhöhten. Dabei wirkte HIV-1-Tat spezifisch auf die Adhäsionskompetenz von Monozyten und T-Zellen, aber nicht auf B-Zellen. Mittels Intravital-Mikroskopie konnte eine synergistische Wirkungsweise beider Faktoren auf die Adhäsion von Leukozyten *in vivo* bestätigt werden. Die Induktion der Adhäsion von U937-Zellen und PBMZ wurde nur durch HIV-1-Tat, aber nicht durch zwei weitere viruskodierte Proteine, gp41 und HIV-1-Nef, vermittelt. Das hier verwendete rekombinante gp41 und HIV-1-Nef induzierte aber in U373-Zellen die Synthese des Komplement-Faktors C3 (Speth et al., 2002), was ein Hinweis darauf ist, dass beide Proteine biologisch aktiv waren.

Zum Stimulieren von Zellen wurde HIV-1-Tat von unterschiedlichen Arbeitsgruppen als Protein mit einer Länge von 72 As (Mitola et al., 2000), 86 As (Ensoli et al., 1990) und 101 As (Albini et al., 1995) benutzt. Neben rekombinanten Protein wird auch synthetisch hergestelltes Protein verwendet. Hierbei wurden unterschiedliche Ergebnisse bei Untersuchungen der gleichen Fragestellung erhalten, was unter anderem auf die unterschiedlichen Arten und Herstellungsweisen und dem daraus resultierenden Reinheitsgrad der jeweils verwendeten Tat-Proteine zurückzuführen sein könnte (Gibellini et al., 1995; McCloskey et al., 1997; Sastry et al., 1996; Westendorp et al., 1995). Bei dem hier verwendeten HIV-1-Tat handelte es sich um ein 86 As langes, rekombinantes HIV-1-Tat, das nach *good laboratory practice* (GLP)-Regeln isoliert worden ist. Es entspricht dem HIV-1-Tat des HIV-1-Stamm IIIB-BH-10 (Subtyp B). Die hier verwendeten Protein-Präparationen waren einerseits in der Lage die Replikation eines Tat-negativen HIV-1-Isolats zu induzieren und andererseits im Chloramphenikolacetyltransferase

(CAT)-Transaktivierungsversuch der LTR-Aktivität biologisch aktiv. Der Endotoxingehalt lag unter der Nachweisgrenze (Fanales-Belasio et al., 2002). Dieses HIV-1-Tat-Protein wurde bereits mehrfach erfolgreich verwendet. So wurde gezeigt, dass dieses HIV-1-Tat von Makrophagen aufgenommen wird und die Expression von TNF- α und β -Chemokinen induziert (Fanales-Belasio et al., 2002). Außerdem stimulierte es die Proliferation und Migration von Endothelzellen und KS-Zellen durch Bindung an die Integrine VLA-5 und $\alpha_v\beta_3$ (Barillari et al., 1993; Barillari et al., 1999a).

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse lassen sich Rückschlüsse auf einen möglichen Mechanismus der TNF- α - und HIV-1-Tat-induzierten Adhäsion durchführen. Die Stimulierung von PBMZ mit HIV-1-Tat erhöhte spezifisch die Adhäsion von Monozyten und T-Zellen an TNF- α -stimulierte HMVEZ, aber nicht von B-Zellen. Der Mechanismus der verstärkten Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen könnte sein, dass TNF- α auf Endothelzellen die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 (Dhawan et al., 1997; Haraldsen et al., 1996; Kalogeris et al., 1999; Pober and Cotran, 1991) induziert. Es wurde gezeigt, dass HIV-1-Tat in Monozyten die Expression von β_2 -Integrinen induzieren kann (Lafrenie et al., 1996a), welche wiederum Liganden von ICAM-1 sind. Durch die erhöhte Expression dieser beiden wichtigen Bindungspartner, die an der starken Adhäsion beteiligt sind, könnte die Anlagerung von Monozyten an Endothelzellen verstärkt werden. Der oben beschriebene Adhäsionsmechanismus über ICAM-1 und β_2 -Integrine kann jedoch nicht erklären, warum durch die Stimulierung von PBMZ mit HIV-1-Tat insbesondere die Anlagerung von T-Zellen und Monozyten aber nicht von B-Zellen verstärkt wurde. B-Zellen lassen sich grundsätzlich mit HIV-1-Tat stimulieren. So wurde gezeigt, dass durch Stimulierung mit HIV-1-Tat die Proliferation von B-Zellen gehemmt wird (Lefevre et al., 1999), die bcl-2-Expression herunterreguliert wird (Sasstry et al., 1996) und die Expression von Fas erhöht ist (Huang et al., 1997). Ein Faktor könnte aber sein, dass, im Gegensatz zu Monozyten, T-Zellen und B-Zellen Mac-1 und p150 nicht exprimieren (Kevil and Bullard, 1999). Eine erhöhte Anzahl an adhärierenden Monozyten könnte durch erhöhte Bindungskapazitäten von Mac-1 und p150 an ICAM-1 erklärt werden. Ein weiterer möglicher Mechanismus wäre, dass aktivierte T-Zellen, im Vergleich zu B-Zellen, verstärkt L-Selektin exprimieren (Tang et al., 1998) und so vermehrt an den Liganden von L-Selektin [CD34 und *glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1* (GLYCAM-1)] auf den Endothelzellen binden. Im Gegensatz dazu exprimieren B-Zellen *P-selectin glycoprotein-1* (PSGL-1) und binden darüber an P-Selektin aber nicht an E-Selektin (Lenter et al., 1994; Yago et al., 1997). Es ist beschrieben, dass P-Selektin wiederum nicht generell auf TNF- α -stimulierten

Endothelzellen exprimiert wird, bzw. nach zwei Stunden wieder herunter reguliert wird (Boyce et al., 2002; Ley et al., 1995). Die erhöhte Anzahl an adhärenenten T-Zellen könnte somit durch eine erhöhte Bindung über L-Selektine erklärt werden.

Gegenwärtig dominiert die Hypothese, dass die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen bei Monozyten durch HIV-1-Tat weitgehend indirekt durch eine gesteigerte Expression von IZ vermittelt wird (Lafrenie et al., 1997). Neben HIV-1-Tat erhöhten jedoch auch gp41 und HIV-1-Nef durch externe Zugabe die Expression von IZ in Leukozyten (Lafrenie et al., 1997; Merrill et al., 1989; Olivetta et al., 2003; Quaranta et al., 1999; Tyring et al., 1991). Im Gegensatz zu HIV-1-Tat erhöhten die beiden anderen HIV-1-assoziierten Proteine unter den genannten Versuchsbedingungen allerdings nicht die Adhäsion von U937-Zellen und PBMZ an Endothelzellen. Es ist daher wahrscheinlich, dass der Effekt von HIV-1-Tat auf die Adhäsionskompetenz nicht ausschließlich auf einer HIV-1-Tat-bedingten Induktion von IZ beruht, sondern auf einen direkten Effekt von HIV-1-Tat auf die Expression von Adhäsionsmolekülen zurückzuführen sein könnte.

Die hier vorgestellte *in vivo*-Studie bei Mäusen zeigte, dass TNF- α und HIV-1-Tat jeweils das Rollen von Leukozyten am Endothel induzieren. In der frühen Phase der TNF- α -Antwort (2 h) wird das Rollen der Leukozyten hauptsächlich durch P-Selektin vermittelt, während in der späteren Phase L-Selektin und E-Selektin diese Rolle übernehmen (Kunkel and Ley, 1996; Ley et al., 1995). Neben einer erhöhten Anzahl rollender Zellen konnte unter dem Einfluss von HIV-1-Tat aber auch eine erhöhte Adhäsion beobachtet werden. Der Effekt auf die Adhäsion verstärkte sich dramatisch durch gleichzeitige Injektion von TNF- α und HIV-1-Tat. Es wurde damit auch *in vivo* ein synergistischer Effekt von HIV-1-Tat und TNF- α auf die Adhäsion von Leukozyten nachgewiesen. In diesem Versuch ist zusätzlich zu berücksichtigen, dass wie bei HIV-1-infizierten Personen, sowohl HIV-1-Tat als auch TNF- α gleichzeitig auf Leukozyten und Endothelzellen wirken konnten und somit beide Faktoren die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den jeweiligen Zellen erhöhen könnten. Es ist ausserdem zu berücksichtigen, dass das HIV-1-Tat die TNF- α -Expression und –Sekretion induziert (Lafrenie et al., 1997) und dieses zusätzlich die Adhäsionskompetenz von Endothelzellen erhöhen kann. In künftigen Experimenten soll daher vor und nach Stimulierung mit HIV-1-Tat die TNF- α -Konzentration im Serum der Maus bestimmt werden, um weitere Aussagen über einen möglichen synergistischen Effekt machen zu können. Zudem soll mittels immunhistochemischer Färbungen die Expression von Adhäsionsmolekülen untersucht werden, um das Spektrum der

exprimierten Adäsionsmoleküle auf jeder Zellart zu erhalten. Danach soll der Adhäsionsmechanismus näher untersucht werden.

Es wurde gezeigt, dass HIV-1-Tat bei Mäusen biologisch aktiv ist. Bei HIV-1-Tat exprimierenden transgenen Mäusen entwickelten sich unter anderem KS-ähnliche Tumoren (Corallini et al., 1993; Vogel et al., 1988) und bei Mäusen, denen man HIV-1-Tat in Kombination mit IZ oder bFGF injizierte, entwickelten sich vaskuläre Läsionen (Albini et al., 1994; Barillari et al., 1999; Ensoli et al., 1994a; Fiorelli et al., 1998). Bei den *in vivo*-Versuchen wurde mit 20 µg pro Maus eine im Vergleich zu 100 ng/ml in den *in vitro*-Versuchen hohe Konzentration an HIV-1-Tat eingesetzt. Bei der Auswahl der HIV-1-Tat-Konzentration für den *in vivo*-Versuch mussten zwei Punkte berücksichtigt werden, die die effektive Konzentration vom zirkulierenden HIV-1-Tat reduzieren: Erstens bindet HIV-1-Tat über seine basische Sequenz schnell und effektiv an Heparansulfat-Proteoglykane auf der Zelloberfläche und an die extrazelluläre Matrix (Chang et al., 1997). Zweitens verteilt sich HIV-1-Tat vier Stunden nach der Injektion in alle Organe und wird dort von den Zellen aufgenommen (Schwarze et al., 1999).

Im Gegensatz zu HIV-1-Tat wurde HIV-1 bei Läsionen von AIDS-KS nur in seltenen Fällen nachgewiesen (Ensoli et al., 1994a; Mahoney et al., 1991; Stürzl et al., 1992). Daraus lässt sich schließen, dass HIV-1 über einen parakrinen Effekt von sezernierten IZ und HIV-1-Tat, durch infiltrierte Monozyten und T-Zellen, seine Wirkung ausübt. Frühe Stadien der KS-Läsionen sind charakterisiert durch einen inflammatorischen Prozess (Ensoli and Stürzl, 1998; Stürzl et al., 2001) mit Infiltration von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen, während B-Zellen nur selten oder gar nicht vorkommen (Beral et al., 1990; Fiorelli et al., 1998; MacPhail et al., 1996; Nickoloff and Griffiths, 1989; Regezi et al., 1993; Tabata et al., 1993; Uccini et al., 1997). Am Mausmodell wurde gezeigt, dass HIV-1-Tat die Ausbildung von KS-ähnlichen Läsionen unabhängig von einer HIV-1-Infektion induziert (Albini et al., 1994; Ensoli et al., 1994a). IZ wiederum lösen die lytische Aktivierung von HHV-8 in mononukleären Zellen aus (Monini et al., 1999) und führen somit zu einer höheren Viruslast. HHV-8 ist bei allen KS-Läsionen nachweisbar und somit scheint es ein notwendiges Agens für die KS-Entwicklung zu sein. Zahlreiche *in situ*-Untersuchungen belegen, dass HHV-8 wahrscheinlich von infiltrierten Monozyten und T-Zellen in die KS-Läsionen eingeschleust wird (Monini et al., 1999; Stürzl and Ensoli, 1999; Stürzl et al., 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Hinweis darauf, dass die erhöhte Anzahl an Monozyten und T-Zellen im Vergleich zu B-Zellen im KS-Gewebe auf eine selektive Induktion der Adhäsionskompetenz von Monozyten und T-Zellen durch HIV-1-Tat zurückzuführen sein könnte. Das Zusammenwirken von TNF- α und HIV-1-Tat könnte dazu

beitragen, dass AIDS-Patienten einem 20.000-fach erhöhtem Risiko ausgesetzt sind, an KS zu erkranken (Beral et al., 1990). Das Zusammenwirken von HIV-1-Tat und TNF- α könnte auch auf andere, bei AIDS auftretende, vaskuläre Defekte einen Einfluss haben, die mit einer erhöhten Adhäsion und ihrer Invasion ins Gewebe einhergehen.

4.2. Wirkung des HIV-1-Tat-Proteins auf die Genexpression in Monozyten

HIV-1-Tat kann in verschiedenen Zellen eine große Anzahl an Genen induzieren. Beispielsweise wurde für Monozyten gezeigt, dass exogenes HIV-1-Tat die Expression von TNF- α , CCR5, CXCR4, IL-1 β , IL-8, β_2 -Integrine und MMP-9 (Gibellini et al., 1994; Huang et al., 1998; Lafrenie et al., 1996a; Lafrenie et al., 1997; Weiss et al., 1999) erhöhen und die Expression von IL-12 hemmen kann (Ito et al., 1998). Diese breite Wirkung von HIV-1-Tat auf die Gen-Expression legt nahe, dass das HIV-1-Tat über die Regulierung von Signaltransduktionsmolekülen verschiedene Gene moduliert. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde ein neuer Ansatz gewählt, mit dem die Identifizierung HIV-1-Tat-regulierter Signaltransduktionsmoleküle unterstützt wird. Bei der Auswahl des geeigneten Versuchansatzes wurden folgende Überlegungen miteinbezogen: (1) Moleküle von Signaltransduktionswegen reagieren sehr schnell auf einen Stimulus und (2) die Hemmung der Expression eines Repressors der Signaltransduktion durch HIV-1-Tat könnte das gleichzeitige Anschalten der Expression mehrerer nachgeordneter Gene oder die Aktivierung nachfolgender Moleküle bewirken. Aus diesen Gründen wurde mit der SSH nach Genen gesucht, deren Expression kurz nach Zugabe von HIV-1-Tat (3 h) reprimiert wird.

Ein Gen, das durch HIV-1-Tat in U937-Zellen sowohl auf RNA-Ebene, als auch auf Protein-Ebene reprimiert wurde, war *OGT*. *OGT* ist in der Evolution hoch konserviert und kodiert für ein Protein, das ubiquitär exprimiert wird (Lubas et al., 1997). *OGT* ist ein Enzym, das die Glykosylierung von Serin- und Threoninresten mit N-Acetylglukosamin katalysiert. Dieser Prozess wird O-Glukosamin-N-Acetylierung genannt und wurde bei vielen Proteinen im Zytosol und im Zellkern beobachtet (Hanover, 2001). Zu diesen Proteinen gehören zentrale regulatorische Moleküle wie SP-1, RNA-Polymerase II, p53, Rb und Tau (Abb. 22). Sie sind an unterschiedlichen zellulären Prozessen, wie zum Beispiel Zellteilung, Apoptose, Transkription und Translation, beteiligt (Hanover, 2001). Welche Funktion diese Modifikationen haben, ist bisher weitgehend ungeklärt, es konnte jedoch interessanterweise unter anderem eine hemmende Wirkung von *OGT* auf die SP-1-aktivierte Transkription nachgewiesen werden (Yang et al., 2002).

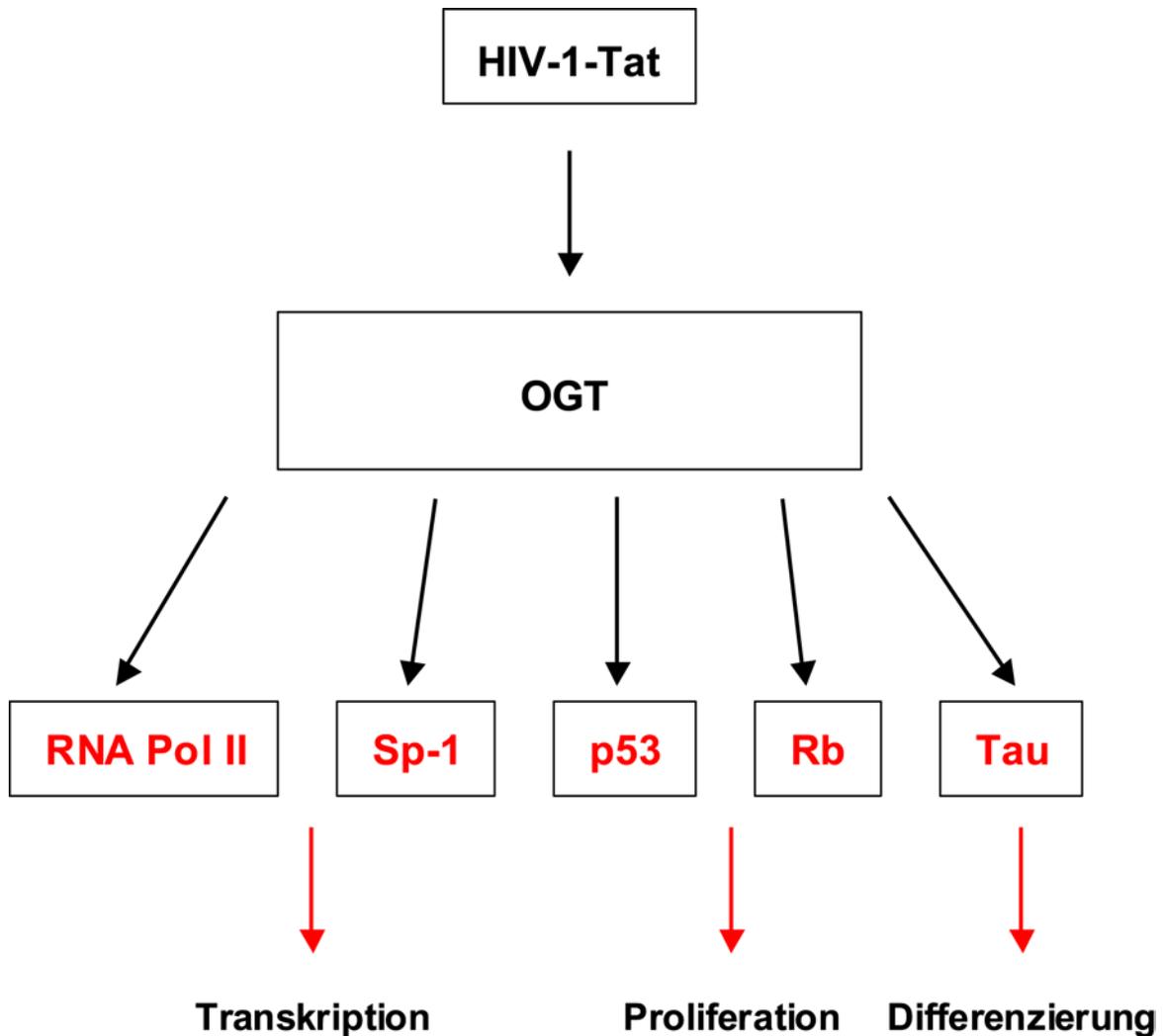


Abbildung 22.: Wichtige zelluläre Substrate für OGT. Beispiele für zelluläre Substrate, deren Funktion durch die Modifizierung durch OGT reguliert ist. Durch Repression von OGT durch HIV-1-Tat wird ihr Glykosylierungsstatus und damit ihre Funktion in Bezug auf Transkription bzw. Zell-Proliferation und –Differenzierung beeinflusst.

Erst kürzlich wurde die Expression von OGT-Protein in HeLa-Zellen und humanen Aortenendothelzellen (HAEZ) mit Antikörpern gegen das humane OGT nachgewiesen. Sowohl in HeLa-Zellen als auch in HAEZ wurden drei OGT-Peptidketten mit einer Größe von 116 kDa, 103 kDa und 74,5 kDa nachgewiesen (Hanover et al., 2003). Da während der Zeit, in der die OGT-Protein-Expressionsstudien in U937-Zellen durchgeführt wurden, die Antikörper gegen das humane OGT noch nicht zur Verfügung standen, wurde in dieser Arbeit ein polyklonaler Antikörper gegen das OGT aus der Ratte verwendet. Die Homologie von humanen- und Ratten-

OGT beträgt über 80 % (Hanover et al. 2003). In der Ratte tritt das OGT-Protein in verschiedenen Formen auf, wobei die beiden häufigsten eine Größe von 110 kDa und 78 kDa haben (Kreppel et al., 1997). In verschiedenen Geweben der Ratte wurde aber nur eine Form des OGT nachgewiesen. Im Herzen zum Beispiel wird nur die 110 kDa und in der Niere nur die 78 kDa Form von OGT exprimiert. Andererseits wurde in der Leber und im Muskel zusätzlich zu der 110 kDa großen und der 78 kDa großen Form weitere Formen nachgewiesen (Kreppel et al., 1997). Der hier verwendete Antikörper bindet im Western blot beide Formen von OGT aus Rattengewebe (Kreppel et al., 1997), was hier auch bestätigt wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Mit diesem Antikörper konnte im *Western blot* in U937-Zellen und in HUVEC (Ergebnisse nicht gezeigt) nur die 74,5 kDa Form von OGT nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass in diesen menschlichen Zellen tatsächlich nur diese Form des Proteins gebildet wird. Eine andere Möglichkeit ist die, dass der verwendete Antikörper die menschlichen 116 kDa- und 103 kDa-Formen von OGT nicht erkennt.

In Anwesenheit von sehr geringen Konzentrationen von HIV-1-Tat (1 ng/ml) und schon nach sehr kurzer Inkubationszeit (1,5 h und 2 h) wurde die Expression von OGT-mRNA und -Protein in U937-Zellen deutlich verringert. Das schnelle Ansprechen auf die HIV-1-Tat-Gabe könnte auf einen hohen Durchsatz des Proteins zurückzuführen sein. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur die RNA-Konzentration von OGT sehr rasch abnimmt, sondern auch ein hochaktiver proteolytischer Mechanismus stattfindet, wie er für signaltransduzierende Moleküle typisch ist (Hochstrasser, 1996; Tanaka, 1998). Weder Protease-Inhibitoren gegen lysosomale Proteasen noch Proteasom-Inhibitoren (ALLN, Epoxomicin und *clasto*-Lactacystin β -Lactose) hatten jeweils einen Effekt auf die OGT-Expression. Weitere Möglichkeiten wären, dass durch Protein-OGT-Interaktion oder durch Konformationsänderung des OGT-Proteins die Antikörperbindungsstellen nicht mehr erreichbar sind. Aber auch durch Sekretion des OGT aus der Zelle heraus wäre es nicht mehr nachweisbar.

Es wurde gezeigt, dass HIV-1-Tat die Expression von OGT über Flt-1 reguliert. An den Flt-1-Rezeptor binden sowohl VEGF₁₂₁ als auch VEGF₁₆₅ (Robinson and Stringer, 2001). Interessanterweise hemmte nur VEGF₁₂₁ und nicht VEGF₁₆₅ die Expression von OGT in U937-Zellen. Es ist bekannt, dass VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ in verschiedenen Modellsystemen unterschiedliche Wirkungen aufweisen konnten. So hatte beim Kaninchen VEGF₁₂₁ eine stärkere angiogene Wirkung als VEGF₁₆₅ (Zhang et al., 2000). Im Gegensatz dazu hatte VEGF₁₆₅ gegenüber VEGF₁₂₁ in Endothelzellen eine 100-fach höhere mitogene Potenz (Keyt et al., 1996). Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die Wirkung von VEGF₁₆₅ aber nicht von

VEGF₁₂₁ von den Korezeptoren Heparansulfat-Proteoglykane, Neuropilin-1 und -2 beeinflusst wird (Cohen et al., 1995; Cohen et al., 2001; Gluzman-Poltorak et al., 2001; Park et al., 1993; Soker et al., 1998). Da Neuropilin nicht in U937-Zellen exprimiert wird (Delaire et al., 2001), ist VEGF₁₆₅ auf diesen Zellen möglicherweise unwirksam (Soker et al., 1998). Dies könnte erklären, warum nur das VEGF₁₂₁ aber nicht das VEGF₁₆₅ die OGT-Expression hemmte, obwohl beide Faktoren an die gleichen Rezeptoren binden.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass andere Faktoren als HIV-1-Tat und VEGF₁₂₁ die OGT-Expression verstärkten oder keinen Einfluss hatten. Dieser Befund zeigte, dass die Hemmung der OGT-Expression durch HIV-1-Tat und VEGF₁₂₁ in U937-Zellen selektiv war und das HIV-1-Tat die Expression über Flt-1 steuert.

PBMZ verschiedener Probanden reagierten unterschiedlich hinsichtlich des Effekts von HIV-1-Tat auf die OGT-Expression. Die Tendenz der Reaktion von OGT auf HIV-1-Tat war aber bei jedem einzelnen Probanden in drei unabhängigen Versuchen konstant. PBMZ bestehen zu 70% - 85% aus T-Zellen, 10% - 15% aus Monozyten und 10% - 15% aus B-Zellen. Diese prozentuale Zusammensetzung kann sich von Person zu Person unterscheiden. Auf jede dieser Zellpopulationen kann HIV-1-Tat unterschiedlich wirken, so induziert HIV-1-Tat z.B. in B-Zellen und T-Zellen unterschiedlich die Expression von Zytokinen (Sharma et al., 1995). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wird auch die Adhäsionsfähigkeit unterschiedlich beeinflusst. Um weitere Aufschlüsse über die Regulierung von OGT in den verschiedenen Zellpopulationen zu erhalten, wäre eine getrennte Bestimmung des Einflusses von HIV-1-Tat auf die OGT-Expression in T-Zellen, B-Zellen und Monozyten nötig. Ein weiterer entscheidender Grund für die unterschiedlichen Effekte von HIV-1-Tat auf die OGT-Expression in PBMZ verschiedener Probanden könnte auch eine individuelle Komponente (genetische Disposition) sein, die möglicherweise die unterschiedliche Prädisposition für für AIDS-assoziierte Vaskulopathie erklären könnte.

Für die AIDS-Progression könnte die Repression von OGT und einer damit im Zusammenhang stehenden gesteigerten SP-1 gesteuerten Transkription aus zweierlei Gründen von Interesse sein. Erstens gibt es Beispiele für zelluläre Gene (MCP-1, Galectin-3 und CD95L), deren Induktion durch HIV-1-Tat abhängig von der Aktivierung der SP-1-Bindungsstelle ist (Fogel et al., 1999; Lim und Garzino-Demo, 2000; Li-Weber et al., 2000). Weiterhin wird die Expression von p53 durch HIV-1-Tat verringert (McArthur et al., 2001), und die biologische Aktivität von p53 hängt von dessen Glykosylierung ab (Hanover, 2001). Eine verringerte Glykosylierung aufgrund

einer gehemmten Expression von OGT führt zu verminderter biologischer Aktivität von p53 und könnte damit die Hemmung der p53-Expression auf funktioneller Ebene verstärkt stützen. Eine veränderte Modifizierung von Tau und Rb könnten zu dem gleichen Ergebnis führen. Es wäre daher sinnvoll, in zukünftigen Versuchen zu untersuchen, ob eine Überexpression von OGT einen Einfluss auf Zell-Proliferation oder –Differenzierung haben können. Auch auf dem HIV-1-LTR befinden sich drei hoch konservierte SP-1-Bindungsstellen (Estable et al., 1996) und Mutationen einer oder aller SP-1-Bindungsstellen reduzierte deutlich die HIV-1-Gen-Expression (Harrich et al., 1990; Southgate and Green, 1991). Durch verringerte Expression von OGT und somit verminderter expressionshemmender Wirkung von OGT auf die SP-1-vermittelte Transkription könnte der Effekt von HIV-1-Tat auf die Transaktivierung verstärkt werden. Eine erhöhte Transkription viraler Gene wäre die Folge. In künftigen Studien soll daher der Einfluss von OGT auf die HIV-1-Replikation in HIV-1-Infizierten untersucht werden. Darüber hinaus soll untersucht werden ob ein bestimmter OGT-Status mit der Ausbildung von AIDS-assoziiertes Vaskulopathie im Zusammenhang steht.

5. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Acrylamid/ N,N`-Methylenbisacrylamid (37,5:1)	BioRad (München)
Agarose (DNA)	Biozym (Hamburg)
Agarose ultra pure (RNA)	LifeTechnologies/Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	Sigma (Taufkirchen)
Ampicillin	Sigma
Antibiotika/Antimykotika	Life Technologies/Invitrogen
Bacto-Agar	Difco (Detroit, Michigan, USA)
Blocklösung für <i>Western blot</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
5-Brom-6-Chlor-3-Indoyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal)	Roche Diagnostics,
Complete Mini (Protease-Inhibitorcocktail)	Roche Diagnostics
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)	Roche Diagnostics
Dextransulfat	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth (Karlsruhe)
D, L-Dithiothreitol (DDT)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DNA- <i>HiSpeed</i> Plasmid-Kit	Qiagen (Hilden)
DNA-Isolierungs-Kit (Qiaprep)	Qiagen
DNA-Längenstandard	MBI-Fermentas (St. Leon Roth)
DNA-Polymerase I (Klenow-Enzym)	Roche Diagnostics
Endothelzellbasalmedium-2 MV	Cambrex (Vervier, B)
ECL-Nachweissystem	Amersham-Pharmacia Bioscience (Freiburg)
Ethidiumbromid	Roth
Fast Red	Sigma
Ficoll	Amersham-Pharmacia Bioscience

Fötales Rinderserum (FBS)	Life Technologies/Invitrogen
Gelatine	Sigma
Glutamin	Life Technologies/Invitrogen
Glutaraldehyd	Serva (Heidelberg)
Hefeextrakt	Difco
Hybond-N+-Membran	Amersham-Pharmacia Bioscience
Hybond-P-Membran	Amersham-Pharmacia Bioscience
Immu-Mount	Shandon (Pittsburgh, USA)
Isopropyl-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roche Diagnostics
Kanamycin	Life Technologies/Invitrogen
Ketamin	Nimatek (Cuijk, NL)
L-Glutamin	Life Technologies/Invitrogen
Mixed bed resin	Sigma
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma
Natrium-Laurylsarcosylsulfat	Serva
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Nitrozellulose (DNA)	Schleicher&Schüll (Dassel)
PCR-Purification-Kit	Qiagen
Penicillin/ Streptomycin	Seromed (Berlin)
Percoll	Amersham-Pharmacia Bioscience
Rainbow-Protein-Größenstandard	Amersham-Pharmacia Bioscience
PE-10 Katheder	Portrex (Kent, GB)
Prestained-Protein-Größenstandard	BioRad
RNeasy-Kit	Qiagen
Rhodamin	Sigma
RPMI 1640-Medium	Biochrom (Berlin)
sonifizierte Heringsspermien-DNA	Roche Diagnostics
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad
10 x Tris/Glycerin/SDS-Puffer	BioRad
tRNA aus E.coli	Roche Diagnostics
Trypsin/EDTA	Life Technologies/Invitrogen

Trypton	Life Technologies/Invitrogen
Tween 20	Sigma
Xylazin	Sedamun
Zeta-Probe-Membran	BioRad

Die humanen Zytokine (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, , IL-8) und Chemokine (MIP-1 α , IP-10, MCP-1, SDF-1 α) wurden von Roche Diagnostics bezogen und die humanen AWF (bFGF, VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅) und das Maus TNF- α von R&D-Systems (Wiesbaden-Nordenstadt). Alle anderen Chemikalien stammen von der Firma Merck.

Das rekombinante, gereinigte HIV-1-Tat-Protein (86 As, HIV-1 Typ IIIB-BH-10 Subtyp B) wurde von Frau Dr. Barbara Ensoli (*Instituto Superiore di Sanita*, Rom, Italien) und das HIV-1-Nef (LAV-1 Bru) wurde von Herrn Prof. Volker Erfle (GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) zur Verfügung gestellt. Das *maltose binding protein* (MBP)-gp41 wurde von Intracel (Cambridge, MA) und das zur Referenz verwendete MBP von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

5.1.2. Antikörper

Peroxidase-gekoppelter Anti- Maus-Antikörper	Amersham-Pharmacia
Peroxidase-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper	Amersham-Pharmacia
Maus anti-humanen-GAPDH-Antikörper	Chemicon (Hofheim).
Ziege anti-humanen-VEGFR-1-(Flt-1)-Antikörper	R&D Systems
Ziege anti-humanen-VEGFR-2-(Flk-1)-Antikörper	R&D Systems

FITC-gekoppelte Maus anti-humane CD4-, CD20-,CD45- und IgG1- Antikörper und PerCp-gekoppelte Maus anti-humane CD14- und IgG2b-Antikörper wurden von der Firma BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

Der polyklonale anti-Ratte OGT-Antikörper wurde von Herrn Prof. Gerald W. Hart (*The Johns Hopkins University School of Medicine*, Baltimore, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt.

5.1.3. Proteaseinhibitoren

Aprotinin	Sigma
Antipain	Sigma
Chymostatin	Sigma
Leupeptin	Sigma
Pepstatin	Roche Diagnostics
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnostics
Proteasome Inhibitor Set II	Calbiochem (Schwalbach)

5.1.4. Radiochemikalien

α -[³² P]-dCTP (11111 Bq/mM)	Hartmanns (Braunschweig)
---	--------------------------

5.1.5. Enzyme

alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics
DNA-Polymerase I (Klenow-Enzym)	Roche Diagnostics
DyNAzyme I	Finnzymes (Espoo, FI)
KlenTaq-Polymerase	Clontech (Heidelberg)
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics
RNase A	Qiagen
Trypsin/EDTA	LifeTechnologies/Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics

5.1.6. Vektoren und Plasmide

Vektor	relevante Eigenschaften	Resistenz	Firma
pCR-Blunt	lacZ α , PCR-Klonierungsvektor	Kanamycin, Zeocin	Invitrogen
pBluescript (pBS) II SK (+)	lacZ α , Klonierungsvektor	Ampicillin	Stratagene

Plasmide	Größe des Fragments (kb)	Restriktions-schnittstellen ¹	Verwendung
pBS-II-OGT ¹	0,7	<i>EcoR V</i>	<i>Northern blot</i> -Analyse
PCR-Blunt-133 ¹	0,3	<i>EcoR I</i>	<i>Northern blot</i> -Analyse

¹Durch Restriktion mit den angegebenen Enzymen kann die Insertion vollständig aus dem Vektor isoliert werden.

5.1.7. Biologisches Material

5.1.7.1. Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue (Stratagene):

endA1, hsdR17 (rk, mk⁺), supE44, thi-1, λ⁻, recA1, gyrA96, relA1, lac⁻, [f⁻, proAB, lacIqZΔM15, Tn10(tet^R)]

E. coli DH5α (Life Technologies/Invitrogen):

F⁻, endA1, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), supE44, thi-1, λ⁻, recA1, gyrA96, relA1, Δ80dlacZM15

E. coli One Shot TOP10 (Life Technologies/Invitrogen):

F⁻, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG

5.1.7.2. Eukaryontische Zellen

Primäre Zellen: Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVEZ) wurden von Cambrex Bio Science bezogen. Die HMVEZ stammen aus der Haut einer 90-jährigen weiblichen Person.

Die Isolierung von peripheren mononukleären Zellen des Blutes wurde wie unter Kapitel 5.2.2.2. beschrieben durchgeführt.

Die promonozytäre Zelllinie U937 wurde von ATTC (USA) bezogen.

5.2. Methoden

5.2.1. Allgemein benötigte Puffer, Lösungen und Medien

(Spezielle Lösungen sind bei den einzelnen Methoden angegeben)

LB-Medium:

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}	

Festmedien wurden durch Zusatz von 12 g *Bacto-Agar* pro Liter Medium hergestellt.

Plasmidtragende Bakterienklone wurden durch Zugabe von entsprechenden Antibiotika in das Medium selektioniert.

Zusatzstoffe:

Ampicillin:	Endkonzentration im Medium 100 µg/ml
Kanamycin:	Endkonzentration im Medium 50 µg/ml
IPTG:	Endkonzentration im Medium 0,1 mM
X-Gal:	Endkonzentration im Medium 0,004%

Die Hemm- und Zusatzstoffe werden den Medien nach dem Autoklavieren, bei Flüssigmedien kurz vor dem Beimpfen, bei Festmedien nach dem Abkühlen auf 50°C und vor dem Gießen der Platten sterilfiltriert zugegeben.

Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Behandlung wässriger Lösungen zur Hemmung von RNasen.

Zu 1 l wässriger Lösung wird 1 ml DEPC gegeben und die Lösung über Nacht bei RT langsam gerührt. Anschließend wird DEPC durch zweimaliges Autoklavieren deaktiviert.

10 x PBS:

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}	

Nach dem Autoklavieren, mit NaOH auf pH 7,4 einstellen.

20 x SSC:

NaCl	175,3 g
Na-Citrat x 2 H ₂ O	88,2 g
ad 1000 ml H ₂ O _{DEPC}	

Nach dem Autoklavieren mit wenigen Tropfen 2 N NaOH pH-Wert auf 7,4 einstellen.

TE-Puffer:

1 M Tris/HCl (pH 8,0)	10 ml
0,5 M EDTA	2 ml
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}	

5.2.2. Zellbiologische Methoden**5.2.2.1. Allgemeine Zellkultur**Adhärente Kulturen

Primäre humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVEZ) wurden in Endothelzell-*Full-Medium* (FM) bei 37°C und 5% CO₂ in gelatinisierten Zellkulturflaschen kultiviert.

Gelatine 1,5%:

Gelatine	7,5 g
1 x PBS	500 ml

Bei 70°C 1 h im Wasserbad rühren, am gleichen Tag autoklavieren, aliquotieren und bei 4°C aufbewahren.

Zum Gelatinisieren wurde die Gelatine auf 37°C erwärmt in ausreichender Menge in die Zellkulturflasche gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Überschüssige Gelatine wurde am nächsten Tag wieder abgenommen und die gelatinisierte Zellkulturflasche mit Medium gewaschen.

Full Medium (FM):

Endothelbasalmedium (EBM)-2 MV	500 ml
Hydrocortison	0,2 ml
hEGF	2 ml
Gentamicin / Amphotericin-B	0,5 ml
hVEGF	0,5 ml
Ascorbinsäure	0,5 ml
hR ³ -IGF-1	0,5 ml
hFGF-2	0,5 ml
FBS	25 ml
Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml)	5 ml

Low Medium (LM):

Das LM enthielt 0,5% FBS und Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml).

Zum Passagieren wurden die Zellen (Konfluenz 80%) mit warmen PBS gewaschen, durch Inkubation mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit frischem Medium 1:3 bis 1:4 verdünnt wieder ausgesät.

Nichtadhärente Zelllinien:

Die promonozytäre Zelllinie U937 wurde in RPMI 1640 mit 10% FBS, L-Glutamin (2 mM), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37°C und 5% CO₂ in einer Zelldichte von 5 x 10⁵ bis 1 x 10⁶ Zellen/ml kultiviert.

Stammhaltung:

Zur Lagerung aller Zellen wurden diese sedimentiert und in einer Zellzahl von 5 x 10⁶ Zellen in 1 ml Medium + 20% FBS + 10% DMSO aufgenommen und nach dem Einfrieren bei -80°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

5.2.2.2. Isolierung von PBMZ aus dem Blut

PBMZ wurden aus frischem mit Citratlösung behandelten Blut von gesunden Personen durch Dichtezentrifugation über Percoll gewonnen. Dazu wurde, um einen Vorgradienten zu bilden, 20 ml Percoll mit einer Dichte von 1,080 bei 9500 x g in einem SS34-Rotor für 20 min zentrifugiert. Der Vorgradient wurde anschließend mit 20 ml Blut überschichtet und bei 800 x g (Jouan CR3i/T40) 5 min zentrifugiert und die obere Schicht bis zur Interphase mit den darin enthaltenen Thrombozyten entfernt. Diese Schicht wurde durch 20 ml PBS ersetzt und nochmals bei 800 x g (Jouan CR3i/T40) für 15 min zentrifugiert. Die PBMZ wurden aus der Interphase gesammelt und zweimal mit PBS gewaschen und mit einer Konzentration von 5 x 10⁵ Zellen/ml in RPMI 1640-5% FBS aufgenommen.

5.2.2.3. *In vitro*-Adhäsionstest

HMVEZ wurden zu 7 x 10⁴ Zellen/well in Zellkulturkammern auf gelatinisierten Objektträgern (8-well chamber slides, NUNC, Wiesbaden) eingesetzt und über Nacht in EBM-2 MV - 2,5% FBS kultiviert. Anschließend wurden diese Zellen mit den entsprechenden Zytokinen für 6 h in LM inkubiert. 500 µl Zellsuspension von U937-Zellen (5 x 10⁵ Zellen/ml) oder PBMZ (1 x 10⁶ Zellen/ml) in RPMI 1640 - 1% FBS wurden für 15 min auf die HMVEZ gegeben. Danach wurden die nicht-adhären Zellen abgenommen, anschließend wurden die Zellkammern abgetrennt und nichtadhärente Zellen durch zweimaliges Eintauchen in RPMI 1640 - 1% FBS abgewaschen. Die anhaftenden Zellen wurden fixiert (30 min, RT, RPMI 1640 - 1% FBS - 5% Glutaraldehyd), mit Immu-Mount eingebettet und mittels eines Bildanalyse-Systems (OPTIMAS /

STEMMER *ELECTRONICS*, Puchheim, Deutschland) quantifiziert. Pro Zellkulturkammer wurde aus acht optischen Feldern die Anzahl der adhärenen Monozyten bestimmt. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt und die Ergebnisse repräsentieren den Durchschnitt von drei unabhängigen Versuchen (\pm SD). Für den Adhäsionstest mit stimulierten U937-Zellen bzw. PBMZ (5×10^5 Zellen/ml) wurden die Zellen in RPMI 1640 - 5% FBS mit 100 ng/ml HIV-1-Tat-Protein, 100 ng/ml HIV-1-Nef und 198 ng/ml gp41 über 24 h stimuliert. 6 h vor Ablauf dieser 24 h wurden die HMVEZ mit entsprechenden Mengen TNF- α stimuliert. Die U937-Zellen und die PBMZ wurden direkt in diesem Medium auf die HMVEZ appliziert und die Adhäsionsfähigkeit bestimmt.

Für die Durchfluss-Zytometrie-Analyse wurden HMVEZ (1×10^6 Zellen) auf einer Kulturplatte (8 cm²) ausgesät und mit Endothelzellmedium (EBM - 2 MV - 2,5% FBS) über Nacht kultiviert und wie oben beschrieben stimuliert. Nach der Stimulierung mit TNF- α wurden 2 ml PBMZ-Suspension (1×10^6 Zellen/ml) zugegeben, nach 15 min wurden die nicht-adhärenen Zellen abgossen und die Zellen in der Kulturschale zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Accutase (PPA Laboratories, Coelbe) abgelöst und in 100 μ l PBS - 1% BSA - 0,01% NaAz mit einem Titer von 1×10^6 Zellen/100 μ l aufgenommen. Danach wurden die Zellen 30 min bei RT mit FITC-gekoppelten anti-CD45-, -CD3-, -CD20-Antikörper (je 5 μ g/ml) oder PerCP-gekoppelten anti-CD14-Antikörper (0,5 μ g/ml) inkubiert. Um die Spezifität der Färbung nachzuweisen, wurden die Zellen zusätzlich mit äquimolaren Mengen FITC-IgG1- und PerCP-IgG2b-Antikörper (je 5 μ g/ml) inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS - 1% BSA - 0,1% NaAz gewaschen; die Zellen in PBS - 2% Paraformaldehyd fixiert und im FACSCalibur (BD Biosciences) analysiert und mit dem CellQuest-Programm (BD Biosciences) ausgewertet.

5.2.2.4. Intravital Mikroskopie

Versuchsaufbau: Die Intravital-Mikroskopie wurde bei C57BL/6 Mäusen durchgeführt, die ein Gewicht von 25 g – 30 g hatten. Am Tag des Experimentes wurden den jeweiligen Mäusen entweder 100 ng rekombinantes Maus-TNF- α (n = 3), 20 μ g HIV-1-Tat (n = 3), 20 μ g HIV-1-Tat und 100 ng rekombinantes Maus-TNF- α (n = 2) oder PBS - 0,1% BSA (n = 2) als Referenz intra peritoneal (i.p.) injiziert. Vier Stunden später wurden die Mäuse durch subkutane (s.c.) Injektion mit einem Gemisch aus Ketamin (0,1 mg/g Körpergewicht) und Xylazin (0,02 mg/g Körpergewicht) anaesthetisiert. Um die Leukozyten sichtbar zu machen, wurden 10 μ l Rhodamin-6G in isotonischer Kochsalzlösung verdünnt (1 mg/ml), filtriert (0,22 μ m) und durch einen PE-10 Katheder in die Vene appliziert. Die Venen in beiden Ohren wurden im Leitz Intravital-Mikroskop

(Leitz x 1,25 Ploemopak 2.2 für austauschbare Filter mit Leitz x 25 Salzwasser-Immersionsobjektiv) beobachtet. Zu diesem Zweck wurde die Maus auf eine Heizplatte (37°C) gelegt, so dass das Ohr auf einem Glasring lag und mit Paraffin und einem Deckglas abgedeckt wurde. Trans-Illumination wurde mit einer Wolframlampe (60 W) durchgeführt, während die Fluoreszenz-Mikroskopie mit einem Leitz N2.1-Filter in Kombination mit einer Quecksilberlampe (100 W) durchgeführt wurde. Die Bewegung der Leukozyten wurde mit Hilfe einer Videokamera (Hamamatsu Photonics, C2400) gekoppelt an eine Vergrößerungseinheit (Hamamatsu Photonics A4405) bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Bei allen Experimenten wurde auf die mittlere Ebene des Gefäßes fokussiert. Während des Versuchs wurde die Temperatur der Mäuse mit einer Infrarot-Lampe auf 37°C konstant gehalten.

Versuchs-Parameter: Die ausgewählten Venen hatten einen Durchmesser von 15 – 45 µm. Die Leukozyten-Gefäßwand-Interaktionen wurden anhand der Video-Aufzeichnungen wie beschrieben analysiert (Tromp et al., 2000). Leukozyten wurden als rollend definiert, wenn ihre Geschwindigkeit um eine Zehner-Potenz niedriger war als die der frei im Blut fließenden. Die Anzahl der rollenden Zellen wurden in einem definierten Bereich während eines Zeitraumes von 120 sek gezählt. Die Daten sind als Anzahl der rollenden Zellen die ein Segment im Gefäß passierten pro Minute dargestellt.

Die Anzahl der adhärennten Leukozyten wurden in einem Bereich von 100 µm in der Vene gezählt und als Anzahl der adhärennten Zellen pro mm² dargestellt. Leukozyten wurden als adhärennt definiert, wenn sie länger als 30 sek verharrten.

Statistik: Aufgrund ihrer nicht parametrischen Verteilung wurden die Daten als Mediane dargestellt. Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Daten-Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test ausgewertet.

5.2.3. Handhabung des HIV-1-Tat-Proteins

Das verwendete HIV-1-Tat-Protein war rekombinant in *E. coli* (Barillari et al., 1992) erzeugt, über HPLC und Ionenaustauschromatographie gereinigt und lyophilisiert und bei -70°C gelagert worden. Das gereinigte Protein wurde vor Gebrauch in entgastem Puffer (PBS - 0,1% BSA - 0,1 mM DTT) gelöst und auf Eis unter Lichtausschluß bearbeitet. Da HIV-1-Tat stark an Plastik bindet, wurden alle verwendeten Reaktionsgefäße und Spitzen mit PBS - 0,1% BSA

beschichtet. Für jedes Experiment wurde ein frisches Aliquot des Proteins verwendet und die Reinheit mittels Gelchromatographie überprüft.

5.2.4. Bakterienkultivierung

Beimpfen von Flüssigkulturen im kleinen Maßstab (< 5 ml), sowie Überimpfen von *E. coli*-Zellen auf Festmedien erfolgte mit sterilen Zahnstochern von einer Einzelkolonie ausgehend. Zur Inkubation bei 37°C wurde ein Brutschrank benützt. Flüssigkulturen im großen Maßstab (> 50 ml) wurden mit 100 µl einer über Nacht gewachsenen Flüssigkultur beimpft. Bei Stämmen, die ein Plasmid mit Antibiotikaresistenz tragen, wurden Medien mit entsprechendem Antibiotikazusatz verwendet.

Stammhaltung:

Zur Langzeitkonservierung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 1 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur mit 1 ml zweifach sterilisiertem Glycerin versetzt, gut vermischt auf Eis gekühlt und bei –70°C aufbewahrt. Für kurzzeitige Lagerung (max. 2 Wochen) wurden Verdünnungsausstriche angefertigt und die LB-Platten bei 4°C aufbewahrt.

5.2.5. Proteinchemische Methoden

5.2.5.1. Quantitative Proteinbestimmung der RIPA-Extrakte nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung wurden die Lösungen des *BIORAD DC Protein Assay* nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Absorption wurde bei 750 nm mit einem Spektralphotometer gemessen. Anhand einer Standardkurve mit verschiedenen BSA-Konzentrationen wurden die erhaltenen Absorptionsmesswerte (Duplikate) in die dazugehörenden Konzentrationen umgerechnet.

5.2.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE lassen sich Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem Gel im elektrischen Feld auftrennen. Für diese Arbeit wurden ausschließlich diskontinuierliche Gele benutzt, die aus einem Sammelgel und einem Trenngel bestehen und sich in Porengröße, Ionenstärke und pH-Wert unterscheiden.

Acrylamid-Stammlösung: Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 37,5% / 1%

Trenngelpuffer -Stammlösung:

Tris	91,0 g
SDS	2,0 g
ad 1000 ml H ₂ O _{bideest} , pH mit HCl auf 8,8 einstellen	

Sammelgelpuffer-Stammlösung:

Tris	30,5 g
SDS	2,0 g
ad 500 ml H ₂ O _{bideest} , pH mit HCl auf 6,8 einstellen	

10 x Elektrophoresepuffer:

Tris	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10,0 g
ad 1000 ml H ₂ O _{bideest}	

4-fach Probenpuffer:

β -Mercaptoethanol 13,4 M	2,3 g
SDS	0,6 g
Bromphenolblau	10,0 mg
Glyzerin 87%	4,0 ml
Tris	0,1 g
ad 10 ml H ₂ O _{bidest} , pH mit HCl auf 6,7 einstellen	

Ammoniumpersulfat (APS): 10% APS in H₂O_{bidest}

Herstellung des Gels:

Die Mengenangaben beziehen sich auf 3 Gele in den Größen 135 x 11 x 1,5 mm einer Gelgießkammer von Amersham-Pharmacia

	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
Acrylamid/Bisacrylamid	10,7 ml	2,0 ml
Trenngelpuffer	10,0 ml	-
Sammelgelpuffer	-	7,5 ml
H ₂ O _{bidest}	19,14 ml	5,4 ml
TEMED 99%	10 μ l	5 μ l
APS 10%	150 μ l	100 μ l

Vor dem Auftrag wurden die Proteine 20 min in Auftragspuffer bei 60C° erhitzt, um die Disulfidbrücken der Proteine zu reduzieren (β -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel) und eine vollständige Denaturierung zu erreichen. Pro Spur wurden 30 μ g - 50 μ g Protein aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 20 mA für 1 h 30 min mit 1 x Tris – Glyzerin - SDS-Puffer.

5.2.5.3. Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Färbelösung:

Coomassie <i>Brilliant Blue</i> G 250	1,5 g
Methanol	455 ml
Eisessig	80 ml
ad 1000 ml H ₂ O _{bide} st	

Entfärber:

Methanol	250 ml
Eisessig	350 ml
ad 1000 ml H ₂ O _{bide} st	

Die Gele wurden nach der Elektrophorese bei RT 30 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend solange mit Entfärber inkubiert, bis sich die Proteinbanden blau von einem transparenten Hintergrund abhoben.

5.2.5.4. Elektrotransfer von Proteinen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Tankblot-Apparatur (Amersham-Pharmacia) auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde das Proteingel luftblasenfrei auf die Membran gelegt, zwischen mehrere Schichten mit Transferpuffer getränktem 3-MM-Whatmanpapier gepackt und in die Apparatur eingesetzt. Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran erfolgte elektrophoretisch in Transferpuffer bei 250 mA für 2 h.

Transferpuffer:

Tris	5,8 g
Glycin	2,9 g
10% SDS-Lösung	3,7 ml
Methanol	200 ml
ad 1000 ml H ₂ O _{bide} st	

5.2.5.5. *Western blot*-Analyse

Proteingemische wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE (10% Trenngel, 5% Sammelgel) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die freien Bindungsstellen der PVDF-Membran wurden durch Inkubation mit 20 ml PBS - 0,1% Tween - 1% Blockreagenz über Nacht bei 4°C behandelt. Anschließend wurden die Filter über 1 h bei RT mit dem in 20 ml PBS - 0,1% Tween - 1% Blockreagenz verdünnten (1:5000) ersten Antikörper (anti-OGT oder anti-GAPDH) inkubiert. Unspezifisch am Filter haftende Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen (10 min, RT) mit PBS - 0,1% Tween abgelöst. Anschließend wurde der Filter mit dem in 20 ml PBS - 0,1% Tween - 1% Blockreagenz verdünnten (1:5000) zweiten Antikörper (Peroxidasegekoppelter Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Maus-Antikörper) 60 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde vier Mal 10 min gewaschen und die Immunkomplexe mit einem Chemolumineszenz-Nachweissystem (ECL) nach den Angaben des Herstellers sichtbar gemacht.

5.2.6. DNA-Technologie

5.2.6.1. Plasmidisolierung

Plasmidisolierung mit dem *Plasmid Purification Kit* (Qiagen)

Der Kit wird angeboten für verschiedene Konzentrationen isolierter Nukleinsäure: Mini (50 µg), Midi (100 µg) und Maxi (500 µg). Alle Lösungen und Säulen sind im Kit enthalten. Die Isolierung des DNA-Plasmids erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Das Prinzip der Isolierung basiert auf einer alkalischen Lyse und einer anschließenden Bindung der DNA an eine Anionen-Austausch-Chromatographiesäule unter entsprechenden Niedrigsalz- und pH-Bedingungen. Zum Eluieren werden dann Hochsalzlösungen verwendet. Zum Reinigen der DNA erfolgt abschließend eine Isopropanolpräzipitation.

Lösungen:

Puffer P1:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 100 µg/ml RNase A
Puffer P2:	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer P3:	3,0 M Kaliumacetat (pH 5,5)

Plasmidschnellisolierung mit dem *HiSpeed Plasmid Kit* (Qiagen)

5 ml LB-Medium wurden mit einem Antibiotika versetzt, gegen welches das zu reinigende Plasmid ein Resistenzgen trägt, und mit einer Einzelkolonie plasmidhaltiger Bakterien angeimpft. Die Kultur wurde 16 – 18 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Zellsuspension bei 4000 x g (Tischzentrifuge: Sigma 1-15) über 5 min. Die Plasmid-DNA wurde nach Anleitung des Herstellers isoliert, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl autoklaviertem H₂O_{bidest} aufgenommen. Das Prinzip dieser Isolierung entspricht dem der Isolierung mit dem *Plasmid Purification Kit*. Für eine Restriktion mit Enzymen wurden 2 µl der DNA-Lösung eingesetzt.

5.2.6.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Diese Art der Konzentrationsbestimmung wird durch das Absorptionsmaximum der aromatischen Systeme der Nukleinsäuren im kurzwelligen UV-Licht bei 260 nm ermöglicht. Für wässrige DNA-Lösungen in Quarzküvetten einer Schichtdicke von 1 cm gilt näherungsweise:

Konzentration ds DNA (µg/ml) = Abs.₂₆₀ x 50 x Verdünnungsfaktor

Konzentration ss DNA und RNA (µg/ml) = Abs.₂₆₀ x 40 x Verdünnungsfaktor

Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm gilt als Maß der Reinheit der Nukleinsäurelösung und sollte den Wert 1,8 nicht unterschreiten.

5.2.6.3. Reinigung und Konzentrierung von DNA-Fragmenten

5.2.6.3.1. Phenolbehandlung

Phenol denaturiert Proteine, zeigt aber keinen Einfluß auf DNA. Somit können Enzyme inaktiviert und zusammen mit anderen Verunreinigungen mit der Phenolphase und der Interphase zum Wasser aus der DNA-Präparation (Wasserphase) abgetrennt werden. Die darauffolgende Chloroformbehandlung entfernt aus der Wasserphase restliches Phenol, welches eine weitere enzymatische Behandlung der DNA beeinträchtigen könnte. Isoamylalkohol erleichtert die Phasentrennung.

Ein Volumen Phenol wurde zu einem Volumen DNA-Lösung gegeben und durch Vortexen gemischt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (16000 x g, Sigma 1-15) beschleunigt. Die wässrige (obere) Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit einem Volumen Phenol/Chloroform gemischt und wieder zentrifugiert. Anschließend wurde zweimal mit Chissom ausgeschüttelt. Die Nukleinsäuren wurden anschließend durch Ethanolpräzipitation konzentriert.

Lösungen:

Chissom:	Chloroform/Isoamylalkohol 24:1
Phenol/Chloroformlösung:	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1

5.2.6.3.2. Fällern von DNA mit Isopropanol

DNA lässt sich aus wässrigen Salzlösungen durch Zugabe von Isopropylalkohol ausfällen. Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 4 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen Isopropylalkohol vermischt und bei RT 30 min gefällt. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 16000 x g (Sigma 1-15) für 15 min bei RT wurde der Isopropylalkohol dekantiert und zweimal mit 2 Volumen (der DNA-Lösung) 70%-igem eiskaltem Ethanol gewaschen, um Salz-Verunreinigungen zu entfernen. Das DNA-Pellet wurde bei RT oder unter Vakuum getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurde die DNA in einem geeigneten Volumen H₂O_{bidest} aufgenommen.

5.2.6.4. Enzymatische Modifikation von DNA-Molekülen

5.2.6.4.1. Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen werden vielfältig eingesetzt, so z.B. zur Analyse von DNA-Längen und für verschiedene Methoden der DNA-Modifikation.

Reaktionsansatz:

DNA-Lösung (1-2 µg)	x µl
10 x Restriktionspuffer	2 µl
H ₂ O _{bidest}	(18-x) µl
Restriktionsenzym	0,25-1 Unit

Die Inkubation erfolgte bei der für das Enzym entsprechenden Temperatur im Wasserbad.

Für präparative Zwecke wurde der obige Ansatz bis zu einer DNA-Konzentration von 30 µg vervielfacht und der Ansatz für mindestens 3 h oder über Nacht inkubiert. Nachdem die Vollständigkeit der Reaktion mit einem kleinen Agarosegel überprüft wurde, konnte der Gesamtansatz auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen werden (Kap.: 5.2.6.5.)

Verwendete Restriktionsenzyme und ihre spezifischen Eigenschaften:

Restriktionsenzym	Spaltsequenz	entstehendes Ende der DNA
EcoR I	G/AATTC	5'-überhängend
EcoR V	GAT/TAC	glatt
Rsa I	GT/AC	glatt

5.2.6.4.2. Auffüllreaktion

Zum Auffüllen 5'-überhängender DNA-Enden wurde die DNA-Polymerase I (Klenow-Enzym) verwendet.

Die durch Restriktionsenzyme verdaute DNA wurde durch Phenolextraktion und Fällen mit Isopropylalkohol oder über spezielle Reinigungsmethoden (*PCR-Purification Kit*, Qiagen) von

dem Restriktionsenzym und Puffer gereinigt und in 23 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen. Danach wurden 3 μl einer 25 mM dNTP-Mischung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 3 μl des mitgelieferten 10-fach Klenow-Puffers und 1 μl (5 U) Klenow-Enzym zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch 5-minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert.

5.2.6.4.3. Dephosphorylierung linearer DNA-Moleküle

Bei Klonierungsschritten wird der Vektor durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase (AP) dephosphoryliert, um eine Ligation des Vektors mit sich selbst zu vermeiden. Die benötigten Phosphatgruppen werden vom Insert geliefert.

Vollständig restriktionsverdaute DNA wurde auf 1 x AP-Puffer eingestellt, die alkalische Phosphatase dazugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die nötige Enzymmenge richtet sich nach den pmol DNA-Enden; im allgemeinen ist 1 Unit Enzym für 30 μg DNA ausreichend. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz 20 min auf 65°C erhitzt und anschließend das Enzym durch Phenolextraktion entfernt. Nachfolgend wurde die DNA gefällt.

10 x AP-Puffer:

1 M Tris/HCl (pH 8)	5 ml
0,5 M EDTA	20 μl
ad 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	

5.2.6.4.4. Ligation von DNA-Molekülen

Zur Ligation verschiedener DNA-Fragmente wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der freien OH-Gruppe am 3'-Ende des einen und der 5'-Phosphatgruppe des anderen DNA-Fragmentes.

Fragment- und Vektor-DNA wurden im molaren Verhältnis 3 : 1 gemischt, der mitgelieferte 10-fach Ligase-Puffer und 1 - 3 Units Ligase zugegeben. Die Inkubation im Fall von überstehenden Enden erfolgte bei 16°C über Nacht, bei glatten Enden über Nacht bei RT. Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um die Effizienz der Ligation zu überprüfen.

10 x Ligase-Puffer:

Tris/HCl pH 7,4	500 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	200 mM
ATP	10 mM

5.2.6.5. Nichtdenaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihres Molekulargewichtes wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Agarosekonzentration betrug meist 1%, womit lineare Moleküle effizient im Bereich von 0,2 – 10 kb aufgetrennt werden konnten. Zur Auftrennung kurzkettiger RNA-Fragmente wurde für die RT-PCR ein 2%-iges Gel verwendet. Als Elektrolyt wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde in der gewünschten Konzentration in 1 x TAE-Puffer gegeben und durch Aufkochen vollständig geschmolzen. Nach Abkühlen der Lösung auf 60°C wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) zugegeben. Anschließend wurde das Gel gegossen und nach dem Erstarren mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die Probe wurde mit 6 x Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Anhand der Farbmarker wurde der Lauf verfolgt. Bromphenolblau verhält sich in 1%-igen Gelen beim Lauf wie ein DNA-Fragment von ca. 0,6 kb Größe. Die Elektrophorese wurde je nach dem gewünschten Trenneffekt 30 min bis 2 h bei einer Spannung von 5 - 10 V/cm durchgeführt. Nach dem Lauf wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht (254 nm) nachgewiesen und photographiert.

50 x TAE-Puffer:

Tris	2,0 M
Eisessig	1,0 M
EDTA	0,1 M
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}	

6 x DNA-Auftragspuffer:

Bromphenolblau (Farbmarker)	0,25%
Xylen-Cyanol (Farbmarker)	0,25%
Sucrose	40,0%

5.2.6.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Klonierung und die Präparation spezifischer Sonden ist es notwendig, dass durch RT-PCR (Kap.: 5.2.6.10.) amplifizierte Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung isoliert werden können. Die Isolierung solcher Fragmente wurde mit dem *QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit* (Qiagen) durchgeführt, der nach dem Herstellerprotokoll verwendet wurde.

Nach der präparativen enzymatischen Spaltung der Plasmid-DNA oder der Amplifikation der DNA-Insertion des Vektors mittels PCR wurde der Reaktionsansatz auf ein präparatives Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetragen und die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe getrennt. Die Bande, die das zu isolierende Fragment enthielt, wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Bei der Durchführung des *QIAEX II Agarose Gel Extraction Kits* wurde die ausgeschnittene Agarose mit dem Fragment geschmolzen und die DNA an Silikonkugeln gebunden. Nachfolgend wurde die gebundene DNA mehrmals gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen an $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (10 - 20 μl) eluiert. Durch Zentrifugation erfolgte die Abtrennung der DNA-Lösung von den Silikonkugeln.

5.2.6.7. Transformation von Bakterien mit Plasmiden

In *E. coli* Zellen kann auf verschiedene Methoden Fremd-DNA eingebracht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Elektroporation und Kalziumchlorid-Transformation eingesetzt. Für alle durchgeführten Transformationen wurde jeweils eine Positivkontrolle (1 ng zirkuläre Vektor-DNA) und eine Negativkontrolle ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ statt Plasmid) mit angesetzt.

5.2.6.7.1. Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation

Zur Elektroporation wurde der *E. coli* Stamm DH5 α verwendet. 500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und die Zellen bis zu einer OD_{650} von 0,5 - 0,7 bei 200 Upm und 37°C inkubiert. Die Kultur wurde dann 15 min auf Eis abgekühlt und die Bakterien bei 2000

x g (SS34-Rotor) und 4°C 20 min in 500 ml abzentrifugiert. Nachfolgend wurde die Bakteriensuspension mit 500 ml eiskaltem, sterilem H₂O_{bidest} gewaschen und auf Eis homogenisiert. Nachfolgend wurden die Bakterien in 40 ml eiskaltem Wasser - 10% Glycerin bei 4°C gewaschen und anschließend in Wasser - 10% Glycerin resuspendiert, zu 50 µl – 300 µl aliquotiert und bei –70°C bis zu 6 Monate gelagert.

5.2.6.7.2. Elektroporation von Bakterien

Die Elektroporation wurde mit einem Elektroporationsgerät von BioRad mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

<i>Pulse-Controller:</i>	200 Ω,
<i>Gene Pulser:</i>	25 µF; 2,5 kV.

Die für die Elektroporation vorbereiteten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, max 0,5 µg Plasmid-DNA zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde luftblasenfrei in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,1 cm) gegeben und in den Küvettenhalter gestellt. Dann wurde bis zum Ertönen des Signaltons Spannung angelegt und sofort danach 1 ml SOC-Medium zugegeben. Nach guter Durchmischung wurde der Ansatz in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 37°C und 200 Upm 1 h geschüttelt. Aliquots von 20, 50, 100 und 200 µl dieses Ansatzes wurden auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum und bei Bedarf IPTG- und X-Gal-Zusatz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transformationseffizienz für DH5α betrug im Allgemeinen 8 x 10⁶ Kolonien pro µg DNA.

SOC-Medium:

Hefeextrakt	0,50 g
Trypton	2,00 g
MgCl ₂	0,20 g
MgSO ₄	0,25 g
Glucose	0,36 g
ad 100 ml H ₂ O _{bidest}	

5.2.6.7.3. Herstellung kompetenter Zellen für die Kalziumchlorid-Transformation

Für die Kalziumchlorid-Transformation wurde der *E. coli* Stamm XL-1 Blue verwendet. 50 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer über Nacht-Kultur angeimpft und die Kultur bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD₆₅₀ von 0,7 - 0,8 geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde für 15 min auf Eis gestellt und dann bei 300 x g (SS34-Rotor) und 4°C 10 min zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 25 ml Transformationspuffer aufgenommen und nochmals 15 min auf Eis inkubiert, bei 300 x g (SS34-Rotor) und 4°C 10 min zentrifugiert und in 2,5 ml Aufbewahrungspuffer aufgenommen, zu 100 µl Portionen aliquotiert und bei -70°C max. 6 Wochen gelagert.

Transformationspuffer:

1 M CaCl ₂	100 ml
1 M Tris/HCl (pH 8)	10 ml
ad 1000 ml H ₂ O _{bideest}	
Lösung sterilfiltrieren	

Aufbewahrungspuffer:

1 M CaCl ₂	1,0 ml
1 M Tris/HCl (pH 8)	0,1 ml
Glycerin 87%	3,0 ml
ad 10 ml H ₂ O _{bideest}	
Lösung sterilfiltrieren	

5.2.6.7.4. Transformation von chemokompetenten Bakterien

Für die Transformation wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und 100 µl kalter TCM-Puffer, sowie 0,1 µg Plasmid-DNA zugegeben. Anschließend wurden die Ansätze 30 min auf Eis inkubiert und dann 60 sek bei 42°C. Nach diesem Hitzeschock wurden zu jedem Ansatz 1 ml SOC-Medium gegeben und zur Regeneration bei 37°C und 200 Upm 1 h geschüttelt. Danach wurden Aliquots von 20, 50, 100 und 200 µl des jeweiligen Ansatzes auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum und bei Bedarf IPTG- und X-Gal-Zusatz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transformationseffizienz für XL-1 Blue betrug im allgemeinen 5 x

10^6 Kolonien pro μg DNA.

TCM-Puffer:

Tris/HCl (pH 7,5)	10 mM
MgCl ₂	10 mM
CaCl ₂	10 mM

Für die Transformation wurden auch kompetente Bakterien verwendet, die von Stratagene (XL-1 Blue, *Sure Ultracompetent cells*) bezogen wurden. Die Transformation wurde nach den jeweiligen Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Klonierung und Transformation der im Rahmen der SSH-Methode erzeugten Plasmide in Bakterien wurde der *Zero Blunt-PCR Cloning Kit* von Life Technologies/Invitrogen verwendet. Dieser Vektor erlaubt eine effiziente Klonierung von Fragmenten mit glatten Enden und wurde mittels Kalziumchlorid-Transformation in kompetente Bakterien des *E. coli* Stammes TOPO 10 (Life Technologies/Invitrogen) eingebracht. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Platten, welche mit Kanamycin versetzt worden waren, ausgestrichen. Alle Schritte wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.2.6.8. Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden als *Primer* für die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Sie wurden von MWG-Biotech bzw. von Herrn Linzner (Institut für Pathologie, GSF, Neuherberg) hergestellt.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Bindungsorte	T _{Hyb} [°C]
Oligo(dT) ₁₅ - <i>Primer</i>	TTTTTTTTTTTTTTTT	poly(A) ⁺ -RNA	37
M13F- <i>Primer</i> (-20)	GTAAAACGACGGCCAG	<i>lac Z</i>	68
M13R- <i>Primer</i>	CAGGAAACAGCTATGAC	<i>lac Z</i>	68
T3- <i>Primer</i>	ATTAACCCTCACTAAAG	<i>lac Z</i>	52
T7- <i>Primer</i>	AATACGACTCACTATAG	<i>lac Z</i>	52
OGT-5'- <i>Primer</i>	GTCTTCCCAGAGTTTGCTGCTGC C	2727-2751 (cDNA) ACC: NP_003596	57
OGT-3'- <i>Primer</i>	CCCGCGAGCTTTACTCGAAAAC G	3593-3617 (cDNA) ACC: NP_003596	57
cDNA-Synthese <i>Primer</i> (SSH)	TTTTGTACAAGCTT ₃₀ N ₁ N	poly(A) ⁺ -RNA	42
Adaptor 1 (SSH)	CTAATACGACTCACTATAGGGC- TCGAGCGGCCCGCCCGGGCA GGT	<i>Rsa</i> / geschnittene cDNA	16
PCR <i>Primer</i> 1 (SSH)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	Adaptor 1 und 2R (SSH)	66
Nested PCR <i>Primer</i> 1 (SSH)	TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT	Adaptor 1 (SSH)	68

Adaptor 2R	CTAATACGACTCACTATAGGGC- AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT	<i>Rsa</i> / geschnittene cDNA	16
Nested PCR <i>Primer 2</i> (SSH)	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT	Adaptor 2R (SSH)	68
GAPDH-5'- <i>Primer</i> (SSH)	ACCACAGTCCATGCCATCAC	GAPDH-Gen	65
GAPDH-3'- <i>Primer</i> (SSH)	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	GAPDH-Gen	65
GAPDH-5'- <i>Primer</i> (RT-PCR)	AGCCACATCGCTCAGAACAC	GAPDH-Gen	57
GAPDH-3'- <i>Primer</i> (RT-PCR)	GTTCTAGTAGTCGTTACGGAG	GAPDH-Gen	57

T_{Hyb} = Für die PCR verwendete Hybridisierungstemperatur der Primer

5.2.6.9. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde unter anderem eingesetzt, um in Plasmiden klonierte cDNA-Fragmente der SSH nachzuweisen und stellte somit eine Alternative zum Nachweis mittels der Restriktion mit Endonukleasen dar. Hierzu wurden vorwiegend die *Primer M13 Forward* (M13F) und *M13 Reverse* (M13R) zur Amplifikation der cDNA-Insertionen verwendet.

Die DNA-Menge für jeden Reaktionsansatz betrug 1 ng/ μ l.

Standard-Ansatz:

DNA	5,0 μ l
10 x PCR-Puffer	2,0 μ l
M13F (10 μ M)	0,6 μ l
M13R (10 μ M)	0,6 μ l
dNTP's (10 μ M)	0,4 μ l
H ₂ O	11,2 μ l
KlenTaq-Polymerase (5 U/ml)	0,2 μ l

Amplifikationsreaktion:

Denaturierung	94°C	1 min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	30 sek	}23 Zyklen
Hybridisierung	68°C	3 min	
Kettenverlängerung	68°C	3 min	1 Zyklus

5.2.6.10. Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde zum Nachweis von OGT-mRNA eingesetzt. Hierzu wurden 1 µg gesamtzelluläre RNA in eine reverse Transkription mit 0,5 µg Oligo-dT₁₅-Primer (Promega) und 15 Units AMV-Reverse Transkriptase (Promega) eingesetzt (10 min RT, 1 h 42°C, 10 min 95°C). Die nachfolgende PCR wurde mit 0,4 U DyNAzyme I als DNA-Polymerase unter Zusatz von OGT-Primern oder GAPDH-Primern in einer Konzentration von jeweils 5 pM in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Die Reaktion wurde für OGT nach 30 Zyklen und für GAPDH nach 28 Zyklen beendet. Als Negativkontrolle wurde einem Ansatz keine cDNA zugesetzt. Anschließend wurden die PCR-Produkte in einem 2%-igen Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt, unter UV-Licht nachgewiesen und photographiert.

Denaturierung:	95°C	30 sek	1 Zyklus
Denaturierung:	95°C	30 sek	} 28-30 Zyklen
Hybridisierung:	57°C	45 sek	
Kettenverlängerung:	72°C	5 min	1 Zyklus

5.2.6.11. SSH-Methode

Mit der *suppressed subtractive hybridization* (SSH)-Methode ist es möglich, auf RNA-Ebene Gene zu identifizieren, welche in einer Zellpopulation im Vergleich zu einer anderen differentiell

exprimiert werden. Eingesetzt wurde der *PCR-Select cDNA Subtraction Kit* (Clontech), den Angaben des Herstellers entsprechend.

Aus 2 µg angereicherte Poly (A)-RNA (Kap.: 5.2.7.2) wurde mit dem cDNA-Synthese Primer eine einzelsträngige cDNA synthetisiert, dann der zweite Strang mit der DNA-Polymerase I. Die doppelsträngige DNA wurde der Restriktion mit Rsa I (Kap.: 5.2.5.4.1) unterzogen, um kurze cDNA-Stücke mit glatten Enden zu erhalten. Es erfolgte die Ligation (T₄-DNA-Ligase) mit spezifischen Oligonukleotiden (Kap.: 5.2.6.8, Adaptoren) an die 5'-Enden der cDNA und zwei Hybridisierungs-Schritte. Durch eine PCR-Reaktion mit Primern, die an die Adaptorsequenzen binden, wurden differentiell exprimierte cDNA-Fragmente amplifiziert. Diese wurden nach einer weiteren Restriktion mit Rsa I (Kap.: 5.2.5.4.1) zur Abtrennung der Adaptoren und einer anschließenden Reinigung mit dem *PCR-Purification-Kit* in den Vektor *PCR-Blunt* eingesetzt und die erhaltenen Plasmide in Bakterien (TOPO 10) transformiert (Kap.: 5.2.6.7.4).

Synthese einzelsträngiger cDNA:

Poly A ⁺ RNA (2µg)	4 µl
Inkubation bei 70°C, 2 min	
5 x Puffer	2 µl
dNTPs (je 10mM)	1 µl
H ₂ O	1 µl
AMV (2 U/µl)	1 µl
Inkubation bei 42°C, 1,5 h	

Synthese doppelsträngiger DNA:

einzelstr. cDNA	10 µl
Puffer	16,0 µl
H ₂ O	48,4 µl
dNTPs (je 10 mM)	1,6 µl
20 x Enzymcocktail	4,0 µl
Inkubation bei 16°C, 2 h	
T4 DNA Polymerase	2 µl
Inkubation bei 16 °C, 30 min	

Adaptorligation:

cDNA	2 µl
Adaptor 1 oder 2 (10 µM)	2 µl
H ₂ O	3 µl
5 x Ligationspuffer	2 µl
T4 DNA Ligase (400 U/µl)	1 µl
Inkubation bei 16 °C über Nacht, stop bei 72°C, 5 min	

Hybridisierung:

cDNA	2,5 µl
Adaptorligierte DNA	0,5 µl
4 x Hybridisierungspuffer	1,0 µl
Inkubation bei 98 °C, 1,5 min, dann bei 68 °C, 16 h bzw. 22 h (3.7.1.1.1)	

PCR:Zyklen:

H ₂ O	18,5 µl	11 Zyklen	
10 x PCR-Puffer	2,5 µl	94 °C	10 sec
<i>Nested</i> Primer 1 (10 µM)	1,0 µl	68 °C	30 sec
<i>Nested</i> Primer 2 (10 µM)	1,0 µl	72 °C	1,5 min
dNTPs (10 mM)	0,5 µl		
50 x cDNA Polymerase	0,5 µl		

5.2.6.12. Southern blot-Analyse**5.2.6.12.1. Kapillar-Transfer der DNA auf Nitrozellulosemembranen**

Die *Southern blot*-Analyse diente zur Identifizierung differentiell exprimierter Sequenzen aus der SSH-Methode. Zuerst wurde das Agarosegel mit den elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten 45 min in Denaturierungslösung inkubiert, kurz in H₂O_{bidest} gewaschen, danach noch zweimal 30 min in Neutralisationslösung neutralisiert und einmal 30 min in 10 x SSC inkubiert. Um zwei identische Membranen zu erzeugen, wurde ein Kapillar-Doppelblot durchgeführt. Hierzu wurden die Nitrozellulosemembranen (BioRad Zeta-Probe), Whatmanfilter und *Gel-Blotting-Papier* (Schleicher & Schüll) entsprechend der Abbildung 23 angeordnet und über Nacht mit einem Gewicht beschwert, so daß die denaturierte DNA durch Kapillarkräfte aus dem Gel gleichermaßen auf beide Membranen transferiert wurde. Die Membranen wurden dann kurz in 2 x SSC und H₂O_{bidest} gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde mittels UV-Licht (2 min, 312 nm) auf den Membranen fixiert.

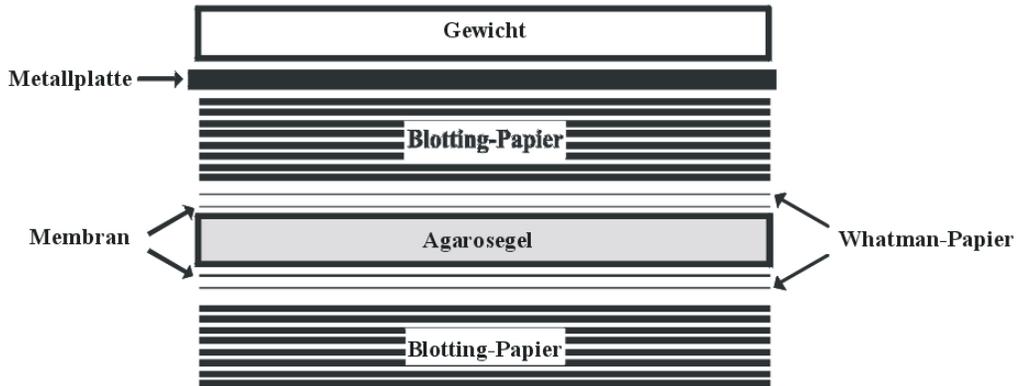


Abbildung 23: Schematischer Aufbau eines Kapillar-Doppelblots zur Anfertigung eines *Southern blots*.

Denaturierungslösung:

NaCl	175,3 g
10 N NaOH	100 ml
ad 2 l H ₂ O _{bidest}	

Neutralisierungslösung:

1 M Tris (pH 7,4)	242,0 g
NaCl	175,3 g
ad 2 l H ₂ O _{bidest}	

5.2.6.12.2. Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschung der Filter

Bei der Prähybridisierung wurden vor der Zugabe der radioaktiven Sonde unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Hierzu wurden die Hybridisierungsmembranen in 20 ml Prähybridisierungslösung in Plastikschaalen 2 h bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Zur Hybridisierung wurde eine identische Lösung verwendet, die zusätzlich eine radioaktiv markierte, hitzedenaturierte (10 min, 100°C) Probe (Kap.: 5.2.6.9) enthielt (spezifische Aktivität >

8 x 10⁸ cpm/μg DNA, eingesetzte Menge 2 x 10⁶ cpm/ml). Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 60°C durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurden die Filter mehrmals in Waschpuffer gewaschen (zweimal 10 min bei RT, zweimal 20 min bei 65°C, einmal 20 min bei 65°C in einer 1 : 5 Verdünnung des Waschpuffers. Zur Autoradiographie wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt, BioMax MR-Filme von KODAK aufgelegt und bei -70°C exponiert.

Phosphatpuffer:

1 M Na ₂ HPO ₄	77,4 ml
1 M NaH ₂ PO ₄	22,6 ml

Prähybridisierungslösung:

Phosphatpuffer	10 ml
SDS 14%	10 ml

Waschpuffer:

20 x SSC	200 ml
10% SDS	200 ml
ad 2 l H ₂ O _{bidest}	

5.2.6.13. Herstellung radioaktiv markierter Sonden

5.2.6.13.1. Radioaktive Markierung von DNA

Markierung mittels Primerverlängerung:

Radioaktiv markierte Sonde wurde mit dem *High Prime Kit* (Roche Diagnostics) unter dem Einbau von radioaktiv markierten α-[³²P]-dCTP hergestellt. Als Primer dienten Random-Primer

Ansatz:

DNA	25 ng (11 µl) denaturiert (100°C, 10 min)
<i>High-Prime</i> -Lösung	4 µl
α -[³² P]-dCTP	5 µl (50 µCi) , spezifische Aktivität: 3000 Ci/mM

Der Ansatz wurde in einem Wasserbad bei 37°C 60 min inkubiert, anschließend abzentrifugiert und mit 80 µl H₂O_{bidest} verdünnt und auf Eis gestellt.

Markierung mittels PCR (*Southern blot*-Analyse):

Hierbei wurde zuerst eine nicht-radioaktive PCR angesetzt (siehe 5.2.6.9.) um spezifisch die gewünschte cDNA zu amplifizieren. Dieser PCR-Ansatz wurde dann 1:1000 verdünnt und das erhaltene Fragment in einer zweiten PCR unter Zusatz von α -[³²P]-dCTP radioaktiv markiert.

Ansatz für PCR zur radioaktiven Markierung:

DNA-Lösung (1:1000)	5,0 µl
dATP(10 mM)	1,0 µl
dGTP(10 mM)	1,0 µl
dTTP(10 mM)	1,0 µl
dCTP(0,1 mM)	3,7 µl
α -[³² P]-dCTP (spezifischeAktivität 3000 Ci/mM)	7,0 µl
<i>Primer</i> M13R (10 µM)	0,6 µl
<i>Primer</i> M13F (10 µM)	0,6 µl
10 x PCR-Puffer	4,0 µl
H ₂ O	15,7 µl
KlenTaq-Polymerase (5 U/ml)	0,4 µl

Amplifikationsreaktion:

Für die PCR wurden die gleichen Bedingungen eingesetzt wie bei der nicht-radioaktiven PCR (siehe 5.2.6.9). Die Zyklenzahl wurde jedoch auf 30 erhöht. Nach der Reaktion wurde das Volumen auf 100 µl mit H₂O_{bidest} aufgefüllt.

5.2.6.13.2. Reinigung der radioaktiv markierten Sonden

Vor der Hybridisierung wurden nicht eingebaute dNTPs in einem Reinigungsschritt abgetrennt. Für die Reinigung wurden *Bio-Spin* Polyacrylamidgel-Zentrifugationssäulchen mit einer Ausschlußgrenze von 20 bp von BioRad eingesetzt.

Die Zentrifugationssäulchen wurden 2 min bei 1000 x g (Biofuge) zentrifugiert, um den Puffer zu entfernen. Anschließend wurde die 100 µl Lösung mit radioaktiv markierter DNA auf die Säule gegeben und nochmals 4 min bei 1000 x g (Biofuge) zentrifugiert. Dabei wurden nicht eingebaute dNTPs in der Gelmatrix zurückgehalten und mit der Säule verworfen, die größeren, radioaktiv markierten DNA-Moleküle lagen im Eluat vor.

5.2.6.13.3. Bestimmung der spezifischen Aktivität radioaktiv markierter DNA

Nach der Reinigung wurde 1 µl der DNA-haltigen Lösung entnommen, mit 10 ml Szintillationslösung gemischt und im Szintillationszähler die Zerfälle pro Minute (cpm) gemessen. Radioaktiv markierte cDNA-Fragmente, die eine spezifische Aktivität von mehr als 1×10^8 cpm/µg DNA aufwiesen, wurden für die Hybridisierung eingesetzt.

5.2.7. RNA-Technologie

5.2.7.1. Isolierung gesamtzellulärer RNA aus eukaryontischen Zellen

Die RNA-Isolierung wurde mit dem *RNeasy-Mini-Kit* (Qiagen) zur Isolierung von maximal 100 µg RNA bzw. mit dem *RNeasy-Midi-Kit* (Qiagen) zur Isolierung von bis zu 1 mg RNA dem Herstellerprotokoll entsprechend durchgeführt.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (500 x g Biofuge, 10 min) sedimentiert und pro 5×10^5 Zellen 700 µl RLT-Puffer (beinhaltet Guanidinthiocyanat und β -Mercaptoethanol) zugegeben und das Zellpellet vollständig resuspendiert. Zur vollständigen Homogenisation wurde die Probe durch eine *Shredder*-Säule (Mini-Kit) zentrifugiert, bzw. 5 - 10 mal durch eine Spritze mit einer Kanüle (\varnothing 0,9 mm) gepreßt (Midi-Kit). Das homogenisierte Lysat wurde mit einem Volumenanteil 70%-igem Ethanol versetzt, auf ein Säule aufgetragen und zentrifugiert. Die Gesamt-RNA ist an die Membran der Säule gebunden. Nach mehrfachem Waschen, erfolgte die Elution mit RNase-freiem Wasser.

5.2.7.2. Isolierung polyadenylierter RNA aus gesamtzellulärer RNA

Ein Charakteristikum der *Messenger*-RNA (mRNA) ist das 3'-poly(A)-Ende, anhand dessen sie aus gesamtzellulärer RNA mittels Oligo(dT)-Zellulose-Chromatographie angereichert werden kann. Hierzu wurde der *mRNA Separator Kit* (Clontech) eingesetzt und entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Mit diesem, auf einer Säulenchromatographischen Reinigung basierenden Kit wurde aus 1 mg gesamtzellulärer RNA 15 - 25 µg mRNA gewonnen. Pro Säule wurde 1 - 3 mg gesamtzelluläre RNA aufgetragen.

Die Säulen wurden durch Zugabe von Hochsalz-Puffer und anschließender Zentrifugation äquilibriert. Die gesamtzelluläre RNA wurde in einem 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA denaturiert (70°C, 6 min), mit Hochsalz-Puffer vermischt und auf die Säule aufgetragen. Unter Hochsalzbedingungen bindet das 3'-poly(A)-Ende der mRNA an die Oligo(dT)-Zellulose. Ungebundene RNA wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Nach mehrfachem Waschen der Säule mit Hochsalz- und Niedrigsalz-Puffern erfolgte die Elution der mRNA mit Puffer ohne Salzzusatz bei 65°C. Aus dem Eluat wurde die mRNA mit Kaliumacetat und Ethanol gefällt.

5.2.7.3 Nichtdenaturierende Elektrophorese von RNA

Um die Intaktheit von RNA-Präparationen zu kontrollieren, wurde die RNA in einem nichtdenaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Unter nichtdenaturierenden Bedingungen ist das Laufverhalten der RNA von ihrer Größe und ihrer Sekundärstruktur abhängig. Hierzu wurden 2 µl RNA mit 2 µl H₂O_{DEPC} und 2 µl RNA-Auftragspuffer vermischt und der Ansatz auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (5.2.6.5) verwendet.

RNA-Auftragspuffer:

Bromphenolblaulösung (0,5%)	0,5 ml
Ficoll	1,25 g
ad 5 ml H ₂ O _{DEPC}	

5.2.7.4. Northern blot-Analyse

5.2.7.4.1. Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA

Da RNA starke Sekundärstrukturen ausbildet, die das Laufverhalten während der Elektrophorese beeinflussen, erfolgte die Elektrophorese für die *Northern blot*-Analyse unter denaturierenden Bedingungen. Hierzu wurde die Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese eingesetzt, die wie folgt durchgeführt wurde:

1 g Agarose wurde in 72 ml H₂O_{DEPC} durch Kochen vollständig gelöst. Anschließend wurden 10 ml 10 x RB-Puffer (unter Rühren) zugegeben. Nachdem die Lösung auf 70°C abgekühlt war, wurden 18 ml Formaldehyd zugesetzt und das Gel in eine vertikale Gelapparatur gegossen. Die RNA wurde mit 2 Volumen 100%-igem Ethanol gemischt und im Vakuum getrocknet, danach in 20 µl Puffer I aufgenommen und 5 min auf 80°C erhitzt. Die denaturierte RNA wurde auf Eis gekühlt, mit 4 µl RNA-Auftragspuffer (Kap.: 5.2.7.3.) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde über 1,5 - 2 h bei 30 mA und 4°C durchgeführt.

RB-Puffer (10 x):

MOPS	41,86 g
2 M Natriumacetat (pH 7,0)	25 ml
0,5 M EDTA	2 ml
ad 1000 ml H ₂ O _{DEPC}	

Nach dem Autoklavieren mit 12 - 17 ml 4N NaOH pH-Wert auf 7,0 einstellen.

Formamid (deionisiert):

Formamidlösung	100 ml
<i>Mixed bed resin</i> (SIGMA)	10 g

1 h bei RT rühren, anschließend filtrieren und bei 4°C lagern.

Puffer I:

Formamid (deionisiert)	200 µl
Formaldehyd (37%)	70 µl
10 x RB-Puffer	40 µl
Ethidiumbromid (0,5 mg/ml)	14 µl
H ₂ O _{DEPC}	76 µl

5.2.7.4.2. Transfer der RNA auf Nylonmembranen

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 10 min in H₂O_{DEPC} und 10 min in 10 x SSC gewaschen und nachfolgend die RNA 10 min in 50 mM NaOH denaturiert. Der Transfer der RNA auf eine Hybond-N⁺-Membran, die zuvor kurz in H₂O_{DEPC} und 10 x SSC eingelegt worden war, wurde dann mit 10 x SSC in einer *Vakuum-Blot*-Apparatur (Millipore) 2 h bei einem Unterdruck von 30 – 40 mbar durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in H₂O_{DEPC} gewaschen und anschließend getrocknet. Zur Fixierung der RNA wurde die Membran 5 min mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm bestrahlt. Durch das im Puffer I enthaltene Ethidiumbromid, in welchem die RNA zur Gelelektrophorese aufgenommen wurde, konnten unter UV-Licht bei intakter gesamtzellulärer RNA die angefärbten Banden der 28 S- und 18 S- rRNA im Intensitätsverhältnis 2 : 1 nachgewiesen werden. Diese Banden wurden als Molekulargewichtsmarker auf der Membran markiert, wobei die 28 S- rRNA ca. 5025 bp entspricht und die 18 S- rRNA ca. 1868 bp.

5.2.7.4.3. Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschung

Durch die Prähybridisierung wurden vor der Zugabe der radioaktiven Probe unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Hierzu wurde die Hybridisierungsmembran mit 10 ml Prähybridisierungslösung in ein Inkubationsröhrchen gegeben und über Nacht bei 42°C im Wärmeschrank inkubiert. Zur Hybridisierung wurde eine identische Lösung verwendet, die jedoch zusätzlich eine entsprechende radioaktiv markierte, hitzedenaturierte (10 min, 100°C) Probe (spezifische Aktivität 5 - 8 x 10⁸ cpm/µg DNA, eingesetzte Menge 1-2 x 10⁶ cpm/ml) enthält. Die Hybridisierung wurde ebenfalls über Nacht bei 42°C durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zweimal 10 min bei Raumtemperatur in Waschlösung I und anschließend zweimal 20 min bei 50°C in Waschlösung II gewaschen. Zur Autoradiographie

wurden *BioMax MR* Filme von Kodak verwendet, wobei die Exposition bei -70°C durchgeführt wurde.

Prähybridisierungslösung:

20 x SSC	2,5 ml
H ₂ O _{DEPC}	2,5 ml
Formamid (deionisiert)	5,0 ml
Dextransulfat	1,0 g

Die angegebenen Komponenten wurden gemischt und vollständig gelöst, anschließend erfolgte die Zugabe von 286 μl Natriumsarcosyl, 150 μl hitzedenaturierter (10 min, 100°C), sonifizierter, einzelsträngiger Heringsspermien-DNA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 150 μl hitzedenaturierter t-RNA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Waschlösung I:

20 x SSC	200 ml
Natriumsarcosyl	28 ml
ad 2 l mit H ₂ O _{DEPC}	

Waschlösung II:

20 x SSC	10 ml
Natriumsarcosyl	6 ml
ad 2 l mit H ₂ O _{DEPC}	

5.2.7.4.4. Strip-wash

Zur Entfernung der spezifisch gebundenen radioaktiven Probe wurde die Membran nach der Autoradiographie 20 min in 0,01% SDS/0,01 x SSC gekocht.

6. Literatur

- 1) Abraham, M., Shapiro, S., Lahat, N., and Miller, A. (2002). The role of IL-18 and IL-12 in the modulation of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in monocytic cells. *Int Immunol* 14, 1449-1457.
- 2) Acevedo, M., Sprecher, D. L., Calabrese, L., Pearce, G. L., Coyner, D. L., Halliburton, S. S., White, R. D., Sykora, E., Kondos, G. T., and Hoff, J. A. (2002). Pilot study of coronary atherosclerotic risk and plaque burden in HIV patients: 'a call for cardiovascular prevention'. *Atherosclerosis* 163, 349-354.
- 3) Ackerman, A. B. (1979). Subtle clues to diagnosis by conventional microscopy. The patch stage of Kaposi's sarcoma. *Am J Dermatopathol* 1, 165-172.
- 4) Albini, A., Barillari, G., Benelli, R., Gallo, R. C., and Ensoli, B. (1995). Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4838-4842.
- 5) Albini, A., Ferrini, S., Benelli, R., Sforzini, S., Giunciuglio, D., Aluigi, M. G., Proudfoot, A. E., Alouani, S., Wells, T. N., Mariani, G., *et al.* (1998). HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13153-13158.
- 6) Albini, A., Fontanini, G., Masiello, L., Tacchetti, C., Bigini, D., Luzzi, P., Noonan, D. M., and Stetler-Stevenson, W. G. (1994). Angiogenic potential in vivo by Kaposi's sarcoma cell-free supernatants and HIV-1 tat product: inhibition of KS-like lesions by tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *AIDS* 8, 1237-1244.
- 7) Albini, A., Soldi, R., Giunciuglio, D., Giraudo, E., Benelli, R., Primo, L., Noonan, D., Salio, M., Camussi, G., Rockl, W., and Bussolino, F. (1996). The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med* 2, 1371-1375.
- 8) Ascherl, G., Hohenadl, C., Schatz, O., Shumay, E., Bogner, J., Eckhart, L., Tschachler, E., Monini, P., Ensoli, B., and Sturzl, M. (1999). Infection with human immunodeficiency virus-1 increases expression of vascular endothelial cell growth factor in T cells: implications for acquired immunodeficiency syndrome-associated vasculopathy. *Blood* 93, 4232-4241.

- 9) Ascherl, G., Sgadari, C., Bugarini, R., Bogner, J., Schatz, O., Ensoli, B., and Stürzl, M. (2001). Serum concentrations of fibroblast growth factor 2 are increased in HIV type 1-infected patients and inversely related to survival probability. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17, 1035-1039.
- 10) Barillari, G., Buonaguro, L., Fiorelli, V., Hoffman, J., Michaels, F., Gallo, R. C., and Ensoli, B. (1992). Effects of cytokines from activated immune cells on vascular cell growth and HIV-1 gene expression. Implications for AIDS-Kaposi's sarcoma pathogenesis. *J Immunol* 149, 3727-3734.
- 11) Barillari, G., Gendelman, R., Gallo, R. C., and Ensoli, B. (1993). The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7941-7945.
- 12) Barillari, G., Sgadari, C., Fiorelli, V., Samaniego, F., Colombini, S., Manzari, V., Modesti, A., Nair, B. C., Cafaro, A., Stürzl, M., and Ensoli, B. (1999a). The Tat protein of human immunodeficiency virus type-1 promotes vascular cell growth and locomotion by engaging the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins and by mobilizing sequestered basic fibroblast growth factor. *Blood* 94, 663-672.
- 13) Barillari, G., Sgadari, C., Palladino, C., Gendelman, R., Caputo, A., Morris, C. B., Nair, B. C., Markham, P., Nel, A., Stürzl, M., and Ensoli, B. (1999). Inflammatory cytokines synergize with the HIV-1 Tat protein to promote angiogenesis and Kaposi's sarcoma via induction of basic fibroblast growth factor and the alpha v beta 3 integrin. *J Immunol* 163, 1929-1935.
- 14) Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H. A., Mantovani, A., and Marme, D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87, 3336-3343.

- 15) Benelli, R., Barbero, A., Ferrini, S., Scapini, P., Cassatella, M., Bussolino, F., Tacchetti, C., Noonan, D. M., and Albini, A. (2000). Human immunodeficiency virus transactivator protein (Tat) stimulates chemotaxis, calcium mobilization, and activation of human polymorphonuclear leukocytes: implications for Tat-mediated pathogenesis. *J Infect Dis* 182, 1643-1651.
- 16) Beral, V., Peterman, T. A., Berkelman, R. L., and Jaffe, H. W. (1990). Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet* 335, 123-128.
- 17) Berkhout, B., and Jeang, K. T. (1989). trans activation of human immunodeficiency virus type 1 is sequence specific for both the single-stranded bulge and loop of the trans-acting-responsive hairpin: a quantitative analysis. *J Virol* 63, 5501-5504.
- 18) Berman, J. S., Beer, D. J., Theodore, A. C., Kornfeld, H., Bernardo, J., and Center, D. M. (1990). Lymphocyte recruitment to the lung. *Am Rev Respir Dis* 142, 238-257.
- 19) Blagosklonny, M. V., An, W. G., Melillo, G., Nguyen, P., Trepel, J. B., and Neckers, L. M. (1999). Regulation of BRCA1 by protein degradation. *Oncogene* 18, 6460-6468.
- 20) Bonnet, F., Morlat, P., Chene, G., Mercie, P., Neau, D., Chossat, I., Decoin, M., Djossou, F., Beylot, J., and Dabis, F. (2002). Causes of death among HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy, Bordeaux, France, 1998-1999. *HIV Med* 3, 195-199.
- 21) Boyce, J. A., Mellor, E. A., Perkins, B., Lim, Y. C., and Luscinikas, F. W. (2002). Human mast cell progenitors use alpha4-integrin, VCAM-1, and PSGL-1 E- selectin for adhesive interactions with human vascular endothelium under flow conditions. *Blood* 99, 2890-2896.
- 22) Breen, E. C. (2002). Pro- and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol Ther* 95, 295-304.
- 23) Breen, E. C., Rezai, A. R., Nakajima, K., Beall, G. N., Mitsuyasu, R. T., Hirano, T., Kishimoto, T., and Martinez-Maza, O. (1990). Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. *J Immunol* 144, 480-484.

- 24) Brown, L. F., Detmar, M., Claffey, K., Nagy, J. A., Feng, D., Dvorak, A. M., and Dvorak, H. F. (1997). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *Exs* 79, 233-269.
- 25) Bussolino, F., Mitola, S., Serini, G., Barillari, G., and Ensoli, B. (2001). Interactions between endothelial cells and HIV-1. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 371-390.
- 26) Calabrese, L. H., Estes, M., Yen-Lieberman, B., Proffitt, M. R., Tubbs, R., Fishleder, A. J., and Levin, K. H. (1989). Systemic vasculitis in association with human immunodeficiency virus infection. *Arthritis Rheum* 32, 569-576.
- 27) Caruso, A., Gonzales, R., Stellini, R., Scalzini, A., Peroni, L., and Turano, A. (1990). Interferon-gamma marks activated T lymphocytes in AIDS patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6, 899-904.
- 28) Carvalho-Tavares, J., Hickey, M. J., Hutchison, J., Michaud, J., Sutcliffe, I. T., and Kubes, P. (2000). A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor- α -induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res* 87, 1141-1148.
- 29) Chachoua, A., Krigel, R., Lafleur, F., Ostreicher, R., Speer, M., Laubenstein, L., Wernz, J., Rubenstein, P., Zang, E., and Friedman-Kien, A. (1989). Prognostic factors and staging classification of patients with epidemic Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol* 7, 774-780.
- 30) Chang, H. C., Samaniego, F., Nair, B. C., Buonaguro, L., and Ensoli, B. (1997). HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *AIDS* 11, 1421-1431.
- 31) Clauss, M., Weich, H., Breier, G., Knies, U., Rockl, W., Waltenberger, J., and Risau, W. (1996). The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 271, 17629-17634.

- 32) Cohen, T., Gitay-Goren, H., Sharon, R., Shibuya, M., Halaban, R., Levi, B. Z., and Neufeld, G. (1995). VEGF121, a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell-surface heparan sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human melanoma cells. *J Biol Chem* 270, 11322-11326.
- 33) Cohen, T., Gluzman-Poltorak, Z., Brodzky, A., Meytal, V., Sabo, E., Misselevich, I., Hassoun, M., Boss, J. H., Resnick, M., Shneyvas, D., *et al.* (2001). Neuroendocrine cells along the digestive tract express neuropilin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 395-403.
- 34) Corallini, A., Altavilla, G., Pozzi, L., Bignozzi, F., Negrini, M., Rimessi, P., Gualandi, F., and Barbanti-Brodano, G. (1993). Systemic expression of HIV-1 tat gene in transgenic mice induces endothelial proliferation and tumors of different histotypes. *Cancer Res* 53, 5569-5575.
- 35) Cornali, E., Zietz, C., Benelli, R., Weninger, W., Masiello, L., Breier, G., Tschachler, E., Albini, A., and Sturzl, M. (1996). Vascular endothelial growth factor regulates angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* 149, 1851-1869.
- 36) Crow, M., Taub, D. D., Cooper, S., Broxmeyer, H. E., and Sarris, A. H. (2001). Human recombinant interferon-inducible protein-10: intact disulfide bridges are not required for inhibition of hematopoietic progenitors and chemotaxis of T lymphocytes and monocytes. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 147-156.
- 37) Cunha-Vaz, J. G., Shakib, M., and Ashton, N. (1966). Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I. On the existence, development, and site of a blood-retinal barrier. *Br J Ophthalmol* 50, 441-453.
- 38) Davis, L. E., Hjelle, B. L., Miller, V. E., Palmer, D. L., Llewellyn, A. L., Merlin, T. L., Young, S. A., Mills, R. G., Wachsman, W., and Wiley, C. A. (1992). Early viral brain invasion in iatrogenic human immunodeficiency virus infection. *Neurology* 42, 1736-1739.
- 39) de Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., and Williams, L. T. (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989-991.

- 40) DeCastro, S., Migliau, G., Silvestri, A., D'Amati, G., Giannantoni, P., Cartoni, D., Kol, A., Vullo, V., and Cirelli, A. (1992). Heart involvement in AIDS: a prospective study during various stages of the disease. *Eur Heart J* 13, 1452-1459.
- 41) Delaire, S., Billard, C., Tordjman, R., Chedotal, A., Elhabazi, A., Bensussan, A., and Boumsell, L. (2001). Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration. *J Immunol* 166, 4348-4354.
- 42) Deng, L., de la Fuente, C., Fu, P., Wang, L., Donnelly, R., Wade, J. D., Lambert, P., Li, H., Lee, C. G., and Kashanchi, F. (2000). Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones. *Virology* 277, 278-295.
- 43) Dhawan, S., Puri, R. K., Kumar, A., Duplan, H., Masson, J. M., and Aggarwal, B. B. (1997). Human immunodeficiency virus-1-tat protein induces the cell surface expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 in human endothelial cells. *Blood* 90, 1535-1544.
- 44) Dhawan, S., Toro, L. A., Jones, B. E., and Meltzer, M. S. (1992). Interactions between HIV-infected monocytes and the extracellular matrix: HIV-infected monocytes secrete neutral metalloproteases that degrade basement membrane protein matrices. *J Leukoc Biol* 52, 244-248.
- 45) Ensoli, B., Barillari, G., Salahuddin, S. Z., Gallo, R. C., and Wong-Staal, F. (1990). Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 345, 84-86.
- 46) Ensoli, B., Buonaguro, L., Barillari, G., Fiorelli, V., Gendelman, R., Morgan, R. A., Wingfield, P., and Gallo, R. C. (1993). Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol* 67, 277-287.

- 47) Ensoli, B., Gendelman, R., Markham, P., Fiorelli, V., Colombini, S., Raffeld, M., Cafaro, A., Chang, H. K., Brady, J. N., and Gallo, R. C. (1994a). Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature* **371**, 674-680.
- 48) Ensoli, B., Sgadari, C., Barillari, G., Sirianni, M. C., Sturzl, M., and Monini, P. (2001). Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer* **37**, 1251-1269.
- 49) Ensoli, B., and Stürzl, M. (1998). Kaposi's sarcoma: a result of the interplay among inflammatory cytokines, angiogenic factors and viral agents. *Cytokine Growth Factor Rev* **9**, 63-83.
- 50) Esser, S., Wolburg, K., Wolburg, H., Breier, G., Kurzchalia, T., and Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* **140**, 947-959.
- 51) Estable, M. C., Bell, B., Merzouki, A., Montaner, J. S., O'Shaughnessy, M. V., and Sadowski, I. J. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat variants from 42 patients representing all stages of infection display a wide range of sequence polymorphism and transcription activity. *J Virol* **70**, 4053-4062.
- 52) Fanales-Belasio, E., Moretti, S., Nappi, F., Barillari, G., Micheletti, F., Cafaro, A., and Ensoli, B. (2002). Native HIV-1 Tat protein targets monocyte-derived dendritic cells and enhances their maturation, function, and antigen-specific T cell responses. *J Immunol* **168**, 197-206.
- 53) Fauci, A. S. (1996) Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Antibiot Chemother* **48**, 4-12.
- 54) Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877.

- 55) Ferrara, N., and Henzel, W. J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 851-858.
- 56) Fiorelli, V., Gendelman, R., Samaniego, F., Markham, P. D., and Ensoli, B. (1995). Cytokines from activated T cells induce normal endothelial cells to acquire the phenotypic and functional features of AIDS-Kaposi's sarcoma spindle cells. *J Clin Invest* 95, 1723-1734.
- 57) Fiorelli, V., Gendelman, R., Sirianni, M. C., Chang, H. K., Colombini, S., Markham, P. D., Monini, P., Sonnabend, J., Pintus, A., Gallo, R. C., and Ensoli, B. (1998). gamma-Interferon produced by CD8+ T cells infiltrating Kaposi's sarcoma induces spindle cells with angiogenic phenotype and synergy with human immunodeficiency virus-1 Tat protein: an immune response to human herpesvirus-8 infection? *Blood* 91, 956-967.
- 58) Fogel, S., Guittaut, M., Legrand, A., Monsigny, M., and Hebert, E. (1999). The tat protein of HIV-1 induces galectin-3 expression. *Glycobiology* 9, 383-387.
- 59) Fujiwara, K., Matsukawa, A., Ohkawara, S., Takagi, K., and Yoshinaga, M. (2002). Functional distinction between CXC chemokines, interleukin-8 (IL-8), and growth related oncogene (GRO) α in neutrophil infiltration. *Lab Invest* 82, 15-23.
- 60) Furie, M. B., Tancinco, M. C., and Smith, C. W. (1991). Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood* 78, 2089-2097.
- 61) Galboiz, Y., Shapiro, S., Lahat, N., and Miller, A. (2002). Modulation of monocytes matrix metalloproteinase-2, MT1-MMP and TIMP-2 by interferon-gamma and -beta: implications to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 131, 191-200.
- 62) Ganju, R. K., Munshi, N., Nair, B. C., Liu, Z. Y., Gill, P., and Groopman, J. E. (1998). Human immunodeficiency virus tat modulates the Flk-1/KDR receptor, mitogen-activated protein kinases, and components of focal adhesion in Kaposi's sarcoma cells. *J Virol* 72, 6131-6137.

- 63) Geier, S. A., Klauss, V., and Goebel, F. D. (1994). Ocular microangiopathic syndrome in patients with acquired immunodeficiency syndrome and its relationship to alterations in cell adhesion and in blood flow. *Ger J Ophthalmol* 3, 414-421.
- 64) Geier, S. A., Perro, C., Klauss, V., Naber, D., Kronawitter, U., Bogner, J. R., Goebel, F. D., Lund, O. E., and Hippius, H. (1993). HIV-related ocular microangiopathic syndrome and cognitive functioning. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6, 252-258.
- 65) Ghorpade, A., Xia, M. Q., Hyman, B. T., Persidsky, Y., Nukuna, A., Bock, P., Che, M., Limoges, J., Gendelman, H. E., and Mackay, C. R. (1998). Role of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 in human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes and microglia. *J Virol* 72, 3351-3361.
- 66) Gibellini, D., Caputo, A., Celeghini, C., Bassini, A., La Placa, M., Capitani, S., and Zauli, G. (1995). Tat-expressing Jurkat cells show an increased resistance to different apoptotic stimuli, including acute human immunodeficiency virus-type 1 (HIV-1) infection. *Br J Haematol* 89, 24-33.
- 67) Gibellini, D., Zauli, G., Re, M. C., Milani, D., Furlini, G., Caramelli, E., Capitani, S., and La Placa, M. (1994). Recombinant human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Tat protein sequentially up-regulates IL-6 and TGF-beta 1 mRNA expression and protein synthesis in peripheral blood monocytes. *Br J Haematol* 88, 261-267.
- 68) Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Shibuya, M., and Neufeld, G. (2001). Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J Biol Chem* 276, 18688-18694.
- 69) Gospodarowicz, D. (1984). Biological activity in vivo and in vitro of pituitary and brain fibroblast growth factor. *Symp Fundam Cancer Res* 37, 109-134.
- 70) Gospodarowicz, D. (1990). Fibroblast growth factor and its involvement in developmental processes. *Curr Top Dev Biol* 24, 57-93.
- 71) Gospodarowicz, D. (1991). Biological activities of fibroblast growth factors. *Ann N Y Acad Sci* 638, 1-8.

- 72) Gospodarowicz, D., Abraham, J. A., and Schilling, J. (1989). Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7311-7315.
- 73) Goudsmit, J., de Wolf, F., Paul, D. A., Epstein, L. G., Lange, J. M., Krone, W. J., Speelman, H., Wolters, E. C., Van der Noordaa, J., Oleske, J. M., and et al. (1986). Expression of human immunodeficiency virus antigen (HIV-Ag) in serum and cerebrospinal fluid during acute and chronic infection. *Lancet* 2, 177-180.
- 74) Gray, F., Gherardi, R., and Scaravilli, F. (1988). The neuropathology of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). A review. *Brain* 111, 245-266.
- 75) Grinde, B., and Seglen, P. O. (1980). Differential effects of proteinase inhibitors and amines on the lysosomal and non-lysosomal pathways of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 632, 73-86.
- 76) Guenzi, E., Töpol, K., Cornali, E., Lubeseder-Martellato, C., Jörg, A., Matzen, K., Zietz, C., Kremmer, E., Nappi, F., Schwemmle, M., et al. (2001). The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J* 20, 5568-5577.
- 77) Hanemaaijer, R., Koolwijk, P., le Clercq, L., de Vree, W. J., and van Hinsbergh, V. W. (1993). Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J* 296 (Pt 3), 803-809.
- 78) Hanover, J. A. (2001). Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. *FASEB J* 15, 1865-1876.
- 79) Hanover, J. A., Yu, S., Lubas, W. B., Shin, S. H., Ragano-Caracciola, M., Kochran, J., and Love, D. C. (2003). Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch Biochem Biophys* 409, 287-297.

- 80) Haraldsen, G., Kvale, D., Lien, B., Farstad, I. N., and Brandtzaeg, P. (1996). Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 156, 2558-2565.
- 81) Harrich, D., Garcia, J., Mitsuyasu, R., and Gaynor, R. (1990). TAR independent activation of the human immunodeficiency virus in phorbol ester stimulated T lymphocytes. *EMBO J* 9, 4417-4423.
- 82) Haverkos, H. W., and Drotman, D. P. (1985). Prevalence of Kaposi's sarcoma among patients with AIDS. *N Engl J Med* 312, 1518.
- 83) Hengge, U.R., Ruzicka, T., Tying, S.K., Stuschke, M., Roggendorf, M., Schwartz, R.A., and Seeber, S. (2002). Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. *Lancet Infect Dis* 2, 344-352.
- 84) Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-439.
- 85) Hofman, F. M., Dohadwala, M. M., Wright, A. D., Hinton, D. R., and Walker, S. M. (1994). Exogenous tat protein activates central nervous system-derived endothelial cells. *J Neuroimmunol* 54, 19-28.
- 86) Hofman, F. M., Wright, A. D., Dohadwala, M. M., Wong-Staal, F., and Walker, S. M. (1993). Exogenous tat protein activates human endothelial cells. *Blood* 82, 2774-2780.
- 87) Holland, G. N., Pepose, J. S., Pettit, T. H., Gottlieb, M. S., Yee, R. D., and Foos, R. Y. (1983). Acquired immune deficiency syndrome. Ocular manifestations. *Ophthalmology* 90, 859-873.
- 88) Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D. W. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5, 1806-1814.

- 89) Huang, L., Bosch, I., Hofmann, W., Sodroski, J., and Pardee, A. B. (1998). Tat protein induces human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) coreceptors and promotes infection with both macrophage-tropic and T-lymphotropic HIV-1 strains. *J Virol* 72, 8952-8960.
- 90) Huang, L., Li, C. J., and Pardee, A. B. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 TAT protein activates B lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 461-464.
- 91) Huang, Y. Q., Friedman-Kien, A. E., Li, J. J., and Nickoloff, B. J. (1993). Cultured Kaposi's sarcoma cell lines express factor XIIIa, CD14, and VCAM-1, but not factor VIII or ELAM-1. *Arch Dermatol* 129, 1291-1296.
- 92) Hughes, C. C., Savage, C. O., and Pober, J. S. (1990). The endothelial cell as a regulator of T-cell function. *Immunol Rev* 117, 85-102.
- 93) Hurwitz, A. A., Berman, J. W., and Lyman, W. D. (1994). The role of the blood-brain barrier in HIV infection of the central nervous system. *Adv Neuroimmunol* 4, 249-256.
- 94) Hwang, S. G., Lee, H. C., Trepel, J. B., and Jeon, B. H. (2002). Anticancer-drug-induced apoptotic cell death in leukemia cells is associated with proteolysis of beta-catenin. *Leuk Res* 26, 863-871.
- 95) Ito, M., Ishida, T., He, L., Tanabe, F., Rongge, Y., Miyakawa, Y., and Terunuma, H. (1998). HIV type 1 Tat protein inhibits interleukin 12 production by human peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14, 845-849.
- 96) Jeang, K. T., Chang, Y., Berkhout, B., Hammarskjold, M. L., and Rekosh, D. (1991). Regulation of HIV expression: mechanisms of action of Tat and Rev. *AIDS* 5 Suppl 2, S3-14.
- 97) Jehn, B. M., Dittert, I., Beyer, S., von der Mark, K., and Bielke, W. (2002). c-Cbl binding and ubiquitin-dependent lysosomal degradation of membrane-associated Notch1. *J Biol Chem* 277, 8033-8040.
- 98) Jih, Y. J., Lien, W. H., Tsai, W. C., Yang, G. W., Li, C., and Wu, L. W. (2001). Distinct regulation of genes by bFGF and VEGF-A in endothelial cells. *Angiogenesis* 4, 313-321.

- 99) Jung, U., Norman, K. E., Scharffetter-Kochanek, K., Beaudet, A. L., and Ley, K. (1998). Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *J Clin Invest* 102, 1526-1533.
- 100) Kalogeris, T. J., Kevil, C. G., Laroux, F. S., Coe, L. L., Phifer, T. J., and Alexander, J. S. (1999). Differential monocyte adhesion and adhesion molecule expression in venous and arterial endothelial cells. *Am J Physiol* 276, L9-L19.
- 101) Karn, J. (1999). Tackling Tat. *J Mol Biol* 293, 235-254.
- 102) Kevil, C. G., and Bullard, D. C. (1999). Roles of leukocyte/endothelial cell adhesion molecules in the pathogenesis of vasculitis. *Am J Med* 106, 677-687.
- 103) Keyt, B. A., Berleau, L. T., Nguyen, H. V., Chen, H., Heinsohn, H., Vandlen, R., and Ferrara, N. (1996). The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 271, 7788-7795.
- 104) Kiernan, R. E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K. T., *et al.* (1999). HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J* 18, 6106-6118.
- 105) Kobayashi, S., Hamamoto, Y., Kobayashi, N., and Yamamoto, N. (1990). Serum level of TNF alpha in HIV-infected individuals. *AIDS* 4, 169-170.
- 106) Krapf, F. E., Herrmann, M., Leitmann, W., Schwartlander, B., and Kalden, J. R. (1990). Circulating immune complexes in HIV-infected persons. *Klin Wochenschr* 68, 299-305.
- 107) Kreppel, L. K., Blomberg, M. A., and Hart, G. W. (1997). Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 272, 9308-9315.
- 108) Kunkel, E. J., and Ley, K. (1996). Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res* 79, 1196-1204.

- 109) Lafrenie, R. M., Wahl, L. M., Epstein, J. S., Hewlett, I. K., Yamada, K. M., and Dhawan, S. (1996). HIV-1-Tat protein promotes chemotaxis and invasive behavior by monocytes. *J Immunol* 157, 974-977.
- 110) Lafrenie, R. M., Wahl, L. M., Epstein, J. S., Hewlett, I. K., Yamada, K. M., and Dhawan, S. (1996a). HIV-1-Tat modulates the function of monocytes and alters their interactions with microvessel endothelial cells. A mechanism of HIV pathogenesis. *J Immunol* 156, 1638-1645.
- 111) Lafrenie, R. M., Wahl, L. M., Epstein, J. S., Yamada, K. M., and Dhawan, S. (1997). Activation of monocytes by HIV-Tat treatment is mediated by cytokine expression. *J Immunol* 159, 4077-4083.
- 112) Lahdevirta, J., Maury, C. P., Teppo, A. M., and Repo, H. (1988). Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 85, 289-291.
- 113) Lefevre, E. A., Krzysiek, R., Loret, E. P., Galanaud, P., and Richard, Y. (1999). Cutting edge: HIV-1 Tat protein differentially modulates the B cell response of naive, memory, and germinal center B cells. *J Immunol* 163, 1119-1122.
- 114) Lennette, E. T., Blackbourn, D. J., and Levy, J. A. (1996). Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* 348, 858-861.
- 115) Lenter, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., and Vestweber, D. (1994). Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells. *J Cell Biol* 125, 471-481.
- 116) Lepe-Zuniga, J. L., Mansell, P. W., and Hersh, E. M. (1987). Idiopathic production of interleukin-1 in acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 25, 1695-1700.
- 117) Ley, K., Bullard, D. C., Arbones, M. L., Bosse, R., Vestweber, D., Tedder, T. F., and Beaudet, A. L. (1995). Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 181, 669-675.

- 118) Lim, S. P., and Garzino-Demo, A. (2000). The human immunodeficiency virus type 1 Tat protein up-regulates the promoter activity of the beta-chemokine monocyte chemoattractant protein 1 in the human astrocytoma cell line U-87 MG: role of SP-1, AP-1, and NF-kappaB consensus sites. *J Virol* 74, 1632-1640.
- 119) Lingen, M. W. (2001). Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 125, 67-71.
- 120) Li-Weber, M., Laur, O., Dern, K., and Krammer, P. H. (2000). T cell activation-induced and HIV tat-enhanced CD95(APO-1/Fas) ligand transcription involves NF-kappaB. *Eur J Immunol* 30, 661-670.
- 121) Lloyd, A. R., Oppenheim, J. J., Kelvin, D. J., and Taub, D. D. (1996). Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. *J Immunol* 156, 932-938.
- 122) Lubas, W. A., Frank, D. W., Krause, M., and Hanover, J. A. (1997). O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 272, 9316-9324.
- 123) Lum, H., and Malik, A. B. (1994). Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 267, L223-241.
- 124) MacPhail, L. A., Dekker, N. P., and Regezi, J. A. (1996). Macrophages and vascular adhesion molecules in oral Kaposi's sarcoma. *J Cutan Pathol* 23, 464-472.
- 125) Mahoney, S. E., Duvic, M., Nickoloff, B. J., Minshall, M., Smith, L. C., Griffiths, C. E., Paddock, S. W., and Lewis, D. E. (1991). Human immunodeficiency virus (HIV) transcripts identified in HIV-related psoriasis and Kaposi's sarcoma lesions. *J Clin Invest* 88, 174-185.
- 126) McArthur, C. P., Wang, Y., Heruth, D., and Gustafson, S. (2001). Amplification of extracellular matrix and oncogenes in tat-transfected human salivary gland cell lines with expression of laminin, fibronectin, collagens I, III, IV, c-myc and p53. *Arch Oral Biol* 46, 545-555.

- 127) McCloskey, T. W., Ott, M., Tribble, E., Khan, S. A., Teichberg, S., Paul, M. O., Pahwa, S., Verdin, E., and Chirmule, N. (1997). Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *J Immunol* 158, 1014-1019.
- 128) McDermott, D. H., and Murphy, P. M. (2000). Chemokines and their receptors in infectious disease. *Springer Semin Immunopathol* 22, 393-415.
- 129) McNutt, N. S., Fletcher, V., and Conant, M. A. (1983). Early lesions of Kaposi's sarcoma in homosexual men. An ultrastructural comparison with other vascular proliferations in skin. *Am J Pathol* 111, 62-77.
- 130) Medrano, F. J., Leal, M., Arienti, D., Rey, C., Zagliani, A., Torres, Y., Sanchez-Quijano, A., Lissen, E., and Clerici, M. (1998). Tumor necrosis factor beta and soluble APO-1/Fas independently predict progression to AIDS in HIV-seropositive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14, 835-843.
- 131) Meng, L., Mohan, R., Kwok, B. H., Elofsson, M., Sin, N., and Crews, C. M. (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10403-10408.
- 132) Merrill, J. E., Koyanagi, Y., and Chen, I. S. (1989). Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha can be induced from mononuclear phagocytes by human immunodeficiency virus type 1 binding to the CD4 receptor. *J Virol* 63, 4404-4408.
- 133) Mitola, S., Soldi, R., Zanon, I., Barra, L., Gutierrez, M. I., Berkhout, B., Giacca, M., and Bussolino, F. (2000). Identification of specific molecular structures of human immunodeficiency virus type 1 Tat relevant for its biological effects on vascular endothelial cells. *J Virol* 74, 344-353.
- 134) Mitola, S., Sozzani, S., Luini, W., Primo, L., Borsatti, A., Weich, H., and Bussolino, F. (1997). Tat-human immunodeficiency virus-1 induces human monocyte chemotaxis by activation of vascular endothelial growth factor receptor-1. *Blood* 90, 1365-1372.

- 135) Monini, P., Colombini, S., Sturzl, M., Goletti, D., Cafaro, A., Sgadari, C., Butto, S., Franco, M., Leone, P., Fais, S., *et al.* (1999). Reactivation and persistence of human herpesvirus-8 infection in B cells and monocytes by Th-1 cytokines increased in Kaposi's sarcoma. *Blood* 93, 4044-4058.
- 136) Monini, P., de Lellis, L., Fabris, M., Rigolin, F., and Cassai, E. (1996). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in prostate tissue and human semen. *N Engl J Med* 334, 1168-1172.
- 137) Montesano, R., Vassalli, J. D., Baird, A., Guillemin, R., and Orci, L. (1986). Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 7297-7301.
- 138) Nakajima, K., Martinez-Maza, O., Hirano, T., Breen, E. C., Nishanian, P. G., Salazar-Gonzalez, J. F., Fahey, J. L., and Kishimoto, T. (1989). Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor-2/IFN-beta 2) production by HIV. *J Immunol* 142, 531-536.
- 139) Nakhoul, N. L., Hering-Smith, K. S., Gambala, C. T., and Hamm, L. L. (1998). Regulation of sodium transport in M-1 cells. *Am J Physiol* 275, F998-F1007.
- 140) Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13, 9-22.
- 141) Neumann, F. J., Ott, I., Marx, N., Luther, T., Kenngott, S., Gawaz, M., Kotzsch, M., and Schomig, A. (1997). Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 3399-3405.
- 142) Neumann, T., Miller, M., Esser, S., Gerken, G., and Erbel, R. (2002). [Atherosclerosis in HIV-positive patients]. *Z Kardiol* 91, 879-888.
- 143) Nickoloff, B. J., and Griffiths, C. E. (1989). The spindle-shaped cells in cutaneous Kaposi's sarcoma. Histologic simulators include factor XIIIa dermal dendrocytes. *Am J Pathol* 135, 793-800.

- 144) Nicosia, R. F., Nicosia, S. V., and Smith, M. (1994). Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* *145*, 1023-1029.
- 145) Nolte, D., and Muller, U. (2002). Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mamm Genome* *13*, 62-64.
- 146) Nottet, H. S., and Gendelman, H. E. (1995a). Unraveling the neuroimmune mechanisms for the HIV-1-associated cognitive/motor complex. *Immunol Today* *16*, 441-448.
- 147) Nuovo, G. J., and Alfieri, M. L. (1996). AIDS dementia is associated with massive, activated HIV-1 infection and concomitant expression of several cytokines. *Mol Med* *2*, 358-366.
- 148) Olivetta, E., Percario, Z., Fiorucci, G., Mattia, G., Schiavoni, I., Dennis, C., Jager, J., Harris, M., Romeo, G., Affabris, E., and Federico, M. (2003). HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappaB activation. *J Immunol* *170*, 1716-1727.
- 149) Park, J. E., Keller, G. A., and Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* *4*, 1317-1326.
- 150) Passalaris, J. D., Sepkowitz, K. A., and Glesby, M. J. (2000). Coronary artery disease and human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* *31*, 787-797.
- 151) Pellicelli, A. M., Palmieri, F., Cicalini, S., and Petrosillo, N. (2001). Pathogenesis of HIV-related pulmonary hypertension. *Ann N Y Acad Sci* *946*, 82-94.
- 152) Penn, I. (1979). Kaposi's sarcoma in organ transplant recipients: report of 20 cases. *Transplantation* *27*, 8-11.
- 153) Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L., and Montesano, R. (1992). Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* *189*, 824-831.

- 154) Perry, V. H., Lawson, L. J., and Reid, D. M. (1994). Biology of the mononuclear phagocyte system of the central nervous system and HIV infection. *J Leukoc Biol* 56, 399-406.
- 155) Petito, C. K. (1988). Review of central nervous system pathology in human immunodeficiency virus infection. *Ann Neurol* 23, S54-57.
- 156) Petito, C. K., and Cash, K. S. (1992). Blood-brain barrier abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome: immunohistochemical localization of serum proteins in postmortem brain. *Ann Neurol* 32, 658-666.
- 157) Petito, C. K., and Roberts, B. (1995). Evidence of apoptotic cell death in HIV encephalitis. *Am J Pathol* 146, 1121-1130.
- 158) Phillips, G. D., Stone, A. M., Jones, B. D., Schultz, J. C., Whitehead, R. A., and Knighton, D. R. (1994). Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 8, 961-965.
- 159) Pober, J. S., and Cotran, R. S. (1990). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70, 427-451.
- 160) Pober, J. S., and Cotran, R. S. (1991). Immunologic interactions of T lymphocytes with vascular endothelium. *Adv Immunol* 50, 261-302.
- 161) Poli, G. (1999). Laureate ESCI award for excellence in clinical science 1999. Cytokines and the human immunodeficiency virus: from bench to bedside. European Society for Clinical Investigation. *Eur J Clin Invest* 29, 723-732.
- 162) Poltorak, Z., Cohen, T., and Neufeld, G. (2000). The VEGF splice variants: properties, receptors, and usage for the treatment of ischemic diseases. *Herz* 25, 126-129.
- 163) Powderly, W. G. (2002). Long-term exposure to lifelong therapies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29 *Suppl 1*, S28-40.

- 164) Presta, M., Moscatelli, D., Joseph-Silverstein, J., and Rifkin, D. B. (1986). Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol Cell Biol* 6, 4060-4066.
- 165) 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, 586-592.
- 166) Quaranta, M. G., Camponeschi, B., Straface, E., Malorni, W., and Viora, M. (1999). Induction of interleukin-15 production by HIV-1 nef protein: a role in the proliferation of uninfected cells. *Exp Cell Res* 250, 112-121.
- 167) Rana, T. M., and Jeang, K. T. (1999). Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys* 365, 175-185.
- 168) Rao, T. K., Filippone, E. J., Nicastrì, A. D., Landesman, S. H., Frank, E., Chen, C. K., and Friedman, E. A. (1984). Associated focal and segmental glomerulosclerosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 310, 669-673.
- 169) Regezi, J. A., MacPhail, L. A., Daniels, T. E., DeSouza, Y. G., Greenspan, J. S., and Greenspan, D. (1993). Human immunodeficiency virus-associated oral Kaposi's sarcoma. A heterogeneous cell population dominated by spindle-shaped endothelial cells. *Am J Pathol* 143, 240-249.
- 170) Rhodes, R. H. (1991). Evidence of serum-protein leakage across the blood-brain barrier in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 50, 171-183.
- 171) Rinaldo, C. R., Jr., Armstrong, J. A., Kingsley, L. A., Zhou, S., and Ho, M. (1990). Relation of alpha and gamma interferon levels to development of AIDS in homosexual men. *J Exp Pathol* 5, 127-132.
- 172) Robinson, C. J., and Stringer, S. E. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114, 853-865.

- 173) Roth, W. K., Brandstetter, H., and Sturzl, M. (1992). Cellular and molecular features of HIV-associated Kaposi's sarcoma. *AIDS* 6, 895-913.
- 174) Roux-Lombard, P., Modoux, C., Cruchaud, A., and Dayer, J. M. (1989). Purified blood monocytes from HIV 1-infected patients produce high levels of TNF alpha and IL-1. *Clin Immunol Immunopathol* 50, 374-384.
- 175) Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238, 491-497.
- 176) Salcedo, R., Wasserman, K., and Patarroyo, M. (1997). Endogenous fibronectin of blood polymorphonuclear leukocytes: stimulus-induced secretion and proteolysis by cell surface-bound elastase. *Exp Cell Res* 233, 33-40.
- 177) Samaniego, F., Markham, P. D., Gendelman, R., Watanabe, Y., Kao, V., Kowalski, K., Sonnabend, J. A., Pintus, A., Gallo, R. C., and Ensoli, B. (1998). Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development. *Am J Pathol* 152, 1433-1443.
- 178) Sastry, K. J., Marin, M. C., Nehete, P. N., McConnell, K., el-Naggar, A. K., and McDonnell, T. J. (1996). Expression of human immunodeficiency virus type I tat results in down-regulation of bcl-2 and induction of apoptosis in hematopoietic cells. *Oncogene* 13, 487-493.
- 179) Scharffetter-Kochanek, K., Lu, H., Norman, K., van Nood, N., Munoz, F., Grabbe, S., McArthur, M., Lorenzo, I., Kaplan, S., Ley, K., *et al.* (1998). Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* 188, 119-131.
- 180) Schmitt-Graff, A., Neuen-Jacob, E., Rettig, B., and Sundmacher, R. (1990). Evidence for cytomegalovirus and human immunodeficiency virus infection of the retina in AIDS. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 416, 249-253.

- 181) Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285, 1569-1572.
- 182) Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J. A., Fiddes, J. C., and Gospodarowicz, D. (1987). Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 325, 257-259.
- 183) Seelmeier, S., Schmidt, H., Turk, V., and von der Helm, K. (1988). Human immunodeficiency virus has an aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6612-6616.
- 184) Shakib, M., and Cunha-Vaz, J. G. (1966). Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. IV. Junctional complexes of the retinal vessels and their role in the permeability of the blood-retinal barrier. *Exp Eye Res* 5, 229-234.
- 185) Sharma, V., Knobloch, T. J., and Benjamin, D. (1995). Differential expression of cytokine genes in HIV-1 tat transfected T and B cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 208, 704-713.
- 186) Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., and Klagsbrun, M. (1984). Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223, 1296-1299.
- 187) Simpson, D. M., and Berger, J. R. (1996). Neurologic manifestations of HIV infection. *Med Clin North Am* 80, 1363-1394.
- 188) Sinicco, A., Biglino, A., Sciandra, M., Forno, B., Pollono, A. M., Raiteri, R., and Giannini, P. (1993). Cytokine network and acute primary HIV-1 infection. *AIDS* 7, 1167-1172.
- 189) Slavin, G., Cameron, H. M., and Singh, H. (1969). Kaposi's sarcoma in mainland Tanzania: a report of 117 cases. *Br J Cancer* 23, 349-357.

- 190) Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-745.
- 191) Southgate, C. D., and Green, M. R. (1991). The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site: implications for Tat function. *Genes Dev* 5, 2496-2507.
- 192) Speth, C., Schabetsberger, T., Mohsenipour, I., Stockl, G., Wurzner, R., Stoiber, H., Lass-Flörl, C., and Dierich, M. P. (2002). Mechanism of human immunodeficiency virus-induced complement expression in astrocytes and neurons. *J Virol* 76, 3179-3188.
- 193) Strelow, L. I., Watry, D. D., Fox, H. S., and Nelson, J. A. (1998). Efficient infection of brain microvascular endothelial cells by an in vivo-selected neuroinvasive SIVmac variant. *J Neurovirol* 4, 269-280.
- 194) Stürzl, M., Brandstetter, H., and Roth, W. K. (1992). Kaposi's sarcoma: a review of gene expression and ultrastructure of KS spindle cells in vivo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 1753-1763.
- 195) Stürzl, M., and Ensoli, B. (1999). Big but weak: how many pathogenic genes does human herpesvirus-8 need to cause Kaposi's sarcoma? (Review). *Int J Oncol* 14, 287-289.
- 196) Stürzl, M., Zietz, C., Monini, P., and Ensoli, B. (2001). Human herpesvirus-8 and Kaposi's sarcoma: relationship with the multistep concept of tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 81, 125-159.
- 197) Tabata, M., Langford, A., Becker, J., and Reichart, P. A. (1993). Distribution of immunocompetent cells in oral Kaposi's sarcoma (AIDS). *Eur J Cancer B Oral Oncol* 29B, 209-213.
- 198) Tanaka, K. (1998). Proteasomes: structure and biology. *J Biochem (Tokyo)* 123, 195-204.

- 199) Tang, M. L., Steeber, D. A., Zhang, X. Q., and Tedder, T. F. (1998). Intrinsic differences in L-selectin expression levels affect T and B lymphocyte subset-specific recirculation pathways. *J Immunol* 160, 5113-5121.
- 200) Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D., and Bohlen, P. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187, 1579-1586.
- 201) Tromp, S. C., oude Egbrink, M. G., Dings, R. P., van Velzen, S., Slaaf, D. W., Hillen, H. F., Tangelder, G. J., Reneman, R. S., and Griffioen, A. W. (2000). Tumor angiogenesis factors reduce leukocyte adhesion in vivo. *Int Immunol* 12, 671-676.
- 202) Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., and Giacca, M. (2001). Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 276, 3254-3261.
- 203) Tyring, S. K., Cauda, R., Tumbarello, M., Ortona, L., Kennedy, R. C., Chanh, T. C., and Kanda, P. (1991). Synthetic peptides corresponding to sequences in HIV envelope gp41 and gp120 enhance in vitro production of interleukin-1 and tumor necrosis factor but depress production of interferon-alpha, interferon-gamma and interleukin-2. *Viral Immunol* 4, 33-42.
- 204) Uccini, S., Sirianni, M. C., Vincenzi, L., Topino, S., Stoppacciaro, A., Lesnoni La Parola, I., Capuano, M., Masini, C., Cerimele, D., Cella, M., *et al.* (1997). Kaposi's sarcoma cells express the macrophage-associated antigen mannose receptor and develop in peripheral blood cultures of Kaposi's sarcoma patients. *Am J Pathol* 150, 929-938.
- 205) Ullum, H., Cozzi Lepri, A., Bendtzen, K., Victor, J., Gotzsche, P. C., Phillips, A. N., Skinhoj, P., and Klarlund Pedersen, B. (1997). Low production of interferon gamma is related to disease progression in HIV infection: evidence from a cohort of 347 HIV-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13, 1039-1046.
- 206) UNAIDS/WHO (2002). UNAIDS/02.46E.

- 207) Verhoef, K., Bauer, M., Meyerhans, A., and Berkhout, B. (1998). On the role of the second coding exon of the HIV-1 Tat protein in virus replication and MHC class I downregulation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14, 1553-1559.
- 208) Vogel, J., Hinrichs, S. H., Reynolds, R. K., Luciw, P. A., and Jay, G. (1988). The HIV tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice. *Nature* 335, 606-611.
- 209) Vrana, J. A., and Grant, S. (2001). Synergistic induction of apoptosis in human leukemia cells (U937) exposed to bryostatin 1 and the proteasome inhibitor lactacystin involves dysregulation of the PKC/MAPK cascade. *Blood* 97, 2105-2114.
- 210) Wang, J., Guan, E., Roderiquez, G., Calvert, V., Alvarez, R., and Norcross, M. A. (2001). Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages. *J Biol Chem* 276, 49236-49243.
- 211) Weich, H. A., Salahuddin, S. Z., Gill, P., Nakamura, S., Gallo, R. C., and Folkmann, J. (1991). AIDS-associated Kaposi's sarcoma-derived cells in long-term culture express and synthesize smooth muscle alpha-actin. *Am J Pathol* 139, 1251-1258.
- 212) Weiss, J. M., Nath, A., Major, E. O., and Berman, J. W. (1999). HIV-1 Tat induces monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte transmigration across a model of the human blood-brain barrier and up-regulates CCR5 expression on human monocytes. *J Immunol* 163, 2953-2959.
- 213) Westendorp, M. O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1995). Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375, 497-500.
- 214) Wu, L., Fan, J., Matsumoto, S., and Watanabe, T. (2000). Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 269, 808-815.

- 215) Xiao, H., Neuveut, C., Tiffany, H. L., Benkirane, M., Rich, E. A., Murphy, P. M., and Jeang, K. T. (2000). Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11466-11471.
- 216) Xiu, R. J., Jun, C., and Berglund, O. (1991). Microcirculatory disturbances in AIDS patients--a first report. *Microvasc Res* 42, 151-159.
- 217) Yago, T., Tsukuda, M., Tajima, H., Nishi, T., Kurata-Miura, K., Ohkubo, J., and Minami, M. (1997). Analysis of initial attachment of B cells to endothelial cells under flow conditions. *J Immunol* 158, 707-714.
- 218) Yamada, K. M., Hasegawa, T., Hasegawa, E., Kennedy, D. W., Hirano, H., Hayashi, M., Akiyama, S. K., and Olden, K. (1984). Fibronectin and interactions at the cell surface. *Prog Clin Biol Res* 151, 1-15.
- 219) Yang, X., Zhang, F., and Kudlow, J. E. (2002). Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell* 110, 69-80.
- 220) Zhang, H., and Issekutz, A. C. (2002). Down-modulation of monocyte transendothelial migration and endothelial adhesion molecule expression by fibroblast growth factor: reversal by the anti-angiogenic agent SU6668. *Am J Pathol* 160, 2219-2230.
- 221) Zhang, H. T., Scott, P. A., Morbidelli, L., Peak, S., Moore, J., Turley, H., Harris, A. L., Ziche, M., and Bicknell, R. (2000). The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br J Cancer* 83, 63-68.
- 222) Zhang, X. W., and Thorlacius, H. (2000). Inhibitory actions of ropivacaine on tumor necrosis factor-alpha- induced leukocyte adhesion and tissue accumulation in vivo. *Eur J Pharmacol* 392, R1-3.
- 223) Ziegler, J. L. (1993). Endemic Kaposi's sarcoma in Africa and local volcanic soils. *Lancet* 342, 1348-1351.

- 224) Zietz, C., Hotz, B., Stürzl, M., Rauch, E., Penning, R., and Löhrs, U. (1996). Aortic endothelium in HIV-1 infection: chronic injury, activation, and increased leukocyte adherence. *Am J Pathol* 149, 1887-1898.

7. Abkürzungen

AIDS	=	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
ALLN	=	N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO
APS	=	Ammoniumpersulfat
As	=	Aminosäure
AWF	=	angiogener Wachstumsfaktor
bFGF	=	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	=	Basenpaar
BSA	=	Rinderserumalbumin
cDNA	=	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
Ci	=	Curie
DEPC	=	Diethylpyrocarbonat
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
dNTP	=	Desoxyribonucleotidphosphat
ds	=	doppelsträngig
DTT	=	Dithiothreitol
EBM	=	Endothelzellbasalmedium
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	=	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	=	Ethanol
EZM	=	extrazelluläre Matrix
FBS	=	fötale Rinderserum
FM	=	<i>full</i> Medium
h	=	Stunde
HAART	=	hoch aktive antiretrovirale Therapie
hEGF	=	<i>human epidermal growth factor</i>
HHV-8	=	humanes Herpes Virus-8
HIV-1	=	<i>human immunodeficiency virus-1</i>
HMVEZ	=	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
H ₂ O _{bidest}	=	entionisiertes Wasser
IFN	=	Interferon
IL	=	Interleukin
i.p.	=	intra peritoneal
IPTG	=	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

IZ	=	Inflammatorische Zytokine
KS	=	Kaposi Sarkom
l	=	Liter
LM	=	<i>low</i> Medium
LB-Medium	=	Luria-Bertani-Medium
M	=	Marker
mA	=	Milliampere
MCP	=	<i>monocyte-chemotaxis-protein</i>
min	=	Minute
MOPS	=	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
OD	=	optische Dichte
PAGE	=	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMZ	=	periphere blutmononukleäre Zellen
PCR	=	Polymerasekettenreaktion
PMSF	=	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	=	Polyvinylidenfluorid
RT	=	Raumtemperatur
RT-PCR	=	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDF	=	<i>stromal derived factor</i>
SDS	=	Natriumsodiumdodecylsulfat
sek	=	Sekunde
ss	=	einzelsträngig
s.c.	=	subcutan
TEMED	=	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TNF	=	Tumornekrosefaktor
tRNA	=	transfer RNA
ün	=	über Nacht (mindestens 16 h)
U	=	Einheit
Upm	=	Umdrehungen pro Minute
UV	=	Ultraviolett
V	=	Volt
VEGF	=	<i>vascular endothelial growth factor</i>
X-Gal	=	5-bromo-6-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktosid
ZNS	=	Zentralnervensystem

8. Lebenslauf und Publikationsliste

Frau Apothekerin Kathrin Matzen (*10.04.1969)

Geburtsort:	Marne/Holstein
Staatsangehörigkeit:	deutsch
1975-79	Grundschule Marne
1979-89	Gymnasium Marne
1989-91	Ausbildung zur chemisch-technischen Assistentin in Oldenburg/Niedersachsen
1991-93	Max-Planck-Institut für Biochemie/Abteilung Bindegewebe in Martinsried
1993-98	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg mit dem Abschluss des 2. Staatsexamen
1998-99	Pharmaziepraktikum im Rahmen des 3. Ausbildungsabschnitts der Approbationsordnung in der Oleander-Apotheke in München unter der Leitung von Herrn Dr. Feuerer
1999	3. Staatsexamen mit dem Erhalt der Approbation
seit 1999	Promotionsarbeit an der GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, am Institut für Molekulare Virologie (Direktor: Herr Prof. Dr. Volker Erfle) in der Abteilung Virale Vaskulopathie (Leitung: Herr Univ. Prof. Dr. Michael Stürzl)

2000 4-wöchiger Forschungsaufenthalt im Rahmen der Promotionsarbeit am *Instituto Superiore di Sanità*, Abteilung Virologie (Direktorin: Frau Dr. Barbara Ensoli)

Schriftliche Veröffentlichungen

- 1) Guenzi, E., Töpolt, K., Cornali, E., Lubeseder-Martellato, C., Jörg, A., Matzen, K., Zietz, C., Kremmer, E., Nappi, F., Schwemmler, M., Stürzl, M. (2001). The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J* 20, 5568-5577.
- 2) Lubeseder-Martellato, C., Guenzi, E., Jörg, A., Töpolt, K., Naschberger, E., Kremmer, E., Zietz, C., Tschachler, E., Hutzler, P., Schwemmler, M., Matzen, K., Stürzl, M. (2002). Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *Am J Pathol* 161, 1749-1759.
- 3) Matzen, K., Dirx, A.E.M., oude Egbrink, M. G. A., Götte, M., Ascherl, G., Griffioen, A. W., Stürzl, M., (2003). HIV-1 Tat increases the adhesion of monocytes and T-cells to the endothelium in vitro and in vivo: implications for AIDS-associated vasculopathy. Eingereicht

Vorträge

- 1) Grimm, T., Guenzi, E., Martellato, C., Matzen, K., Quadt, I., Töpolt, K., Jörg, A., Zietz, C., and Stürzl, M. (2001). Human herpesvirus-8 (HHV-8) anti-apoptotic factors regulate progression of Kaposi Sarcoma (KS). 3rd Symposium on the biology of endothelial cells (Giessen, D).
- 2) Quadt, I., Matzen, K., Speth, C., Dirx, A. E. M., Lehmann, M. H., Ascherl, G., Sgadari, C., Guenzi, E., Huber, J., Schneider, S., Naschberger, E., Bauer, S., Griffioen, A.W., Ensoli, B., Stürzl, M. (2002). HIV-1 Tat protein stimulates adhesion of lympho-mononuclear cells to the endothelium: implications for AIDS-associated vasculopathy. *Convir 2002* (Munich, D).

- 3) Stürzl, M., Guenzi, E., Martellato, C., Matzen, K., Töpolt, K., Jörg, A., Li, B., Stelz, G., Zietz, C., Monini, P., Ensoli B. (2000). Human herpesvirus-8 (HHV-8) gene expression in Kaposi' Sarcoma (KS) primary lesions. 1st congress on viral diseases (Munich, D).
- 4) Stürzl, M., Cornali, E., Martellato, C., Töpolt, K., Jörg, A., Matzen, K., Nappi, F., Schwemmler, F., Zietz, C., Monini, P., Ensoli, B., Guenzi, E. (2001a). The human guanylate binding protein-1 is a novel inhibitor of endothelial cell proliferation. Keystone symposia, angiogenesis and chronic diseases (Keystone, U.S.A.).
- 5) Stürzl, M., Cornali, E., Martellato, C., Töpolt, K., Jörg, A., Matzen, K., Nappi, F., Schwemmler, F., Zietz, C., Monini, P., Ensoli, B., and Guenzi, E. (2001b). The inflammatory cytokine-induced inhibition of endothelial cell proliferation is mediated by the guanylate binding protein-1. 3rd Symposium on the biology of endothelial cells (Giessen, D).
- 6) Stürzl, M., Töpolt, K., Martellato, C., Jörg, A., Naschberger, E., Grimm, T., Quad, I., Matzen, K., Schneider, S., Lehmann, M., Ensoli, B., Guenzi, E. (2002). Pathobiology of Kaposi Sarcoma. World Congress of Dermatology 2002 (Paris, F).

Posterpräsentationen

- 1) Töpolt K., Guenzi, E., Lubeseder-Martellato, C., Jörg, A., Matzen, K., Naschberger, L., Grimm, T., Stürzl, M. (2002). Structure-function analysis of the antiproliferative effect of the human guanylate binding protein-1 (GBP-1) in endothelial cells. 22nd Meeting of the European Society for Microcirculation-The Microcirculation and Vascular Biology (Exeter, GB).
- 2) Lehmann, M.H., Matzen, K., Quad, I., Dirx, A. E. M., Ascherl, G., Sgadari, C., Speth, C., Huber, J., Schneider, S., Naschberger, E., Bauer, S., Guenzi, E., Griffioen, A. W., Ensoli, B., Stürzl, M. (2002). HIV-1 Tat protein stimulates adhesion of lympho-mononuclear cells to the endothelium: implications for AIDS-associated vasculopathy. Jahrestagung der GfV (Erlangen, D).

- 3) Matzen, K., Quadt, I., Wahl, M., Lehmann, M. H., Imai, K., Bisacchi, D., Benelli, R., Albin, A., Hart, G. W., Stürzl M. (2003). Identification of HIV-1-Tat-regulated genes in monocytes. Deutsche Virologentagung 2003 (Berlin).

9. Danksagung

An dieser Stelle sei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben herzlich gedankt:

Prof. Dr. Michael Stürzl, der durch seine fordernde, aber immer freundliche Art und seine hervorragende wissenschaftliche Arbeit mein Interesse auf dem Forschungsgebiet der molekularen Medizin förderte; für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und seinen Rückhalt in schwierigen Situationen und für seine Bemühungen, diese Arbeit erfolgreich zu vollenden.

Priv. Doz. Dr. Ruth Brack-Werner, die mit viel Engagement und Interesse meine Arbeit betreute und immer ein aufmunterndes Wort für mich übrig hatte.

Prof. Dr. Volker Erfle, für seine Unterstützung und die Möglichkeit im Institut für Molekulare Virologie die Arbeit durchführen zu können.

Dr. Barbara Ensoli, Dr. Paolo Monini, Dr. Cecilia Sgadari vom *Istituto Superiore di Sanità* in Rom, die mich bei meinem Forschungsaufenthalt in Rom herzlich aufnahmen und mir experimentell und fachlich eine große Hilfe waren.

Dr. Arjan Griffioen, der die *in vivo*-Studien an den Mäusen in seinem Labor in Maastricht ermöglichte.

allen Mitgliedern des Institutes für Molekulare Virologie für die gute Zusammenarbeit und viele nützliche Diskussionen.