

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Hartung

**Die Wirkung unterschiedlicher Glycosylierung in der V3-Region und
des Tropismus von gp120 auf dessen Neurotoxizität und die
Induktion einer Calciumdysregulation in Astrozyten in Zellkultur**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Rebekka Steinbach

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Köller

Korreferent: Prof. Dr. med. Homey

1. Einleitung	5
1.1. Die HIV-assoziierte Enzephalopathie.....	5
1.2. Die Neuropathogenese von HIV.....	7
1.3. Das HIV-Glycoprotein gp120.....	10
1.4. Der Zelltropismus des HIV-1.....	10
1.5. Die Assoziation des Tropismus zu Krankheitsstadien bei HIV-Infektion.....	11
1.6. Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 als Bindungsstelle für gp120 im Gehirn.....	12
1.7. Gp120 und die intrazelluläre Calciumhomöostase.....	13
1.8. Mechanismen der Neuronendegeneration.....	14
1.9. Ziel der Arbeit.....	15
2. Material und Methoden.....	17
Experimente zur Untersuchung des Einflusses von gp120 auf den Calciumstoffwechsel in Astrozyten.....	17
2.1. Transfektion adhärenter Zellen mit FUGENE ^{TM6}	17
2.1.1. Material und Lösungen.....	17
2.1.2. Die Expressionsvektoren.....	18
2.1.3. Abtrypsinisierung.....	19
2.1.4. Transfektion.....	20
2.2. Das Zellkulturmodell zur Untersuchung der Calciumhomöostase (Neurochemisches Labor Düsseldorf).....	20
2.2.1. Material und Lösungen.....	20
2.2.2. Präparation.....	22
2.2.3. Anlegen einer Astrogliakultur aus Zellen neugeborener Wistarratten.....	22
2.3. Fluoreszenzmikroskopische Calciummessung.....	23
2.3.1. Material und Lösungen.....	23

2.3.2.	Fura-2AM.....	24
2.3.3.	Das Fluoreszenzmikroskop.....	25
2.3.4.	Das Computerprogramm „Merlin“.....	25
2.3.5.	Inkubationsexperimente.....	26
2.3.6.	Applikationsexperimente.....	28
2.3.7.	Statistische Auswertung.....	28
	Experimente zur Untersuchung der Chemokinsekretion und Apoptoseinduktion in Neuronen und Astrozyten durch gp120.....	28
2.4.	Kotransfektion adhärenter HeLa-T4 ⁺ -Zellen mit pGFP und den Expressionsplasmiden.....	28
2.4.1.	Material und Lösungen.....	29
2.4.2.	Kotransfektion mit pGFP.....	30
2.4.3.	Transformation der DNA.....	31
2.5.	Das Zellkulturmodell zur Untersuchung der Apoptoseinduktion (Neurochemisches Labor Baltimore).....	32
2.5.1.	Material und Lösungen.....	32
2.5.2.	Herstellen einer humanen Astrogliakultur.....	33
2.5.3.	Die embryonalen Rattenneuronen.....	33
2.6.	Experimente zur Neurotoxizität der gp120-Überstände.....	34
2.6.1.	Material und Lösungen.....	34
2.6.2.	Inkubation der Neurone in gp120 und Trypanblau-Färbung.....	35
2.6.3.	Auswertung der Neurotoxizitätsexperimente.....	35
2.6.4.	Durchführung der Blockierungsexperimente.....	36
2.6.5.	Bestimmung der Toxizität des gp120 auf Astrozyten.....	37
2.6.6.	Experimente zur Bestimmung des Anteils der Astrozyten an der gp120-induzierten	

	indirekten Apoptose.....	37
2.6.7.	CXCR4- und CCR5-Färbung von Rattenneuronen und humanen Astrozyten.....	38
3.	Ergebnisse.....	39
3.1.	Untersuchungen zur Funktionalität des CXCR4-Rezeptors.	39
3.1.1.	Astrozyten reagieren auf 50 nM SDF1-β mit einem Calciumeinstrom.....	40
3.2.	Untersuchung zum Einfluss des Tropismus von gp120 auf den Calciumhaushalt in Astrozyten.....	42
3.2.1.	Gp120 induziert einen Calciumanstieg in Astrozyten.....	42
3.2.2.	Der gp120-induzierte Calciumanstieg in Astrozyten ist abhängig von Tropismus und Glycosylierung des gp120.....	43
3.3.	Messung der ATP- und Glutamatantworten in Astrozyten nach Inkubation in gp120.....	45
3.4.	Untersuchungen zur gp120 induzierten Apoptose in Neuronen und Astrozyten.....	49
3.4.1.	Hippocampale Rattenneurone und humane Astrozyten exprimierten CXCR4 und CCR5.....	49
3.4.2.	Die Neurotoxizität des gp120 wird durch dessen Tropismus beeinflusst.....	51
3.4.3.	Durch Anti-CXCR4-Rezeptor- und Anti-CCR5- Rezeptor-Antikörper wird die Neurotoxizität des gp120 blockiert.....	53
3.4.4.	Die Neurotoxizität der dualtropen gp120-Proteine ist abhängig von der Einwirkungsdauer auf Neurone.....	54
3.4.5.	Gp120 wirkt auf Astrozyten nicht Apoptose-induzierend.....	56
3.4.6.	Unter den gegebenen Zellkulturbedingungen	

sezernieren Astrozyten keine neurotoxischen Faktoren.....	56
4. Diskussion.....	58
4.1. Methodenkritik.....	58
4.2. Mechanismen der HIV-Enzephalopathie - Die Calciumdysregulation durch gp120.....	62
4.2.1. Gp120 verursacht einen Calciumeinstrom in Astrozyten abhängig von dessen Tropismus und N-Glycosylierung: Potentielle Mechanismen dieses Effekts.....	64
4.2.2. Gp120 verringert Glutamat- und ATP induzierte Calciumströme in Astrozyten oder verstärkt diese abhängig von dessen Tropismus.....	66
4.3. Mechanismen der Neuronendegeneration bei HIVE.....	68
4.3.1. Vergleich der Neurotoxizität von R5-, X4- und R5X4-tropen gp120-Isoform.....	70
4.3.2. Gp120-induzierte Chemokinsekretion in Astrozyten.....	72
4.4. Die gp120-induzierte Apoptose in Astrozyten.....	73
5. Literaturverzeichnis.....	74
6. Abkürzungen.....	86
7. Danksagung.....	88
8. Lebenslauf.....	90
9. Zusammenfassung.....	92

1. Einleitung

1.1. Die HIV-assoziierte Enzephalopathie

Seit der Erstbeschreibung von HIV-1 im Jahr 1983 (Barre-Sinoussi, 1983; Gallo, 1983) und HIV-2 im Jahr 1986 (Clavel, 1986) sind beide Viren als Auslöser der erworbenen Immunschwäche AIDS identifiziert.

1988 benannte die Arbeitsgruppe von Price ein neues Krankheitsbild, das im Verlauf der HIV-Infektion auftritt: Die HIV-Enzephalopathie (HIVE) (Synonyme: AIDS-Demenz-Komplex, HIV-assoziierte Demenz (HAD)), ein dementielles Syndrom, das mit schwersten kognitiven, psychosozialen und motorischen Störungen einhergeht. Diese Erkrankung kann sich zu jedem Zeitpunkt im Verlauf der HIV-Infektion manifestieren; das Vollbild der Demenz wird allerdings vor allem in den fortgeschritteneren Krankheitsstadien gefunden (Price et al., 1988). Die HIV-Enzephalopathie beginnt schleichend mit kognitiven und motorischen Defiziten sowie Verhaltensauffälligkeiten (Simpson und Berger, 1996). Es wurden Gedächtnis- und Konzentrationsstörungen beschrieben, Lern-, Lese- und Schreibschwierigkeiten, psychomotorische Verlangsamung mit Antriebsminderung, Wesensveränderung und Verhaltensauffälligkeiten. Psychiatrische Krankheitsbilder wie Angstzustände, Hyperaktivität, Reizbarkeit bis hin zu Psychosen kommen vor (Navia et al., 1986; Sharer et al., 1992). Nach Wochen bis Monaten mündet dies über eine zunehmende Verschlechterung mit Verwirrheitszuständen und Halluzinationen stereotyp in das durch Inkontinenz, Myoklonien, Para- bis Tetraplegie und Mutismus geprägte Vollbild einer überwiegend subkortikalen Demenz (Navia et al., 1986; Price et al., 1986). Die HIV-Enzephalopathie stellt eine Ausschlussdiagnose dar. Vor Diagnosestellung müssen andere mögliche Ursachen der Demenz wie opportunistische Infektionen, raumfordernde Prozesse, Depressionen, Stoffwechselstörungen ausgeschlossen werden (Manji et al., 1994; Simpson und Berger, 1996).

Wegen der meist langen Latenz bis zum Auftreten klinischer Symptome (Navia et al., 1986; Price et al., 1992) sind Untersuchungsmethoden erforderlich, anhand derer subklinische neurologische Defizite bereits in einem frühen Stadium diagnostiziert werden können. Rosci und Mitarbeiter beschrieben 1992 neuroradiologisch

nachweisbare ZNS-Veränderungen bei HIV-1-Infizierten, die eine noch unauffällige CD4⁺-Zellzahl aufwiesen und erschlossen damit Möglichkeiten zur Frühdiagnostik der HIVE. Die Arbeitsgruppe von Arendt untersuchte 1989 und 1990 einen in der Frühdiagnostik von Stammganglienerkrankungen bewährten Test motorischer Fertigkeiten hinsichtlich seiner Verwendbarkeit zur Diagnostik subklinischer zentralnervöser Schädigung bei HIV-1 infizierten Patienten. Bereits bei asymptomatischen HIV-1 infizierten Patienten konnten signifikant pathologische Veränderungen elektrophysiologischer Parameter im Vergleich zu einer HIV-negativen Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Konkret zeigte sich ein Abfall der Frequenz schnellstmöglicher, alternierender Zeigefingerextensionen (Arendt et al., 1989; 1990). Mittels dieser für den Patienten kaum belastbaren neurophysiologischen Methode konnte die Düsseldorfer Arbeitsgruppe ein Nachweisverfahren für frühzeitige, minimale zerebrale Dysfunktionen etablieren. Eine 1992 von Arendt veröffentlichte Studie folgert darüber hinaus, dass die schnellstmöglichen, isometrischen Zeigefingerextensionen zudem zum Monitoring einer antiretroviralen Therapie genutzt werden können.

In den frühen 1990ern wurde die Prävalenz der HIV-assoziierten Demenz auf 20- bis 30% der AIDS-Patienten geschätzt. Durch Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) konnte die Lebenserwartung der HIV-1 infizierten Patienten verbessert werden und die Inzidenz der HIVE auf heute 10.5% gesenkt werden (Sacktor et al., 2001; Dore et al., 1997; Ferrando et al., 1998). Obwohl die Virusreplikation in der Peripherie nun effektiver kontrolliert werden kann und opportunistische Infektionen besser therapiert werden, konnte die HAART die HAD nicht zurückdrängen (Dore et al., 1999; Major et al., 2000). Dies liegt unter anderem an der schlechten Penetranz der Proteaseinhibitoren und Nukleosidanaloga in das ZNS (Enting et al., 1998). Deshalb kann eine frühe ZNS-Infektion sich mit der Zeit unabhängig von der Peripherie entwickeln und ein eigenes, geschütztes HIV-Reservoir bilden.

Da die Lebenserwartung der HIV-Infizierten seit Einführung der HAART gestiegen ist, könnte die Prävalenz der Demenz wieder zunehmen. In den letzten Jahren hat sich der Anteil der HAD als AIDS-definierende Erkrankung vergrößert (Dore et al., 1999; Lipton, 1997; Clifford, 2000). Außerdem wird eine milde Form der HAD immer häufiger beobachtet, die „minor cognitive/motor disorder“ MCMD genannt wird (Ellis et al., 1997). Die HIV-Enzephalopathie ist zurzeit die häufigste Ursache einer

Demenz bei Patienten unter vierzig Jahren weltweit und sie bleibt ein unabhängiger Risikofaktor für den Tod durch AIDS (Ellis et al., 1997). Deshalb ist ein besseres Verständnis der Pathogenese der HIV, das virale und immunologische Faktoren mit einschließt, wichtig, um weitere therapeutische Angriffspunkte für die Prävention und Behandlung dieser neurodegenerativen Erkrankung zu erhalten.

1.2. Die Neuropathogenese von HIV

Schon kurz nach der Infektion gelangt HIV-1 in das Gehirn (Powderly, 2000). Um in Zellen einzudringen, bindet HIV-1 mit seinem Oberflächenprotein gp120 an den CD4-Rezeptor, der typischerweise auf T-Lymphozyten, Blutmonozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen lokalisiert ist. Als Korezeptoren nutzt gp120 die CC- und CXC-Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4. CCR5, der Rezeptor für das β -Chemokin Macrophage Inflammatory Protein (MIP-1 α und MIP-1 β) wird meist als Korezeptor der HIV-Isolate im Gehirn genutzt, während in der Peripherie vorkommende HI-Viren eine besondere Affinität zu dem α -Chemokinrezeptor CXCR4 (Ligand ist der Stromal Derived Factor, SDF-1 α , SDF-1 β) zeigen. Diese Viren wurden in geringerer Zahl auch im ZNS nachgewiesen (Gorry et al., 2001). Viren, die CCR5 als Korezeptor nutzen, nennt man R5- oder M-trop; solche, die an CXCR4 binden, heißen X4- oder T-trop. Zusätzlich gibt es Stämme, die an beide Korezeptoren binden können, was dann als dualtrop bezeichnet wird.

HIV-1 kann auf mehreren Wegen in das Gehirn gelangen. Die am weitesten unterstützte Hypothese ist der „Trojan horse effect“ (Liu, 2000), der besagt, dass infizierte und aktivierte Makrophagen das Virus in das Gehirn transportieren. Aktivierte Makrophagen sezernieren TNF- α , welches die Blut-Hirn-Schranke durchlässiger macht (Mayne et al., 2000), was bei hohen Viruslasten besonders zu Beginn der Infektion eine Eintrittspforte für das Virus in das ZNS darstellt. Zusätzlich wurde eine Passage des Virus über Endothelzellen in das Gehirn beschrieben (Edinger et al., 1997).

Bisher sind die Mechanismen der HIV-1-getriggerten Neuropathogenese nicht endgültig erforscht. Es wurden direkte und indirekte Vorgänge als Ursache der Neurotoxizität von HIV beschrieben. So können als Beispiel für direkte Zellschädigung Virusproteine (z.B. gp120, Tat) durch Bindung an

Oberflächenrezeptoren Apoptose in Neuronen induzieren (Nath, 2002). Auch können residente Makrophagen und Mikrogliä durch HIV-1 infiziert werden, was zur Schädigung dieser Zellen führt und sekundär mit einem Funktionsverlust der Neurone einhergeht. Als Effektoren der indirekt vermittelten HIV-induzierten Neuropathogenese sind unter anderem infizierte Makrophagen und Mikroglia zu nennen. Diese führen nach Aktivierung zur Schädigung des ZNS, indem sie neurotoxische Faktoren wie Virusproteine oder Entzündungsmediatoren freisetzen, in deren Folge es zu einer kaskadenartigen Entzündungsreaktion kommt (Gartner, 2000). Die Sekretion von exzitatorischen Aminosäuren durch aktivierte Immunzellen führt zur calciumvermittelten Apoptose in Neuronen, der Exitotoxizität. Zytokine und virale Proteine schädigen Astrozyten, wodurch die Homöostase von Glutamat und Kalium gestört wird, was wiederum die Exitotoxizität verstärkt (Fine et al., 1996).

Das Oberflächenprotein Glycoprotein 120 (gp120) ist ein Virusprotein, das im Zentrum der Neuropathogenese durch HIV-1 steht. Es wird während der Virussynthese von infizierten Zellen freigesetzt und kann so auch auf nicht-infizierte Zellen wirken. Auch gp120 kann direkt und indirekt neuronenschädigend wirken (Meucci, 1998). Es sind in Zellkulturexperimenten viele Mechanismen beschrieben worden, wie gp120 Zellvorgänge ändern kann:

- Durch Bindung an den Chemokinrezeptor CXCR4 induziert es schon in geringen Konzentrationen Apoptose in Neuronen. Als Korrelat der Neuronenschädigung konnte eine Degeneration neuronaler Dendriten durch gp120 gezeigt werden. Auf molekularer Ebene führt gp120 zur Induktion der Kaspasen-Kaskade (Zheng et al., 1999). Auch eine Aktivierung des p53-Signalwegs durch gp120 wird diskutiert (Garden et al., 2004)
- Durch Aktivierung residenter Immunzellen wirkt es immunstimulatorisch. Die daraufhin sezernierten inflammatorischen Zytokine wie TNF- α sowie freigesetzte neurotoxische Substanzen wie Stickstoffoxid (NO), exzitatorische Aminosäuren (EAAs), Arachidonsäure oder Derivate des plättchenaktivierenden Faktors (PAF) können den neuronalen Glutamatstoffwechsel beeinflussen und zur Exitotoxizität führen (Giulian et al., 1990; Giulian et al., 1993)
- Gp120 stört in Neuronen und Astrozyten die Calciumhomöostase, indem es Calciumeinströme induziert sowie Calciumantworten auf Neurotransmitterapplikation alteriert (Lannuzel et al., 1995)

1. Einleitung

- In Neuronen kommt es durch gp120 zu einer Hochregulation der NMDA-Rezeptoren (Lipton et al., 1991), was wiederum zu einer Beeinflussung der intrazellulären Calciumkonzentration führt und die Zellen empfindlicher gegenüber EAAs macht
- Gp120 stimuliert den Na^+/H^+ -Antiporter von Astrozyten, was einen Natriumeinstrom und Wasserstoffausstrom verursacht und so zu einer Alkalisierung der Zelle führt (Patton et al., 2000). Gleichzeitig wird der Na^+ -Gradient der Zelle verringert, was die Glutamataufnahme in Astrozyten inhibiert und eine weitere Ursache der Exitotoxizität darstellt
- Gp120 kann in Astrozyten die Expression der induzierbaren Form der Stickoxid-Synthetase (iNOS) stimulieren, β -adrenerge Funktionen inhibieren, die Tyrosinkinase aktivieren, die Expression glialer Adhäsionsmoleküle induzieren, zytoskeletale Änderungen hervorrufen (Nath und Geiger, 1998)

Gp120 stellt ein von infizierten Zellen freigesetztes Virusprotein dar, das stark an der Pathogenese der HIV- Enzephalopathie beteiligt ist.

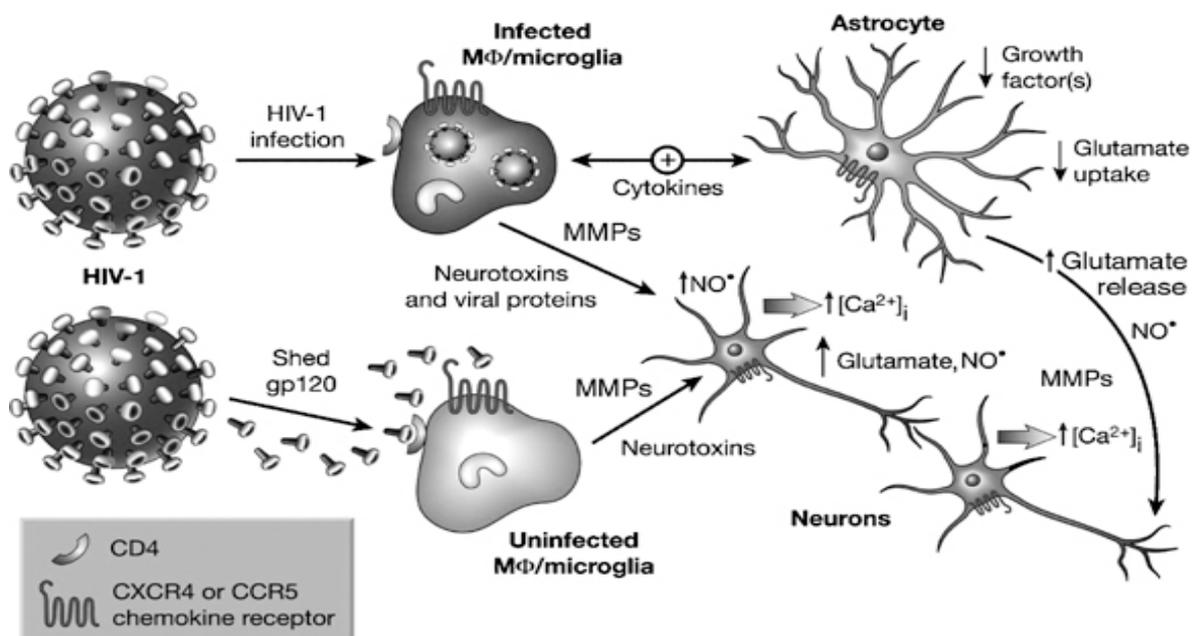


Abbildung 1: Die Neuropathogenese der HIV-Enzephalopathie: HIV-1 infiziert Makrophagen und Mikroglia, die durch Sekretion von Neurotoxinen und viralen Proteinen Neurone schädigen. Über Zytokinsekretion wird die Funktion der Astrozyten beeinträchtigt und die Glutamataufnahme verringert sowie Glutamat freigesetzt. Dies führt zur Exitotoxizität in Neuronen. Freigesetztes gp120 kann nicht-infizierte Makrophagen aktivieren. Die dann sezernierten Zyto- und Chemokine sowie MMPs schädigen wiederum Neuronen (Aus: Nature 410, 2001: Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. Kaul, Garden, Lipton)

1.3. Das HIV-Glycoprotein gp120

Gp120 ist ein Hüllprotein von HIV. Es liegt nicht-kovalent an gp41 assoziiert als Heterotrimer in der Lipidmembran des Virus vor und bildet mit ihm das gp160. Gp41 und Gp120 werden als gemeinsames Vorläuferprotein durch das env- Gen (Env-Proteine: Hüllproteine) codiert.

Gp120 besteht je nach HIV-Variante aus ca. 470- bis 500 Aminosäuren und trägt zirka 25 Erkennungssequenzen für N-Glycosylierungen. Die Antigenität des gp120 wird durch die variablen Bereiche V1 bis V5 bestimmt. Sie zeigen eine hohe Sequenzvariabilität. Dazwischen liegen die konservierten Regionen, die mit C1 bis C5 bezeichnet werden (Modrow et al., 1987). Die Bereiche V1 bis V4 sind an ihren N- und C-terminalen Enden durch Disulfidbrücken zu Schleifen (loops) geformt (Leonard et al., 1990). Aufgrund von Antikörperbindungsstudien wird davon ausgegangen, dass die variablen Bereiche des gp120 an der Oberfläche exponiert sind, während die konservativen Regionen einen zentralen Kern bilden (Moore und Sodroski, 1996). Je nach Virusisolat ist gp120 an 20 bis 25 Positionen durch eine N-Glycosylierung modifiziert. Fünf dieser Zuckerreste finden sich in der V3-Schleife: g13, g14, g15, g16, g17. Die N-Glycosylierung der V3-Schleife ist für das Virus von besonderer Bedeutung (Wyatt et al., 1998): Sie schützt das Virus vor der Immunabwehr des Wirts, indem sie exponierte Bereiche verdeckt, sie stellt die wichtigste immunogene Region des Virus dar (Carrow et al., 1991; Zwart et al., 1991) und ist das Ziel neutralisierender Antikörper. Außerdem hat sie eine besondere Bedeutung für den Tropismus des gp120 (Polzer et al., 2002): Wird die V3-Region des T-tropen HIV_{NL4-3} Isolates gegen eine V3-Schleife eines dual- oder M-tropen Virus ausgetauscht, so ändert sich der Tropismus des Virus entsprechend der eingebauten V3-Region.

1.4. Der Zelltropismus des HIV-1

Nicht lange nach der Entdeckung des HIV-1 wurde beobachtet, dass HI-Viren aus dem Blut verschiedener Patienten unterschiedliche Replikationseigenschaften zeigen. Manche Viren zeigten einen langsamen Reifungsprozess. Diese Viren konnten in T-Zellen und Makrophagen kultiviert werden. Sich schnell vermehrende

Viren konnten nur in T-Zellen repliziert werden. Daher wurde in einer ersten Nomenklatur zwischen T-tropen und M-tropen Virusvarianten unterschieden (Cheng-Mayer et al., 1988; Vazeux, 1991; Connor et al., 1994). Außerdem konnten die Viren anhand ihrer Fähigkeit zur Bildung von mehrkernigen Riesenzellen, den Synzytien eingeteilt werden. Während T-trope Viren in Zellkulturen Synzytienbildung induzieren, konnte dies bei M-tropen Viren nicht beobachtet werden. Entsprechend wurden HI-Viren als SI (syncytium inducing)-Viren oder NSI (non syncytium inducing)-Viren bezeichnet.

Scarlati et al. (1997) konnten zeigen, dass zu Beginn der HIV-1 Infektion die M-tropen Virustypen dominieren. Während der Progression der Erkrankung können vermehrt Viren nachgewiesen werden, die zusätzlich zu CCR5 auch an CXCR4 binden können (Smyth et al., 1998). Die Prominenz T-troper Viren im Blut geht letztlich mit dem Fortschreiten der Erkrankung von den asymptomatischen in symptomatische Stadien und dem Beginn von AIDS einher (Tersmette et al., 1988).

Aufgrund der Eigenschaft von HIV, verschiedene Korezeptoren für die Infektion von Zellen nutzen zu können, werden heute HI-Viren, die nur CXCR4 nutzen können, als X4-trope Virusvarianten und Viren, die ausschließlich CCR5 nutzen können, als R5-trop bezeichnet. Viren, die beide Korezeptoren nutzen, gelten als dual- oder R5X4-trop (Murphy et al., 2000). Zusätzlich sind auch multitrope Viren bekannt, die neben CCR5 und CXCR4 noch weitere Chemokinrezeptoren nutzen können. CXCR4 und CCR5 gelten jedoch als die beiden wichtigsten Korezeptoren.

Im Gehirn sind R5-trope die vorherrschenden Viren. Dennoch konnten 2001 im Gehirn auch V3-Sequenzen T-troper und dualtroper HIV-1 Stämme identifiziert werden (Gorry et al., 2001). Spezifische Determinanten für einen HIV-1 Neurotropismus sind bisher noch nicht identifiziert worden.

1.5. Die Assoziation des Tropismus zu Krankheitsstadien bei HIV-Infektion

Zu Beginn der HIV-1 Infektion dominieren die M-tropen Virustypen (Scarlati et al., 1997). Nach einer 2- bis 10 Jahre andauernden asymptomatischen Phase findet ein Wechsel des viralen Phänotyps statt und es finden sich zusätzlich dualtrope und T-trope Viren in Patienten (Björndal et al., 1997). Glushakova et al. zeigten 1997, dass

T-trope HI-Viren in Makrophagen RANTES und MIP-1 α hochregulieren, β -Chemokine, die die Infektion mit M-tropen Viren kompetitiv blockieren. So wird in späteren Stadien die Mutation der M-tropen zu T-tropen Viren unterstützt.

Ein anderer Mechanismus des Virus-Shifts zum T-Tropismus ist der Verlust von N-Glycosylierungen innerhalb der variablen Schleife von dualtropen gp120. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der Affinität zu CXCR4 und Verlust der Bindungsfähigkeit an CCR5 (Polzer, 2002). Das Auftreten X4-troper Viren korreliert mit Fortschreiten der Erkrankung und dem Beginn der Neuronendegeneration.

1.6. Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 als Bindungsstelle für gp120 im Gehirn

Chemokine sind kleine, lösliche, basische Moleküle, die im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr Leukozyten anlocken und aktivieren können und so an der Abwehr pathogener Organismen teilhaben. Neben der Immunabwehr haben Chemokine zahlreiche andere Funktionen wie die Regulation von Zellreifung und -wachstum sowie die Förderung der Angiogenese (Baggiolini, 1998; Luster, 1998).

Durch Über- und Fehlaktivierung von Immunzellen sind Chemokine allerdings auch an chronischen Entzündungsreaktionen wie der HIV-Enzephalitis beteiligt und stellen einen Faktor in der Ätiologie von Autoimmunprozessen dar.

Chemokine werden abhängig von Anzahl und Platzierung der ersten beiden konservierten Cysteinreste in vier Gruppen klassifiziert: CXC, CX₃C, CC und C.

Im Rahmen der HIV-Enzephalopathie spielen die CXC sowie die CC Chemokine und deren Rezeptoren eine besondere Rolle. Zu den CXC-(α -)Chemokinen gehört unter anderem stromal derived factor-1 (SDF-1). Zu ihren Hauptaufgaben gehört die Chemotaxis und Aktivierung von Neutrophilen, die Hochregulation von Oberflächenadhäsionsproteinen auf Immunzellen, die Induktion von vorübergehenden Calciumeinströmen in Zellen (Baggiolini und Clark, 1992). Sie sind an chronischen Entzündungsprozessen beteiligt, die durch T-Lymphozyten verursacht sind. Zu den CC-(β -)Chemokinen zählt u.a. RANTES. CC-Chemokine haben auf Neutrophile keinen Einfluss, aber auf andere Immunzellen wie T-Lymphozyten und Monozyten (Schall, 1994).

Die Chemokinrezeptoren sind membranständige, heptahelikale Proteine, die zur Familie der 7-Transmembran-Domäne Proteine gehören und mit Guanin Nukleotid

bindenden Proteinen (G-Proteinen) gekoppelt sind (Dohlmann et al., 1991). Sie sind typischerweise auf Immunzellen zu finden, doch im proinflammatorischen Milieu werden sie auch von glatten Muskelzellen, Tumorzellen, Astrozyten, Mikroglia und Neuronen exprimiert. Dies gilt auch für die HIV-Enzephalitis, bei der der Zustand der Entzündung die Infektion immunkompetenter Zellen besonders erleichtert. Unter den oben genannten Chemokinrezeptoren spielen CXCR4 und CCR5 als Korezeptoren von gp120 in der Pathogenese der HIV-Enzephalopathie eine besondere Rolle (Tanabe et al., 1997; Lavi et al., 1997; Rottmann et al., 1997).

1.7. Gp120 und die intrazelluläre Calciumhomöostase

Gp120 stört die Calciumhomöostase von Astrozyten und Neuronen, was als wichtiger Faktor in der Pathogenese der HAD gesehen wird. Calcium spielt für die Intaktheit cerebraler Funktionen eine wichtige Rolle. Betrachtet man den Einfluss von Calcium auf zellulärer Ebene, so beeinflusst der Ca^{2+} -Spiegel eine Vielzahl essentieller Prozesse wie die Expression von Genen, die Zellviabilität und Proliferation, sowie die Erregbarkeit der Zellen. Es spielt eine Schlüsselrolle in vielen Kaskaden, die die Zellantwort auf äußere Signale regulieren und ist damit ein wichtiger Baustein in der Kommunikation zwischen Zellen.

Lange wurde vermutet, dass gliale Zellen wie Astrozyten nur eine passive Funktion im Gehirn in der Aufrechterhaltung der Nervenzellarchitektur, -nutrition sowie –funktion besitzen. Dass sie eine Rolle in der Signalintegration im Gehirn spielen, war nicht bekannt. In der letzten Zeit aber mehren sich Hinweise, die zeigen, dass Astrozyten eine aktive Rolle in der synaptischen Signalweiterleitung und Informationsverarbeitung spielen (Haydon, 2001; Bezzi und Volterra, 2001). So konnte gezeigt werden, dass Astrozyten, die die Synapsen umgeben, mit einem Ca^{2+} -Einstrom auf Neurotransmitter reagieren, woraufhin es zu einer kontrollierten Glutamatfreisetzung kommen kann, was einen modulierenden Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit und synaptische Transmission hat (Porter et al., 1996; Pasti et al., 1997; Kang et al., 1998). Einhergehend mit diesen Resultaten wird das Gehirn immer weniger als nur ein komplexes neuronales Netzwerk, sondern mehr und mehr als differenzierter Schaltkreis aus Neuronen und Gliazellen gesehen, für dessen Intaktheit eine Interaktion und Kommunikation beider Zelltypen erforderlich ist.

Astrozyten stellen mit fast $\frac{3}{4}$ der Hirnzellen die Majorität im Gehirn dar. Es liegt also nahe, den Calciumstoffwechsel in Astrozyten zu betrachten, um grundlegende Vorgänge in Hirnzellen und potentielle Schädigungsmechanismen zu verstehen.

Astrozyten sind durch gap-junctions, kanalbildenden Proteinkomplexen, direkt miteinander verbunden. Diese geben ihnen die Möglichkeit, Calciumsignale weiterzugeben und Membranspannungen zu modulieren. Durch diese Ca^{2+} -Signale können sie die Aktivierbarkeit der neuronalen Netzwerke beeinflussen (Pasti et al., 1997). Die Signale resultieren aus einer IP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, welche wiederum an die Aktivität der Phospholipase C gekoppelt ist, die durch verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden kann. Um eine Erregung an Zellen weiterzuleiten, die sich in Distanz zu den primär-aktivierten Zellen befinden, nutzen Astrozyten ATP, das sie freisetzen können und an purinerge Rezeptoren entfernter Astrozyten bindet (Walz, 1989). Auch eine mechanische Stimulation oder chemische Reize können einen Calciumanstieg in Astrozyten bewirken (Cornell-Bell et al., 1990), der sich in Form einer Calciumwelle innerhalb der angrenzenden Zellen ausbreiten kann. Durch Moleküle wie Glutamat oder NO scheint es eine enge Koordination zwischen gap-junctions und ATP-mediierter Signalweiterleitung zu geben (Enkvist, 1994; Venance, 1995; Muyderman, 1998).

1.8. Mechanismen der Neuronendegeneration

Es werden zwei Hauptmechanismen für Neuronendegeneration unterschieden: Apoptose und Nekrose.

Durch Apoptose, einem energieverbrauchenden, genetisch regulierten Zelltod-Programm, werden alte, nicht mehr benötigte oder beschädigte Zellen gemausert. Apoptose zeichnet sich durch biochemische und morphologische Charakteristika aus. Sie wird durch eine Gruppe von intrazellulären Enzymen mit proteolytischer Aktivität, den Caspasen, ausgeführt und kann durch äußere Einflüsse wie Strahlung, oxidativen Stress, Toxine, Viren, Fehlen neurotropher Faktoren in Gang gesetzt werden (Wyllie et al., 1980; Majno et al., 1995; Reed, 2000). Es kommt zu einem Schrumpfen der Zelle und durch Endonukleasen zu einem Abbau der DNA in definierte Stücke. Zu den ausführenden Molekülen der Apoptose gehören

Todesrezeptoren auf der Oberfläche der Zellen wie Apo-1/Fas und Apoptose-aktivierende Faktoren wie TNF- α , Cytochrom c, das von geschädigten Mitochondrien in das Zytoplasma freigesetzt wird und Proteine der Caspase-, Bcl-2- und p53 Onkogen-Familie. Einmal aktiviert, induzieren viele dieser Moleküle Proteolyse spezifischer zellulärer Strukturen und amplifizieren das Todessignal als Kaskade.

Nekrose ist die pathologische Form des Zelltods, ein passiver Vorgang, der durch eine spontane, nicht überlebende Schädigung der Zelle hervorgerufen wird (Levin et al., 1999; Clarke, 1999). Die Zelle schwillt an, wobei deren Plasmamembran zerstört wird. Als Folge kommt es zu lokalen Entzündungen, da Zytoplasma und Zellorganellen in den Extrazellularraum freigesetzt werden, welche durch Makrophagen beseitigt werden müssen. Im Vergleich zur Nekrose ist die Apoptose die häufigere Form des Zelltods

1.9. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Frage diskutiert werden, ob durch unterschiedliche gp120-Isolate Funktionsstörungen in Astrozyten und Neuronen induziert werden.

Bisherige Arbeiten zeigten, dass gp120 X4-troper Virusstämme den Chemokinrezeptor CXCR4 aktiviert und dadurch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Astrozyten und Neuronen auslöst (Köller et al., 2002). Auch konnte gezeigt werden, dass durch Inkubation in T-tropem gp120 der Calciumeinstrom nach Applikation von Glutamat und ATP in Astrozyten verringert wird. In der vorliegenden Arbeit soll nun überprüft werden, inwieweit sich Sequenzunterschiede im env-Gen, speziell in der V3 Region von gp120 auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in Astrozyten auswirken. Konkret wurde die Calciumkonzentration in Astrozyten nach Applikation von verschiedenen gp120-Isoformen sowie Veränderungen der Calciumantwort auf Glutamat und ATP nach Inkubation der Zellen in gp120 untersucht. Dazu wurde X4-tropes (NL4-3), dualtropes (952/61 und 952/105) und R5-tropes (991/7A) gp120 genutzt. Bezüglich der dualtropen Proteine soll zudem analysiert werden, inwieweit sich Mutationen von Glycosylierungssites in der V3-Region von gp120 auswirken.

Die weitere Fragestellung ist die Untersuchung der Beeinflussung der Neurotoxizität des gp120 durch seinen Tropismus. Es ist bekannt, dass T-tropes gp120 direkt und indirekt, d.h. sekundär durch Induktion von Immunmediatoren neurotoxisch wirken kann. In dieser Arbeit wird die direkte und die indirekte, durch Astrozyten vermittelte gp120-induzierte Apoptose in Neuronen und Astrozyten an X4-tropen, dualtropen und R5-tropen gp120-Isoformen untersucht und verglichen.

2. Material und Methoden

Experimente zur Untersuchung des Einflusses verschiedener gp120-Isoformen auf den Calciumstoffwechsel in Astrozyten

2.1. Transfektion adhärenter Zellen mit FuGENE™6

Die Transfektion der HeLa-T4⁺ Zellen (im Folgenden als HeLa-Zellen bezeichnet) erfolgte im Virologischen Institut der Universität Düsseldorf in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schaal. Die Plasmid-DNA der untersuchten HIV-Stämme (Wildtyp NL4-3 (X4-trop), NL-991 (R5-trop), NL-952 (X4R5-trop)) wurde von Prof. Dr. Schreiber, Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin, Hamburg zur Verfügung gestellt.

2.1.1. Material und Lösungen

- Zellen
3x10⁵ HeLa-Zellen supplementiert in 2 ml FBS- Medium
- Transfektionszubehör
6-Well Platten (Greiner-Bio-One)
Eppendorf-Reaktionsgefäße
Pipetten
Bechergläser
Neubauer Zählkammer mit Deckgläschen
FuGene™ 6 Transfektionsreagenz, Roche
- Expressionsvektoren

Pgp120(NL4-3)	X4-trop, Wildtyp, V3 komplett glykosyliert
Pgp120(NL952-61)	X4R5-trop, Glycosylierungen an Stelle g13 und g14 fehlen
Pgp120(NL952-105)	X4R5-trop, Glycosylierungen an Stelle g13, g14 und g17 fehlen

2. Material und Methoden

den Tropismus des Virus eine wichtige Rolle spielt (DeJonge et al., 1992; Cocchi et al., 1996). Um selektiv verschiedene Mutationen dieses Proteinabschnittes zu untersuchen, wurde die V3-Region des HIV_{NL4-3} env durch die V3-Region von NL-991 und NL-952 ausgetauscht. So wurde sichergestellt, dass sich die Plasmide nur in dem zu untersuchenden Abschnitt unterscheiden. Die Mutation der Glycosylierungssites (und damit das Fehlen der Glycosylierungen) erfolgte durch spezifische Veränderungen der Aminosäuresequenz im V3-Loop.

```
Glycosylierungssites  g12          g13  g14  g15          g16  g17
X4-NL4-3  DVVIRSANFTDNAKTIIVQLNTSVEINCTRPNNTXRSIRIQRGPGRAFVTIGKI. GNMQRQAHNCNISRAKMNATLKQIASKLR
R5X4-952  -----S-----ETIK-----R-TL-----VLY--T-E-I--DI---K-----E-----N--Y--V-----
-g13/14/15 -----S-----KETIK-D-I-----I-----R-TL-----VLY--T-E-I--DI---K-----E-----N--Y--V-----
-g13/14/15/17 -----S-----KETIK-D-I-----I-----R-TL-----VLY--T-E-I--DI---K-----E-----NA--Y--V-----
R5-991    -----N-----E--V-----R--P--Y- T-DV--DI-----Q-----N--E-----
```

Abbildung 3: V3-Sequenzen der X4-, R5X4- und R5-tropen HIV_{NL4-3} Mutanten. Die V3 Region von HIV_{NL4-3} wurde von Aminosäure 273 bis 347 ersetzt durch die V3 Region des R5X4-dualtropen Virus (PI-952) -R5X4-952- und die V3 Region des R5-monotropen Virus (PI-991) -R5-991. X4-NL4-3: X4-monotroper Wildtyp.

2.1.3. Abtrypsinierung

Die HeLa-Zellen wurden 4 Tage in einem Kulturmedium aus DMEM (GIBCO) angereichert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) (PAN Biotech GmbH) bei 37°C und 7% CO₂ kultiviert. Unter diesen Bedingungen proliferierten die HeLa-Zellen zu einem konfluenten Monolayer und konnten für die Transfektion verwendet werden. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 Minuten mit 3 ml ATV, einer trypsinhaltigen EDTA-Lösung, inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 9,5 ml PBS aufgenommen. Um die Zelldichte der Suspension zu bestimmen, wurden 12 µl Zellsuspension mit 12 µl Trypanblau vermischt und das Gemisch in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. So wurde das Volumen ermittelt, das etwa 3x10⁵ Zellen enthält, und dieses dann auf Multiwellplatten zu je 2,5 ml Kulturmedium pro Well ausgesät. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass sich in jedem Well eine etwa gleiche, bestimmbare Zellzahl befindet. Der Zellansatz wurde 24 h bei 37°C und 7% CO₂ kultiviert.

2.1.4. Transfektion

Die Konzentration der zu untersuchenden DNA-Proben und des Rev-Vektors wurde photometrisch bestimmt und so das Volumen errechnet, das 1 µg DNA enthält.

Je 1 µg beider DNA-Lösungen wurden zentrifugiert und zu einer 4% FuGene™6-Lösung in DMEM gegeben. Nach 15 min wurde das Gemisch den HeLa-Zellen zugesetzt. Nach 24-stündiger Kultivierung wurde ein Mediumwechsel mit 2 ml serumhaltigen DMEM durchgeführt und die Zellen weitere 24 h in den Inkubationsschrank bei 37°C und 7% CO₂ gestellt. In dieser Zeit erfolgte die Translation der eingeschleusten DNA in den HeLa-Zellen. Das proteinhaltige Medium wurde abpipettiert, durch Zentrifugation von Zellresten getrennt und in Eppendorf Reaktionsgefäßen schockgefroren. Die Proteinlösungen lagerten bei -20°C und wurden erst für die Experimente wieder aufgetaut.

2.2. Das Zellkulturmodell zur Untersuchung der Calciumhomöostase (Neurochemisches Labor Düsseldorf)

Für die Inkubations- und Applikationsexperimente wurde ein Modell aufgereinigter, dissoziierter Astrozyten benutzt. Die Herstellung der Astrozytenkulturen sowie deren Aufreinigung erfolgten im Neurochemischen Labor der Neurologischen Klinik der Universität Düsseldorf in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Müller mit Unterstützung einer medizinisch-technischen Assistentin.

2.2.1. Material und Lösungen

- Wistar-Ratten, postnatal (P), P1-P3
- Präparationsbesteck
 - 1 große Präparationsschere
 - 1 kleine Präparationsschere
 - 1 Pinzette, 12 cm, mit 1x2 Zähnen
 - 2 Mikro-Pinzetten, gebogen, Spitzen 0,4 mm, Nr. 7
 - 1 Mikropinzette, abgewinkelt, Spitzen 0,3 mm

2. Material und Methoden

- 1 Mikropinzette, gerade, Spitzen 0,15 mm, Nr. 5
- 1 Mikrospatel, Fa. Martin
- 1 Skalpell
- sonstiges Präparationszubehör
 - 1 Stereolupe
 - Sterile Mullkompressen
 - 3 Bechergläser
 - 3 sterile PP-Röhrchen, 50 ml (GREINER)
 - 1 Ständer für PP-Röhrchen (GREINER)
 - 1 steriles PP-Röhrchen, 10 ml (GREINER)
 - kleine Petrischalen (35x10 mm)
- Zellkulturmaterial
 - Sterile 10 ml- Pipetten aus Plastik
 - Lange Pasteur- Pipetten
 - Zellkulturflaschen, 75 cm²
 - 1 steriles Becherglas, abgedichtet mit Nylon-Gaze (Porengröße 60 µm)
 - Multiwellschalen
 - Runde Deckgläser (10 mm Durchmesser)
- Lösungen
 - Äther zur Narkose
 - 70% Ethanol
 - DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO, Eggenstein, Deutschland)
 - PBS (Phosphat Buffered Saline, GIBCO)
 - FCS-Medium (10% Fetales Kälberserum in DMEM; Sigma, Deutschland)
 - N2-Medium: (nach Bottenstein und Sato, 1979)
 - 75% DMEM
 - 25% Ham's F12
 - 5,0 µg/ml Insulin
 - 100 µg/ml Transferrin
 - 5,2 ng/ml Natriumselenit
 - 16,0 µg/ml Putrescin
 - 7,0 ng/ml Progesteron
 - 2,0 mM Glutamin

Laminin (BRL)

Poly-L-Lysin (SIGMA)

2.2.2. Präparation

Für die Präparation wurden neugeborene Wistar-Ratten (Alter maximal 72 h) aus der TVA der Universität Düsseldorf verwendet. Die Tiere wurden mittels Äther-Narkose getötet und anschließend in 70% Ethanol getaucht, um die Keimbesiedlung der Haut zu verringern. Nach Dekapitation wurde der Kopf auf eine sterile Mullkomresse gelegt und Kopfhaut und Schädelkalotte vorsichtig abpräpariert. Das Gehirn konnte nun aus der Schädelbasis abgelöst werden und wurde mit einer Mikropinzette in den Deckel einer kleinen Petrischale gelegt.

Ein Sagittalschnitt ermöglichte, die beiden Hemisphären auseinander zu klappen und den Kortex von der weißen Hirnsubstanz zu trennen. Um ein Austrocknen des empfindlichen Gewebes zu vermeiden, wurde etwas DMEM auf die Hirnrinde gegeben.

Unter dem Binokular wurden die Meningen vollständig abpräpariert und das übrige Kortexgewebe zerkleinert. Die entstandenen Stücke wurden in 50 ml DMEM auf 2000 rpm abzentrifugiert.

2.2.3. Anlegen der Astrogliakultur aus Zellen neugeborener Wistar Ratten

Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet mit 1 ml DMEM, angereichert mit 10% FCS (im Folgenden als FCS/DMEM bezeichnet), aufgenommen und in Pasteurpipetten mit immer kleinerem Radius titriert, so dass eine Einzelzellsuspension entstand. Diese wurde mit 9 ml serumhaltigen DMEM aufgefüllt und über einen 60 µm Filter gegeben. 5 ml der gefilterten Zellsuspension wurde in eine T75 Zellkulturflasche, die mit 15 ml FCS gefüllt war, pipettiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 10% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit über 95%. Ein Mediumwechsel erfolgte nach den ersten 4 Tagen und danach alle 2 Tage bis die Zellen zu einem konfluenten Monolayer gewachsen waren.

Um eine reine Astrozytenkultur zu erhalten, wurden die Zellen 12 h auf einem Inkubationsschüttler geschüttelt. Die sich lösenden Neuronen, Mikroglia und Oligodendrozyten konnten mit dem Kulturüberstand weitgehend entfernt werden. In

früheren Arbeiten konnte die Reinheit derartig gewonnener Kulturen durch immunhistochemische Methoden (Färbung des Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) mit über 95% Astrozytenanteil gezeigt werden (Stichel und Müller, 1992).

Die aufgereinigte Astrozytenkultur wurde nun abtrypsinisiert und durch Titrieren resuspendiert. Nach Zentrifugation der Suspension bei 2000 rpm wurde das Zellpellet mit FCS aufgenommen und auf eine Multiwellplatte mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml, 24 h, 4°C) beschichteteten Glasplättchen in serumhaltiges DMEM gegeben. Durch die Poly-L-Lysin-Beschichtung haften Zellen besser an den Plättchen.

Die Astrozyten proliferierten auf den Deckgläschen und nach Bildung einer konfluenten Zellschicht, nach ungefähr 7 Tagen, wurden die Zellen gewaschen und in ein serumfreies N2- Medium (3:1 DMEM und Ham's F12 mit 5 µg/ml Insulin, 100 µg/ml Transferrin, 5.2 ng/ml Natrium-Selenit, 16 g/ml Putrescine und 7 ng/ml Progesteron) überführt. Durch das Wachstum in Serum freiem Medium wird der CXCR4-Rezeptor der Astrozyten aktiviert, was eine Voraussetzung für gp120-Experimente ist. Die Calciummessungen erfolgten am 8.-12. Tag, da zu dieser Zeit die ausgelöste Calciumantwort am deutlichsten ist (Köller et al., 2000).

2.3. Fluoreszenzmikroskopische Calciummessungen

Die Messungen wurden im Neurochemischen Labor der Neurologischen Klinik der Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.3.1. Material und Lösungen

- Zubehör
 - Mikrofluorimeter D104G (Deltascan, Photon Technology International, South Brunswick, USA)
 - PC mit Merlin-Software (Life Science Resources, Ltd, USA)
 - 1 Petrischale, mittlere Größe mit einem Loch in der Mitte (Durchmesser 1 cm)
 - Plastikzylinder für das Zellbad
 - Pipette, 1 ml
 - Klebefolie
 - Skalpell

Mit Astrozyten bewachsene Coverslips, 10-12 Tage auf N₂

Mini-Petrischalen (Nunc™-Products, Dänemark)

- Chemikalien

Fura-2AM (Sigma, 0,1% w/v gelöst in DMSO)

Pluronic F-127 (Sigma, 20% w/v gelöst in DMSO)

DMSO 99,5% GG (Sigma)

2 mM Glutamat (Merck, Deutschland)

2 mM ATP (Sigma)

- Gp120 Überstände (s. Transfektion)

- Lösungen

Badlösung:

150 mM NaCl

4,0 mM KCl

1,0 mM MgCl₂*6 H₂O

2,8 mM CaCl₂* 2 H₂O

10 mM Sucrose

10 mM HEPES

Doppelt destilliertes Wasser

2.3.2. Fura-2AM

Als Farbstoff wurde der ratiometrische Fluoreszenzstoff Fura-2AM (Sigma, 0,1% w/v gelöst in DMSO) verwendet. Fura-2AM (im Folgenden als Fura-2 bezeichnet) ist ein lipophiler Ester, der durch die Plasmamembran der Zellen diffundieren kann. Esterasen im Zellinneren spalten Fura-2, wodurch es hydrophil wird und Calcium komplexieren kann (Takahashi, 1999). So wird gewährleistet, dass sich Fura-2 in den Zellen anreichert und nur intrazelluläres Calcium detektiert wird. Um die Membrangängigkeit des Farbstoffs zu erhöhen, wurde Pluronic F-127 (Sigma, 20% w/v gelöst in DMSO) benutzt, ein mildes Detergenz, das die Permeabilität der Membran erhöht (Maruyama, 1989).

Zur Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration wurde die Methode nach Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985) angewendet, die auf der Eigenschaft von Fura-2 beruht, sein Extinktionsspektrum nach Bindung von Calcium zu ändern. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde von Licht zwei verschiedener Wellenlängen, 340 nm und

380 nm angeregt und die Intensität des dann emittierten Lichtes, 510 nm, mit einer Fluoreszenzkamera gemessen. Als Folge der Bindung an Calcium, verschiebt sich das Anregungsmaximum von ca. 380 nm (unkomplexierte Form) auf ca. 340 nm (komplexierte Form). Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der beiden Wellenlängen wurde zur Errechnung des R-Wertes herangezogen:

$$R = F_{340}/F_{380} = f''([\text{Ca}^{2+}])$$

R ist ein relativer Wert, der das Verhältnis der Emission von gebundenem zu ungebundenem Calcium darstellt.

2.3.3. Das Fluoreszenzmikroskop

Für die Calciummessungen wurde ein kommerzieller Mikrofluorimeter D104G verwendet. Dieser kann Proben mit Licht bestimmter Wellenlängen anregen und das dann emittierte Fluoreszenzlicht filtern und über ein Objektiv einfangen. Gleichzeitig misst er die Intensität des eintreffenden monochromatischen Lichtes.

Das Mikroskop war mit einem Rechner verbunden, auf dem die Fluoreszenzbilder mit Hilfe des Computerprogramms „Merlin“ (Life Science Resources, Ltd., USA) in Graustufen oder als Falschfarben sichtbar gemacht, gespeichert, analysiert und bearbeitet wurden.

2.3.4. Das Computerprogramm „Merlin“

Die Software ermöglichte, die Belichtung, Wahl der Filter und Datenaufnahmeoptionen einzustellen. Alle Messungen wurden über die Dauer von 2 min durchgeführt, dabei wurde alle 2 sec ein Fluoreszenzbild (frame) aufgenommen. Das Programm schrieb die analogen Lichtsignale in statistisch auswertbare ASCII-Files um. Über ROIs konnte bestimmt werden, welche Regionen des mikroskopischen Bildes analysiert werden sollten. Es wurden nur die Zellen mit ROIs markiert, die eine geringe intrazelluläre Calciumkonzentration aufwiesen, erkennbar an einer hohen Lichtemission nach Anregung mit 340 nm, um physiologische Signale vitaler Zellen zu selektieren.

2.3.5. Inkubationsexperimente

Die Inkubationsexperimente wurden mit den Methoden der Arbeitsgruppe Köller durchgeführt (Köller et al., 2002). Für die Experimente wurden je 2 Coverslips im Brutschrank bei 37°C, 10% CO₂ und über 96% Luftfeuchtigkeit in 2 ml gp120 Überstand 60 min inkubiert. Als Kontrolle wurden Coverslips analog in gp120-freiem FCS/DMEM inkubiert. Dann wurden die Coverslips aus den gp120-Überständen entfernt und in 2 ml Badlösung mit Fura-2 (5 µM) und 60 min im Inkubationsschrank angefärbt. Pluronic F-127 (0.06%) wurde genutzt, um die Farbstoffaufnahme in die Zellen zu verbessern. Alle Zellen wurden 2 h nach Beginn der Inkubation in gp120 gemessen. Für die Messungen wurden die Coverslips in einer dazugehörigen Messvorrichtung so befestigt, dass auf die Astrozyten 1 ml Badlösung gegeben werden konnte. Die Badlösung verhinderte das Austrocknen der Zellen während des Messvorgangs am Mikroskop. Dann wurde die relative Calciumkonzentration in den Zellen durch Fluoreszenzmessung dargestellt. Alle 2 Sekunden wurden, wie vorher eingestellt, die zu messenden Zellen belichtet und die dann emittierte Lichtintensität über eine Dauer von 2 min aufgenommen. Nach 20 sec wurde 1 ml Glutamatlösung (2 mM) appliziert, so dass die Hirnzellen einer Glutamatkonzentration von 1 mM am Rezeptor ausgesetzt wurden.

Im Anschluss an die Glutamatexperimente wurde in derselben Einstellung eine zweite Messung durchgeführt, diesmal aber nach derselben Zeit 1 ml ATP-Lösung (2mM) dazugegeben. Auch diesmal wurden die calciumabhängigen Fluoreszenzintensitäten 60 mal alle 2 sec detektiert (s. Abb. 4).

Dem Untersucher war nicht bekannt, in welchen gp120-Überständen die Zellen vor den Messungen inkubierten. Die Inkubationsexperimente wurden daher als Blindexperimente durchgeführt.

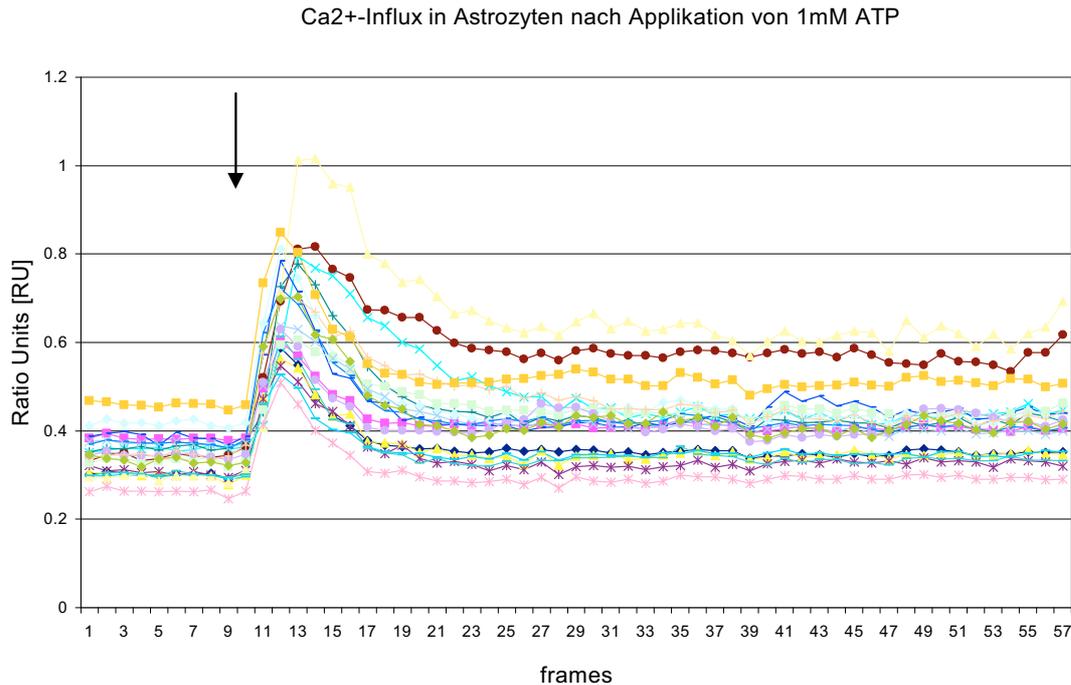


Abbildung 4: Darstellung des ratiometrisch gemessenen Calciumeinstroms in Astrozyten nach Applikation von 1 mM ATP (Pfeil) bei zweiminütiger Messdauer. Abgebildet sind die fluorimetrisch erhobenen R-Werte verschiedener regions of interest (ROIs) eines mit Astrozyten bewachsenen Deckgläschens

2.3.6. Applikationsexperimente

Während dieser Experimente wurden je 500 µl der gp120-Überstände nach 20sec auf die mit Fura-2 beladenen Astrozyten pipettiert und die Calciumreaktion der Zellen gemessen. Um Messfehler durch Applikation einer gefärbten Lösung (DMEM) zu vermeiden, wurde hier ein Zellbad aus 500 µl DMEM gewählt. Es ist bekannt, dass Applikation von FCS einen Calciumanstieg in Astrozyten hervorruft. Deshalb wurden Leerproben aus gp120-freiem serumhaltigen DMEM als Kontrolle getestet. Eine zweite Kontrolle bestand aus der Messung der Calciumantwort auf 50 nM SDF-1β. Die Applikationsexperimente wurden als Blindexperimente durchgeführt, da dem Untersucher nicht bekannt war, welche gp120-Isoform er applizierte.

2.3.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm EXCEL. Dafür wurde die Amplitudenhöhe der jeweiligen ROIs folgendermaßen ermittelt:

Als Baseline wurde der Median der ersten fünf Messwerte gewählt. Als Amplitudenmaximum wurde der höchste Messwert zwischen frame 11 und 25 festgelegt. Die Amplitude selbst wurde über die Differenz zwischen Amplitudenmaximum und Baseline errechnet.

Aus den so erhobenen Daten wurde der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwerts bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Student-t-Tests verglichen. Als signifikant wurden Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ angesehen.

Experimente zur Untersuchung der Apoptoseinduktion und Chemokinsekretion in Neuronen und Astrozyten durch gp120

2.4. Kotransfektion adhärenter HeLa-Zellen mit pGFP und den Expressionsplasmiden

Die Kotransfektion der HeLa-Zellen mit pGFP erfolgte im Neurochemischen Labor der Johns Hopkins University Baltimore unter der Leitung von Prof. Dr. Nath.

Um zu überprüfen, ob die Transfektion der verschiedenen gp120-Expressionplasmide in gleicher Höhe erfolgt, wurden die HeLa-Zellen mit pGFP kontransfiziert.

GFP ist ein fluoreszierendes Protein, das man durch Fluoreszenzmikroskopie nach erfolgreicher Transfektion in den transfizierten Zellen nachweisen kann (Chalfie et al., 1996) und wird als Marker für Genexpression genutzt.

2.4.1. Material und Lösungen

- Zellen
HeLa-Zellen
- Transfektionszubehör

2. Material und Methoden

75 cm² Zellkulturflasche Falcon®

Zentrifuge IEC HN-SII Centrifuge

Pipettenspitzen 1 µl, 2 µl, 20 µl, 200 µl Tip One Cat. III-2821

Pipettierhilfenspitzen Falcon® 5 ml, 10 ml, 25 ml

Pipettierhilfen

Pipetten

0,2 µm Filter Schleicher & Schuell, 10443401

- Lösungen

DMEM GIBCO™, Invitrogen Corporation Cat.No 12800-017

Glucose

L-Glutamin

Pyridoxin Hydrochlorid

110 mg/l Natrium Pyruvat

3.7 g Natrium Bicarbonat SIGMA®

pH~ 7.25

Opti-MEM, GIBCO™, Invitrogen, Corporation Cat. No 22600-050

HEPES Puffer

L-Glutamin

2.4 g Natrium Bicarbonat SIGMA®

FBS, 60 min hitzeinaktiviert, SIGMA® F-2442

Antibiotics-Antimycotics GIBCO™, Invitrogen

Natrium Penicillin

Streptomycin Sulfat

Amphotericin B

In 0.85% NaCl

Trypsin-EDTA (1x) Invitrogen Corporation (GIBCO) Cat. No 25300-054

PBS 10x, pH 7.4 Biosource Cat. No 313NS-444

Lipofectamin 2000, Invitrogen life technologies Cat. No 11668-019

- Fluoreszenzmikroskop Zeiss AxioCam HRC

Software: OpenLab 3.5 alias

2.4.2. Kotransfektion mit pGFP

Die in einer 75 cm² Zellkulturflasche konfluent gewachsenen HeLa-Zellen wurden zweimal mit 2 ml Trypsin-EDTA (1x) gewaschen und danach mit 1 ml Trypsin-EDTA abtrypsinisiert. Die Zellen wurden mit 9 ml 10% FBS in DMEM (im Folgenden als FBS/DMEM bezeichnet) aufgenommen, 7 min bei $\frac{3}{4}$ speed abzentrifugiert (IEC HNSII Centrifuge) und wieder in 10 ml FBS/DMEM supplementiert. Mithilfe der Neubauer Zählkammer wurden 5×10^5 Zellen abgezählt und in einer 6-well-Platte ausgesät und bei 37°C und 7% CO₂ bebrütet.

Nach 24 h erfolgte die Kotransfektion der Zellen mit pGFP, rev und den Expressionsplasmiden durch Lipofectamin 2000. Pro well wurde 1 µg ppp120, 1 µg svcrev, 1,2 µg pGFP mit 4 µl Lipofectamin transfiziert.

Dazu wurden die zu transfizierende DNA mit Opti-MEM auf 50 µl aufgefüllt. Auch Lipofectamin wurde mit Opti-MEM zu einem Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Nach 5 min wurden beide Lösungen miteinander vermischt und 20 min stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die Zellen in den 6-well-Platten 2x mit Opti-MEM gewaschen und mit 700 µl Opti-MEM versehen. Nach 20 min wurde das Gemisch aus Transfektionsreagens und DNA dazu getropft.

Nach 6 h wurde das Medium abpipettiert, die Zellen dreimal mit DMEM gewaschen und 2 ml 10% FBS/DMEM zugegeben. 48 h nach der Transfektion wurden die Überstände abpipettiert und schockgefroren.

Vor der Ernte der Überstände wurden fluoreszenzmikroskopisch transfizierte Zellen ausgezählt und die Anzahl transfizierter Zellen zwischen den verschiedenen Expressionsplasmiden verglichen (s. Abb. 5.1-5.6).

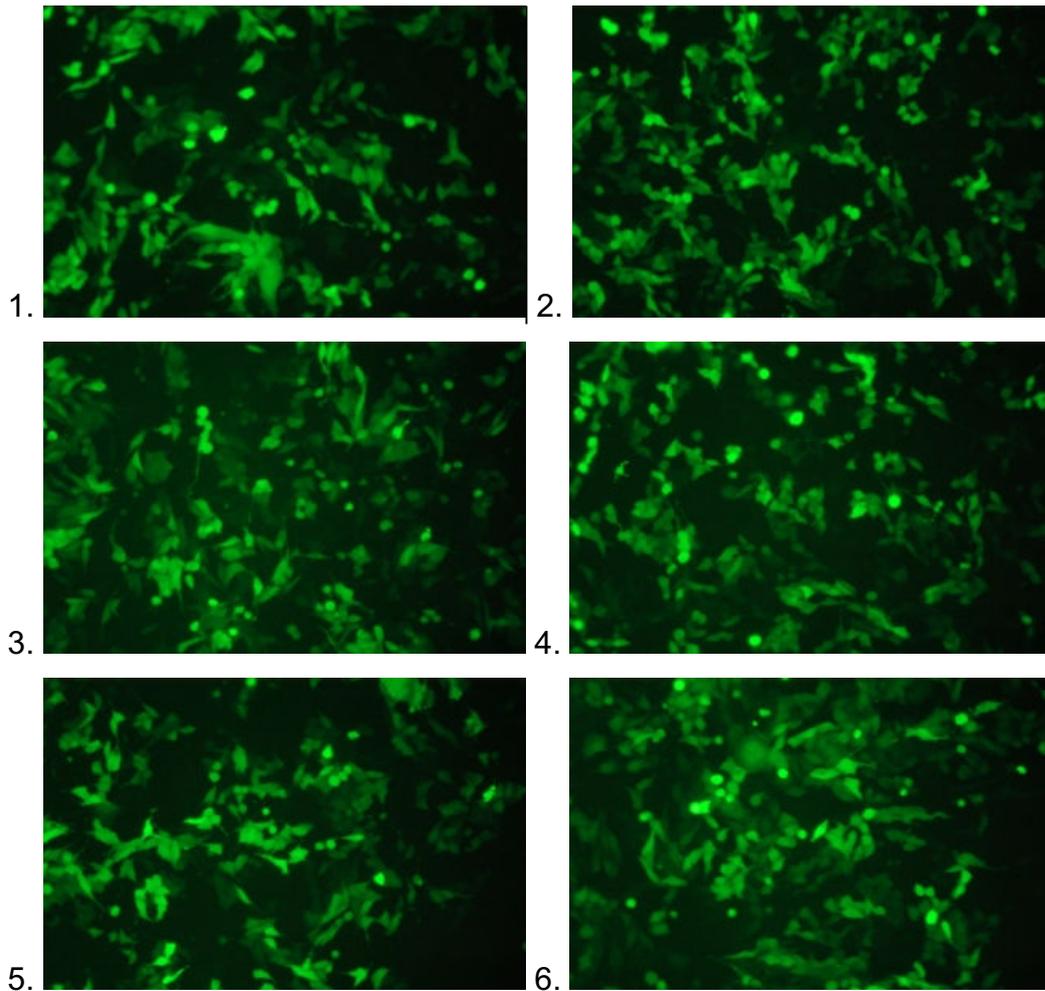


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transfizierten Zellen 1. pgp120 (NL4-3) 2. pgp120(952/61) 3. pgp120(952/105) 4. pgp120(991/17A) 5. Svcrev 6. Kontrolle pGFP. Die Transfektionseffizienz war bei allen Expressionsplasmiden gleich

2.4.3. Transformation der DNA

Um die Reinheit der DNA-Proben zu überprüfen und dann zu vermehren, wurde der Mini- und Maxi-Prep von Quiagen angewendet. Es wurde nach dem Protokoll von Quiagen gearbeitet.

Die DNA-Proben erwiesen sich als rein.

2.5. Das Zellkulturmodell zur Untersuchung der Apoptoseinduktion (Neurochemisches Labor Baltimore)

2.5.1. Material und Lösungen

- Gewebe
Hirngewebe von abgetriebenen humanen Embryonen 12.-17. Gestationswoche. Eine Ethikgenehmigung lag vor.
- Lösungen
DMEM mit 10% FBS, 1% Antibiotika (Penicillin, Amphotericin B, Streptomycin, Sigma A5955)
Poly-D-Lysin
N2-Medium
 - 375 ml DMEM
 - 125 ml HAM'S F12
 - Insulin 5 µg/ml
 - Transferrin 100 µg/ml
 - Glutamin 2 nM
 - Natriumselenit 52 ng/ml
 - Putrescin 16 µg/ml
 - Progesteron 6.29 ng/ml
- Material
Zellkulturflasche
Konische Röhrchen à 15 ml
Petri-Schale
Pipettenspitzen 5 ml
Pipettierhilfen
Plastikspritze mit grauer Nadel (16G)
Zentrifuge IEC HN-SI
24-well plates
Coverslips

2.5.2. Herstellen einer humanen Astrogliakultur

Das Hirngewebe wurde in die Petrischale gegeben und mit der Nadel in kleine Stückchen zertrennt. Die Gewebestückchen wurden mit 5 ml DMEM aufgenommen und in ein kleines Plastikröhrchen gegeben. Dort wurden sie durch eine graue Nadel im Wechsel aspiriert und ejiziert und so das Gewebe zerkleinert und die Zellen aus ihrem Bindewebe gerüst gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. So wurden die Zellen von verunreinigenden Substanzen getrennt. Der Überstand wurde abpipettiert und durch 20 ml FBS/DMEM ersetzt. Darin wurden die Zellen resuspendiert, in eine Zellkulturflasche gegeben und bei 37°C und 7% CO₂ bebrütet.

Nach 5 Tagen wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt: Dabei wurde 15 ml FBS/DMEM ausgewechselt. Dies erfolgte alle 5 Tage bis die Zellen konfluent gewachsen waren.

Sobald sich ein konfluent Monolayer gebildet hatte, wurden die Zellen abtrypsinisiert und erneut ausgesät. Dadurch wurde die Proliferation der Astrozyten angeregt während das Wachstum anderer Zelllinien zurückblieb. Insgesamt wurden die Zellkulturen dreimal passagiert bis sie für die Experimente in 24-well Platten auf Poly-D-Lysin beschichteten Coverslips ausgesät wurden. Sobald sie konfluent gewachsen waren, wurden sie in N2-Medium gegeben.

2.5.3. Die embryonalen Rattenneuronkulturen

X4-tropes gp120 wirkt auf Neurone Apoptose-induzierend (Xu et al., 2003). Um den Einfluss des Tropismus auf diesen gp120-Effekt zu bestimmen, wurde die Toxizität von verschiedenen gp120-Isoformen verglichen. Als Zellkulturmodell wurden embryonale hippocampale Rattenneuronkulturen genutzt. Die Zellkultur erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Norman Haughey, Baltimore.

Für die hippocampalen Neuronkulturen wurden 19 Tage alte Sprague-Dawley Rattenembryonen genutzt. Mittels Äthernarkose wurde das Muttertier getötet und ihr Abdomen in der Mittellinie aufgeschnitten, um den Uterus frei zu präparieren. Die Rattenembryonen wurden aus dem Uterus entnommen, die Köpfe der Tiere abgetrennt und in eine 10 cm² durchmessende Petrischale gegeben. Die Kopfhaut wurde vorsichtig mit einer Pinzette abpräpariert und dann Kopfschwarte sowie Schädel sagittal mit einem feinen Skalpell aufgeschnitten und aufgeklappt. So konnte das Gehirn entnommen und in eine weitere sterile Petrischale gegeben werden.

Die beiden Hirnhälften wurden aufgeklappt, so dass die mediale Seite nach oben zeigte. Mit einem Mikrospatel wurden die lateralen Ventrikel fixiert und durch feine Inzisionen inferior und superior des Mikrospatels der Hippocampus freipräpariert. Das Gewebe wurde mit etwas DMEM aufgenommen und in eine weitere Petrischale gegeben. Dort wurden unter dem Binokular die Meningen entfernt und das Gewebe in kleine Stückchen geteilt.

Dann wurde es mit 5 ml calciumfreier Hank's balanzierter Salzlösung (calciumfree Hank's balanced salt solution) titriert und bei 1000 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 15 ml FBS/DMEM versetzt mit 1% Antibiotika (Penicillin, Amphotericin B, Streptomycin) resuspendiert und in einer Dichte von 200.000 Zellen/ml auf 12 mm durchmessende Poly-D-Laminin-beschichtete Glassplättchen in einer 12-well-Platte ausgesät. Nach 3 Stunden wurde FBS/DMEM durch serumfreies Neurobasales Medium (neurobasal media) ersetzt, das 1% B-27 Supplement (GIBCO) enthielt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 10% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit über 95%.

In früheren Arbeiten konnte die Reinheit der Kulturen durch immunhistochemische Methoden (Immunfluoreszenzfärbung des Mitogen-Activated-Protein-2 (MAP-2)) zu mehr als 98% bestimmt werden (Haughey et al., 2001)

2.6. Die Experimente zur Untersuchung der Neurotoxizität der gp120 Überstände

Die Neuronen wurden 10-14 Tage, nachdem sie auf den Coverslips ausgesät wurden, für die Toxizitätsexperimente genutzt. Auch die Arbeitsgruppe von Haughey hat die hippocampalen Rattenneuronen 10-14 Tage nach Anlegen der Kultur gemessen (Haughey et al., 2001).

2.6.1. Material und Lösungen

- Zellen
Embryonale Rattenneuronen auf Deckgläschen kultiviert
- Lösungen

Trypanblau Farbstoff 0.4% Cat. 15250-061

Hoechst 33342 10 mg/ml in water, Molecular Probes H-3570

Mounting Gel, Biomeda Cat. No. M01 (Aqueous Mounting Medium with Anti-Fading Agents)

Anti-human-CXCR4 rabbit-antibodies, Cell Science Cat. PX172A

Anti-human-CCR5 rabbit-antibodies, Cell Science Cat. PX164A

Anti-rabbit-IgG goat antibodies, Alexa Flour 546

Schafserum, SIGMA G-9023

N2-Medium (s.o.)

4% Paraformaldehyd in PBS, Fisher Scientific T-353-500

PBS 10x, pH 7.4 Biosource Cat. No. 313NS-444

- Material

Objektträger, Fisher Scientific Cat. No. 12-552 25mmx75mmx1mm

Deckgläschen, Fisher Scientific Microscope cover glass

Fluoreszenzmikroskop: Zeiss Axio Cam HRC, Software: OpenLab 3.5

Pipettierhilfen s.o.

Pipettenspitzen s.o.

Pinzette

Große Petrischale

2.6.2. Inkubation der Neurone in gp120 und Trypanblau Färbung

Für die Toxizitätsexperimente wurden die Neurone 2h und 4h in je 500 µl der Überstände inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 500 µl einer 1:1 Verdünnung aus Trypan Blau und DMEM 1-2 Minuten gefärbt, danach 3 mal mit PBS gewaschen und in 2% Paraformaldehyd/PBS-Lösung 20 min fixiert.

Danach wurden die Coverslips mit Hilfe von Eukit, das 0,1% Hoechst 33342-Farbstoff enthielt, auf Objektträger gedeckelt.

2.6.3. Auswertung der Neurotoxizitätsexperimente

Nach 24 h unter einer Temperatur von 4°C wurden die Zellen unter dem Fluoreszenz- und Lichtmikroskop ausgezählt. Mithilfe der Trypanblau-Färbung

konnte die Anzahl avitaler Zellen bestimmt werden. Ungefärbte Zellen sind schwierig auszuzählen. Deshalb wurden, um die Gesamtzellzahl genauer bestimmen zu können, die Zellen zusätzlich mit Hoechst 33342-Farbstoff gefärbt, einem fluoreszierenden Färbemittel, das sich an die Zellkerne anlagert. Dabei färbt der Hoechst-Farbstoff avitaler Zellen nicht an. Als Gesamtzellzahl wurde die Summe der trypanblau- und hoechst-gefärbten Neurone desselben Gesichtsfeldes angenommen. Der Anteil avitaler Zellen berechnete sich also folgendermaßen:

Anteil avitaler Zellen = $\text{Anz. TB}^+ \text{ Zellen} / (\text{Anz. TB}^+ \text{ Zellen} + \text{Anz. Hoechst}^+ \text{ Zellen})$ (s. Abb.6)

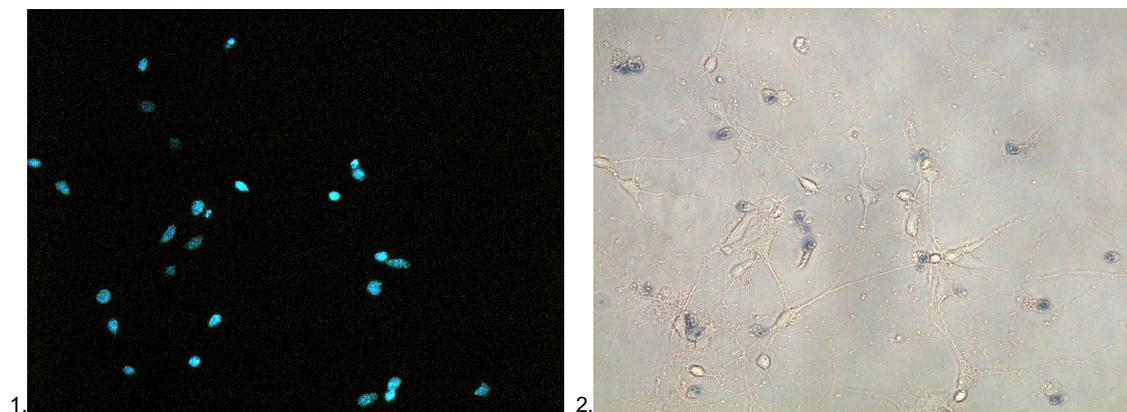


Abbildung 6: 1. Hoechstfärbung und 2. Trypanblaufärbung der Neurone

Von jedem Deckgläschen wurden 10 zufällige Gesichtsfelder ausgezählt und das Experiment wurde dreimal wiederholt, bevor es statistisch ausgewertet wurde.

2.6.4. Durchführung der Blockierungsexperimente

Die Blockierungsexperimente erfolgten analog zu den Experimenten zur Messung der gp120-induzierten Apoptose in Neuronen. 30 Minuten vor Beginn des Experiments wurden die Zellen in 500 μl einer 1:100 Verdünnung mit Anti-CXCR4 und/oder Anti-CCR5-Antikörpern (Cell Sciences, Polyclonal rabbit anti-human) in DMEM/FBS inkubiert. Dabei wurden Zellen, die später in X4-tropem gp120 inkubierten mit Anti-CXCR4 geblockt. Zellen, die R5-tropem gp120 ausgesetzt wurden, wurden vorher mit Anti-CCR5 behandelt und solche, die in den dualtropen gp120-Isoformen inkubieren sollten, mit Anti-CXCR4- und Anti-CCR5-Antikörpern geblockt. Die gp120-haltigen Überstände, die danach auf die Zellen gegeben wurden, wurden ebenfalls mit den entsprechenden Antikörpern versetzt.

2.6.5. Bestimmung der Toxizität des gp120 auf Astrozyten

Die Astrozyten wurden am 10. bis 14. Tag, nachdem sie auf N2 gesetzt wurden, gemessen. Analog zu den Toxizitätsexperimenten der Neurone inkubierten die Astrozyten 24 h in 500 µl der gp120-haltigen Überstände. Danach wurden sie mit Hoechst gefärbt und die Anzahl apoptotischer Zellen über die Form des Zellkerns (pyknotisch, zerfallend) bestimmt (s. Abb. 7). Es wurden am Fluoreszenzmikroskop pro Deckgläschen 10 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder ausgezählt und das Experiment dreimal wiederholt, bevor es statistisch ausgewertet wurde.

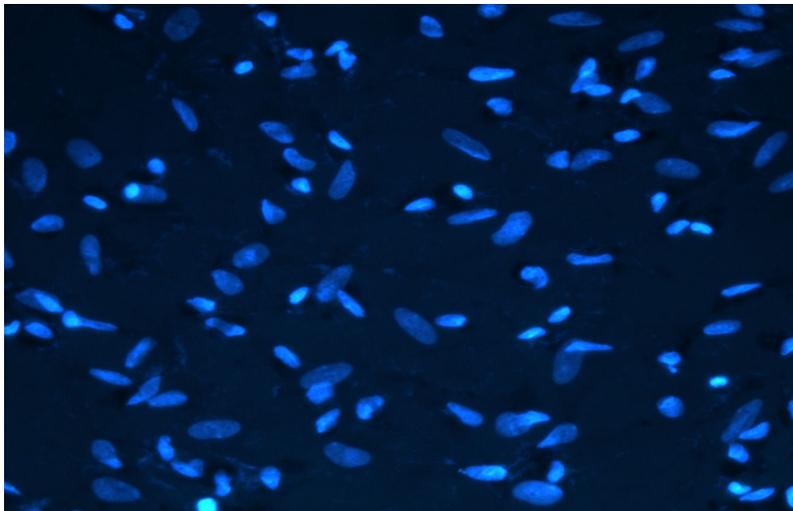


Abbildung 7: Darstellung Hoechst-gefärbter Astrozyten nach 24h Inkubation in X4-tropem gp120

2.6.6. Experimente zur Bestimmung des Anteils der Astrozyten an der gp120-induzierten, indirekten Apoptose

Für diese Experimente wurden humane Astrozyten genutzt, die seit 10-14 Tagen in N2-Medium umgesetzt waren. 750 µl des die gp120-Isoformen enthaltenden Überstands wurden 60 min auf die Zellen gegeben, um die Zellen zur Zytokinproduktion anzuregen. Danach wurden die Astrozyten dreimal in serumfreien DMEM gewaschen und 750 µl FCS/DMEM in jedes well gefüllt. Nach drei Stunden wurden die gp120-freien und nun Sekretionsprodukte enthaltenden Überstände der Astrozyten abpipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die Experimente wurden die Überstände aufgetaut und 12 h auf 10-14 Tage alte hippocampale Rattenneuronenkulturen gegeben. Dann wurden die Neurone mit Trypanblau gefärbt, fixiert und mit 0.1% Hoechst-Eukit auf Objektträger gebracht. Die

Experimente wurden analog zu den Neurotoxizitätsexperimenten zur Untersuchung der direkten Toxizität des gp120 ausgewertet.

2.6.7. CXCR4- und CCR5-Färbung von Rattenneuronen und humanen Astrozyten

Um zu zeigen, dass die untersuchten Zellen die benötigten Korezeptoren für gp120 (CXCR4 und CCR5) exprimieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Neurone und Astrozyten durchgeführt. Dabei wurden je Zellart drei CXCR4- und drei CCR5-Färbungen durchgeführt: zwei Positivfärbungen und eine Negativkontrolle, bei der der Erstantikörper nicht zugegeben wurde, die restliche Färbung aber gleich verlief. Die Negativkontrolle zeigte die unspezifische Bindung der Antikörper.

Je sechs Deckgläschen, die mit Zellen einer Art, entweder embryonalen Rattenneuronen oder embryonalen humanen Astrozyten bewachsen waren, wurden in 6-well plates gegeben und dort dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2% Paraformaldehyd/PBS 20 min fixiert und danach 3x10 min auf dem Schüttler in PBS gewaschen. Daraufhin wurde soviel Schafserum (SIGMA G-9023, 10x) auf die fixierten Zellen gegeben, dass diese gerade bedeckt wurden. Durch das einstündige Einwirken des Schafserums auf die Zellen sollte eine unspezifische Bindung des Erstantikörpers verhindert werden. Nach 1 h wurden 300 µl der Erstantikörperlösung (2 µl Kaninchen Anti-Mensch Anti-CXCR4 oder Anti-CCR5 Antikörper (Cell science Cat. No. PX172A und PX164A) in 1 ml 10% Schafserum) pro well gegeben - bei der Negativkontrolle wurde dieser Schritt unterlassen. Die Zellen inkubierten 60 min auf dem Schüttler in der Erstantikörperlösung. Danach wurden sie erneut dreimal 10 min auf dem Schüttler mit PBS gewaschen. Zur Detektion der Erstantikörperbindung wurden 300 µl fluoreszierende Schafs-Anti-Kaninchen-Antikörper (Alexa flour 546) (4 µl Zweitantikörper in 2 ml 10% Schafserum) pro well gegeben und unter Lichtschutz 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Deckgläschen erneut dreimal 10 min in PBS unter Lichtabschirmung gewaschen, bevor sie mit Eukit auf Objektträger gebracht wurden und über Nacht bei 4°C aushärteten.

Die Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgte nach 24 h bei 546 nm Wellenlänge.

3. Ergebnisse

Calcium spielt für die funktionelle Intaktheit des ZNS eine wichtige Rolle. So reagieren Astrozyten auf Neurotransmitter wie Glutamat mit einer Calciumantwort, die sie befähigt, die exzitatorischen Aminosäuren aufzunehmen und das interzelluläre Milieu im Gehirn in Homöostase zu halten (Berger et al., 1991). Auch können Astrozyten Calciumreize nutzen, um untereinander zu kommunizieren und eine von Neuronen getriggerte Erregung im Gehirn auszubreiten (Guiaume und Venance, 1998). Mit Neuronen können sie rückwirkend kommunizieren, indem sie Neurotransmitter wie Glutamat oder ATP sezernieren und so die Signale der Neurone verstärken. Die große Anzahl der Astrozyten im menschlichen Gehirn unterstreicht die Wichtigkeit eines ungestörten Calciumhaushalts in Astrozyten und zeigt gleichzeitig Angriffspunkte für Noxen, die Hirnfunktion zu stören. Gp120 stört den Calciumhaushalt in Astrozyten (Ciardo et al., 1993). Es wird von infizierten Hirnzellen wie Mikroglia sezerniert und kann in seiner löslichen Form an Astrozyten und Neurone binden. Dabei nutzt es abhängig von seinem Tropismus den Korezeptor CXCR4 (T-tropes gp120), CCR5 (M-tropes gp120) oder beide (dualtropes gp120).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Unterschiede im Tropismus des gp120 mit einer unterschiedlichen Beeinflussung des Calciumhaushalts in Astrozyten einhergehen.

3.1. Untersuchungen zur Funktionalität des CXCR4-Rezeptors

Für die Experimente wurden Astrozyten verwendet, die, nachdem sie auf Deckgläschen konfluent angewachsen waren, zehn bis vierzehn Tage in serumfreien N2-Medium kultiviert wurden. Köller und Mitarbeiter konnten zeigen, dass so die funktionelle Entwicklung des CXCR4-Rezeptors in Astrozyten induziert wird (Köller et al., 2002). Um zu überprüfen, ob die für diese Arbeit genutzten Astrozyten ebenfalls eine CXCR4-Sensitivität zeigten, wurde mithilfe fluoreszenzmikroskopischer Messungen der Calciumeinstrom nach Applikation von SDF1- β , einem natürlichen

3. Ergebnisse

Liganden von CXCR4, gemessen. SDF1- β wurde in DMEM gelöst appliziert. Als Kontrolle dienten Messungen nach Applikation von DMEM.

3.1.1. Astrozyten reagieren auf 50 nM SDF1- β mit einem Calciumeinstrom

Nach Applikation von 50 nM SDF1- β wurde ein Anstieg der Ratio Units [RU] um 0.26 ± 0.004 gemessen ($n=136$) (s. Abb.8). Die Messwerte von SDF1- β und Kontrolle unterschieden sich hochsignifikant ($p < 0.001$). Dies wurde als Zeichen der funktionellen Intaktheit des Rezeptors gewertet und die weiteren Experimente an Astrozyten durchgeführt, die nach gleichem Protokoll kultiviert wurden. Als Kontrolle wurde DMEM appliziert und die Veränderung der Calciumkonzentration in Astrozyten registriert. Es war ein Anstieg um 0.08 ± 0.01 RU zu verzeichnen ($n=67$) (s. Abb.9, Abb. 10, Tab. 1).

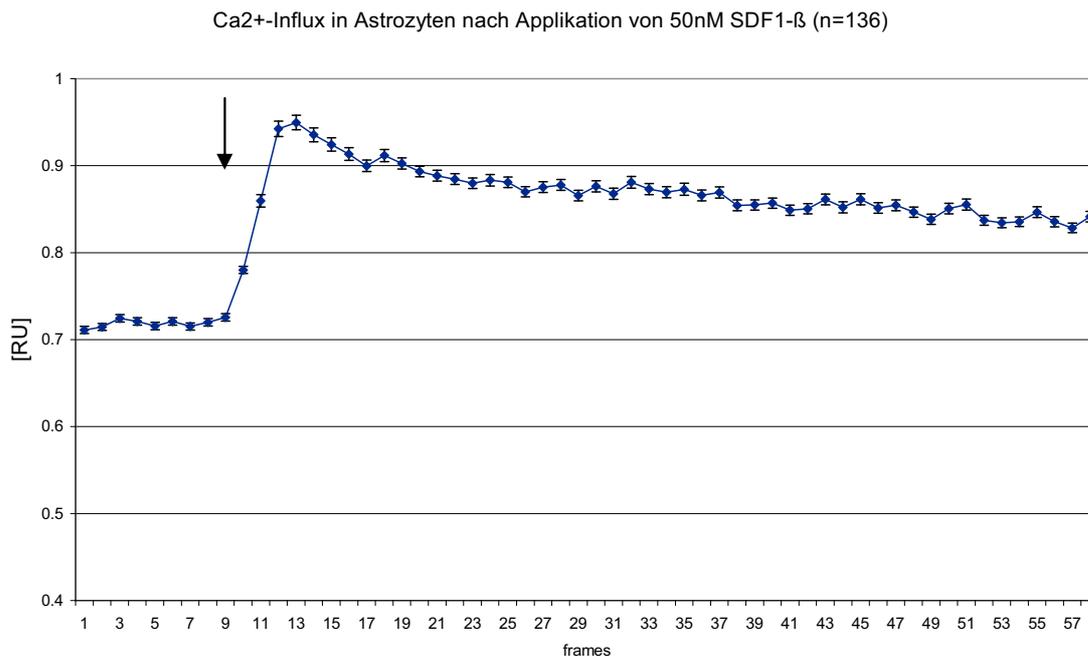


Abbildung 8: Die Abbildung zeigt den Verlauf der Ratio Units nach Applikation von 50 nM SDF1- β (Pfeil)

3. Ergebnisse

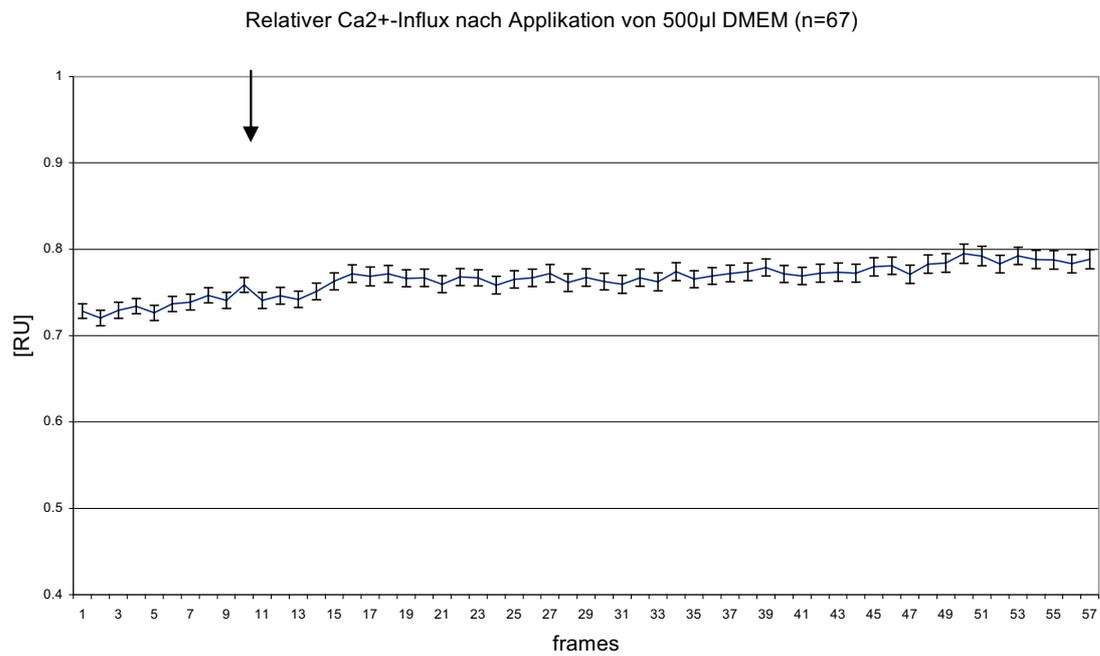


Abbildung 9: Die Abbildung zeigt den Verlauf der Ratio Units nach Applikation von 500 µl DMEM (Pfeil) (n=67)

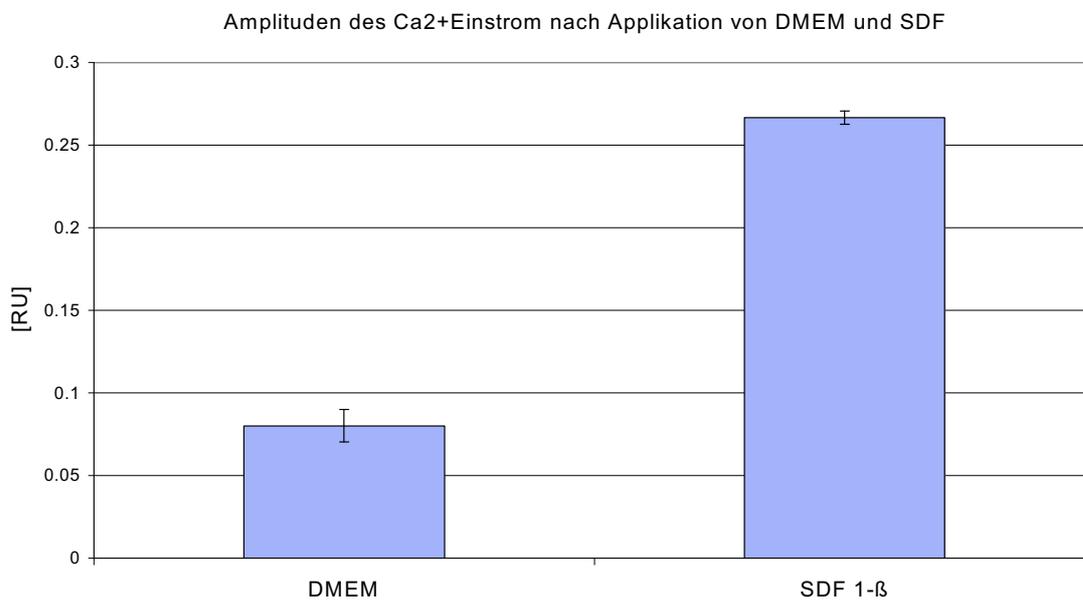


Abbildung 10: Vergleich der maximalen Anstiege der Ratio Units nach Applikation von 500 µl DMEM und 500 µl SDF 1-β

	Calciumanstieg [RU]	Standardfehler	n
DMEM	0.08	0.01	67
SDF1-β	0.27***	0.004	136

Tabelle 1: Der Anstieg der Ratio Units, der den Calciumanstieg widerspiegelt, nach Applikation von 50 nM SDF1-β und DMEM in Astrozyten (***) = hochsignifikanter Unterschied zur Kontrolle, p<0,001)

3.2. Untersuchung zum Einfluss des Tropismus von gp120 auf den Calciumhaushalt in Astrozyten

3.2.1. Gp120 induziert einen Calciumanstieg in Astrozyten

Ciardo und Mitarbeiter konnten zeigen, dass gp120 in Astrozyten zu einem intrazellulären Calciumanstieg führt (Ciardo et al., 1993). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Nach Applikation von 1 ml HeLa-Zell-Überstand, der die T-trope gp120-Isoform enthielt, wurde ein Anstieg des relativen Calciumgehaltes in mit Fura-2 gefärbten Astrozyten um 0,29±0,014 RU gemessen (n=235) (s. Abb. 11).

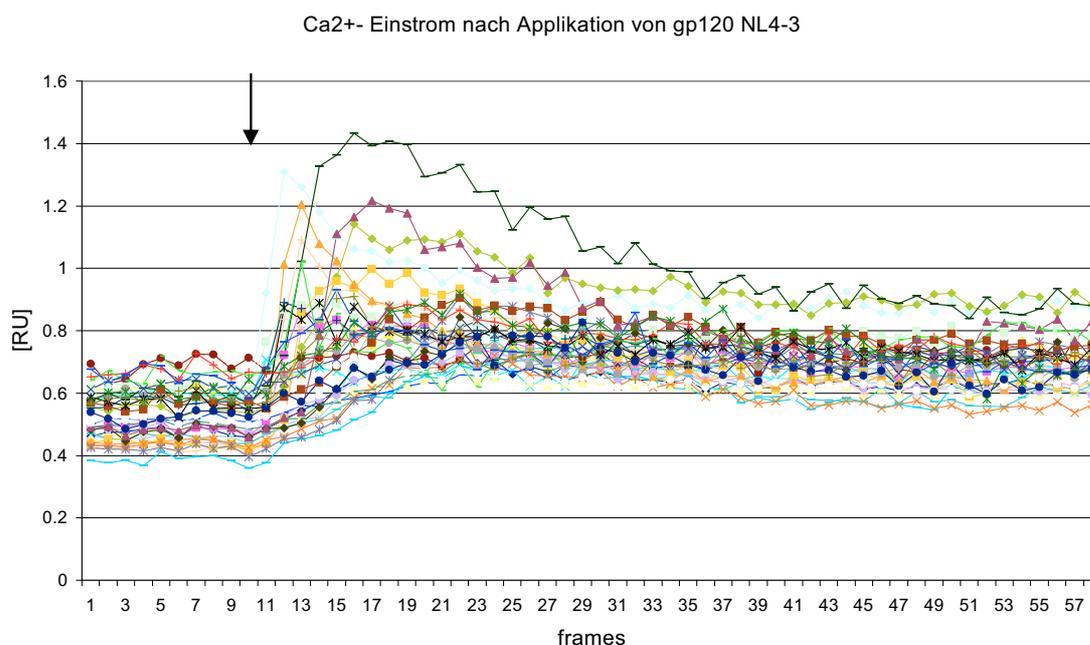


Abbildung 11: Die Abbildung zeigt den relativen Calciumanstieg in Astrozyten nach Applikation von gp120 am Beispiel von der T-tropen gp120 Isoform NL4-3. Gp120 wurde nach 20 sec (frame 10) appliziert (Pfeil)

3.2.2. Der gp120-induzierte Calciumanstieg in Astrozyten ist abhängig von Tropismus und Glycosylierung des gp120

Um den Einfluss von Tropismus und Glycosylierung des gp120 auf die Fähigkeit zur Induktion einer Calciumantwort in Astrozyten zu untersuchen, wurde jeweils 1 ml der zu testenden, je eine der gp120-Isoformen enthaltenden Überstände auf Fura-2 gefärbte Astrozyten gegeben und die relative Calciumkonzentration mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Messungen dargestellt. Die gp120 enthaltenden Überstände wurden durch Transfektion von HeLa-Zellen mit gp120-Expressionsplasmiden (s. Tab. 2) hergestellt. Dabei wurde jeweils 1 µg DNA transfiziert und für jedes Expressionsplasmid nach demselben Protokoll vorgegangen. Die Kotransfektion der HeLa-Zellen mit pGFP zeigte fluoreszenzmikroskopisch eine für alle Expressionsplasmide gleiche Transfektionseffizienz. Für die Applikationsexperimente wurden lösliche T-trope, dualtrope und M-trope Isoformen des gp120 genutzt.

Pgp120(NL4-3)	Wildtyp, X4-monotrop
Pgp120(991-7A)	R5-monotrop
Pgp120(952-61)	R5X4-dualtrop g13 und g14 fehlend
Pgp120(P952-105)	R5X4- dualtrop g13, g14 und g17 fehlend
Pgp120(tat-rev-3Stop)	X4-monotrop

Tabelle 2: Erläuterung der für die Transfektion genutzten Expressionsplasmide

Das dualtrope, an Glycosylierungsstelle g17 glycosylierte gp120(952/61) erzeugte den stärksten Calciumeinstrom in Astrozyten (0.33±0.02 RU; n=224). Fehlte die Glycosylierung des dualtrophen Proteins an g17 war die Calciumantwort signifikant vermindert (p<0.01), aber immer noch deutlich höher (0.26±0.01 RU; n=226) als bei der Kontrolle. Der Mittelwert der durch M-tropes gp120(991/7A) induzierten Ca²⁺-Amplitude (0.32±0.2 RU; n=301) unterschied sich nicht signifikant von dem nach Applikation von gp120(952/61) ermittelten. Der durchschnittliche Calciumeinstrom in Astrozyten nach Applikation von T-tropem gp120(NL4-3) lag bei 0.29±0.01 RU und war geringfügig niedriger als der durch gp120(952/61) hervorgerufene, erreichte aber

3. Ergebnisse

nicht das Signifikanzniveau von 0.05. Im Vergleich zur Kontrolle induzierten alle Überstände einen hochsignifikant höheren Calcium-Einstrom ($p < 0.001$) (s. Tab. 3, Abb. 12).

	Calciumeinstrom [RU]	Standardfehler	n
Gp120(NL4-3)	0.29***	0.01	235
Gp120(952/61)	0.33***	0.02	224
Gp120(952/105)	0.26***	0.01	226
Gp120(991/7A)	0.32***	0.02	301
Kontrolle	0.08	0.01	228

Tabelle 3: Der durchschnittliche Calciumeinstrom in Astrozyten nach Applikation von je 1 ml der zu testenden, je eine der gp120-Isoformen enthaltenden HeLa-Zell-Überstände. Die Kontrolle zeigt den Calciumeinstrom in Astrozyten nach Applikation von Überständen nicht transfizierter HeLa-Zellen (*) = hochsignifikanter Unterschied zur Kontrolle, $p < 0,001$)**

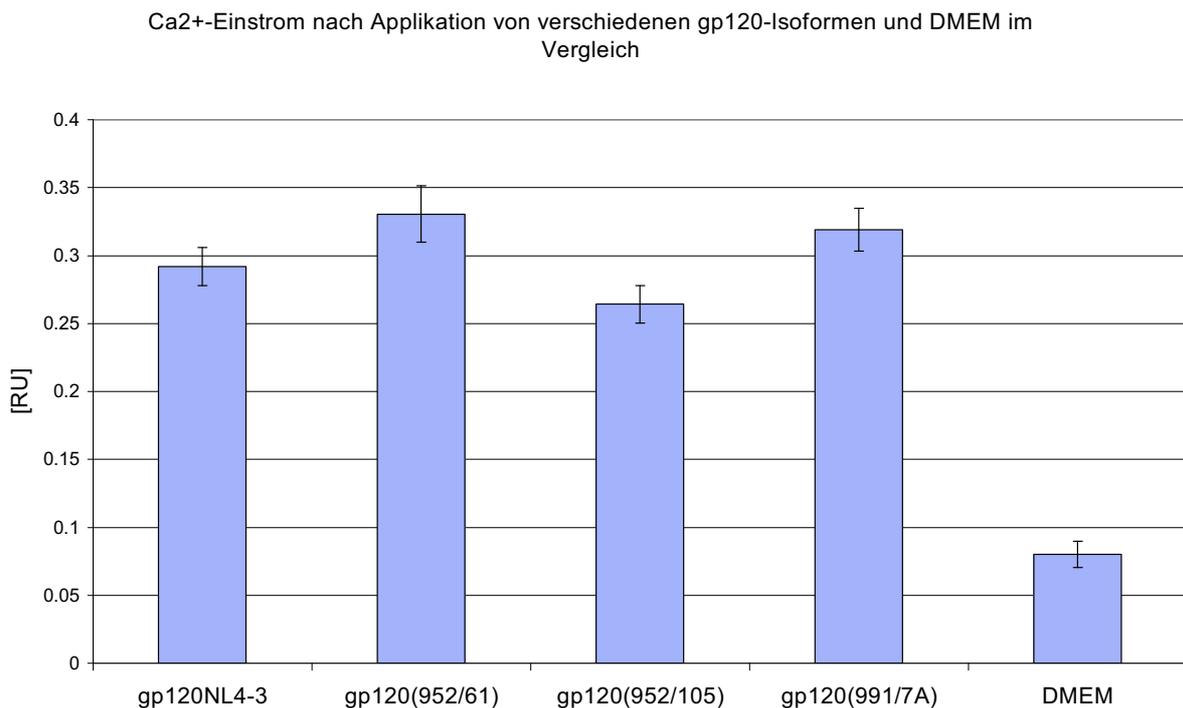


Abbildung 12: Vergleich der durch gp120(NL4-3)-, gp120(952/61)-, gp120(952/105)- und gp120(991/7A)-haltigen Überstände induzierten, durchschnittlichen Calciumeinstöme in Astrozyten. Als Kontrolle wurde Überstand von nicht transfizierten Zellen appliziert

3.3. Messung der ATP- und Glutamatantworten in Astrozyten nach Inkubation in gp120

Während des gesamten Replikationszyklus des Virus scheiden infizierte Zellen, in denen das Genom von HIV repliziert wird, lösliches gp120 aus. Deshalb ist anzunehmen, dass Astrozyten dem gp120 chronisch ausgesetzt sind. Gp120 bindet abhängig von seinem Tropismus an alpha- oder beta-Chemokinrezeptoren und führt zu einem Calciumeinstrom. Es ist daher denkbar, dass die dauerhafte Aktivierung der Chemokinrezeptoren Signalwege anstößt, die den physiologischen Stoffwechsel der Astrozyten stören. Da ATP und Glutamat wichtige Neurotransmitter für die Kommunikation untereinander und zwischen Astrozyten und Neuronen sind, sollte der Einfluss von gp120 auf den Glutamat- und ATP-induzierten Calciumeinstrom in Fura-2 gefärbten Astrozyten nach zweistündiger Inkubation untersucht werden. Dazu wurde nach Inkubation der Zellen in gp120 jeweils 1 mM Glutamat oder 1 mM ATP appliziert und die Calciumantwort der Zellen darauf fluoreszenzmikroskopisch gemessen. Als Kontrolle wurden die Calciumantworten von Astrozyten auf 1 mM Glutamat (s. Abb. 13) und 1 mM ATP (s. Abb. 14) nach Inkubation in Kulturmedium bestimmt. Zudem wurde eine weitere T-trope gp120 Isoform, gp120(tat-rev-3Stop), untersucht.

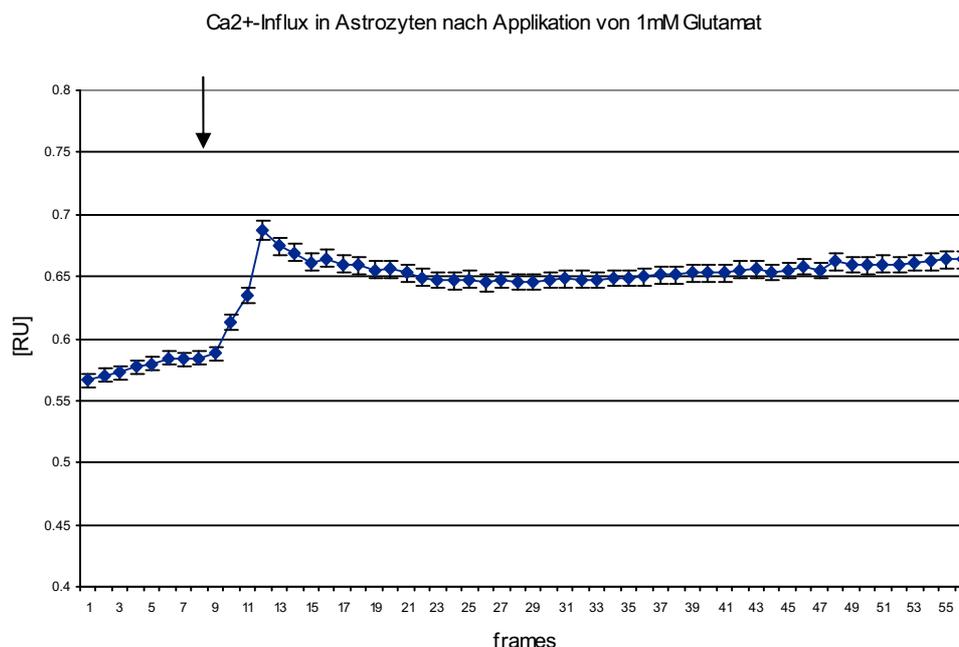


Abbildung 13: Darstellung der durchschnittlichen Calciumantwort von Astrozyten auf 1 mM Glutamat (n=817) (Pfeil)

3. Ergebnisse

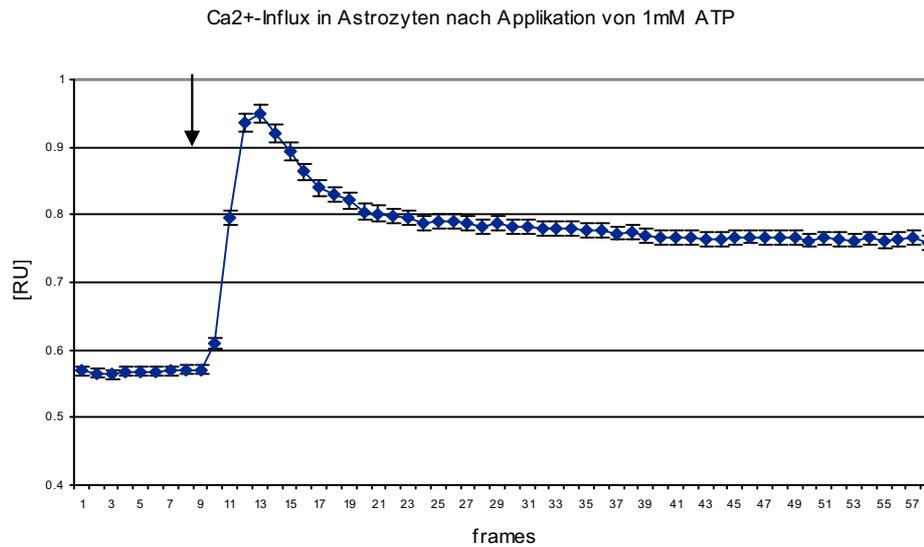


Abbildung 14: Darstellung der durchschnittlichen Calciumantwort von Astrozyten auf 1 mM ATP (n=786) (Pfeil)

Die Astrozyten reagierten auf ATP mit einem intrazellulären Calciumanstieg und einer durchschnittlichen Amplitude von 0.47 ± 0.02 RU (n=786). Nach Applikation von 1 mM Glutamat konnte ein durchschnittlicher Anstieg der Calciumkonzentration um 0.13 ± 0.01 RU (n=652) gemessen werden. Um Störeffekte auszugleichen, weil die Experimente an verschiedenen Astrozytenkulturen durchgeführt wurden, wurden die Calciumantworten nach Inkubation in gp120 an dem durchschnittlichen Calciumeinstrom nach Glutamat- oder ATP-Applikation der Kontrollexperimente normiert. Es werden im Folgenden also nicht absolute, sondern relative Werte dargestellt; die Mittelwerte der Kontrollexperimente als 1 angenommen.

	Normierte Calciumantwort	Standardfehler	n
Glutamat			
Gp120(NL4-3)	0.77***	0.04	848
Gp120(952/61)	1.58***	0.10	659
Gp120(952/105)	1.06	0.06	795
Gp120(991/7A)	2.17***	0.14	568
Gp120(tat-rev-3Stop)	0.69***	0.04	654
Kontrolle Glutamat	1.0	0.05	651

Tabelle 4: Einfluss der Inkubation in verschiedenen gp120-Isoformen auf den Glutamat-induzierten Calciumeinstrom von Astrozyten (*) = hochsignifikanter Unterschied zur Kontrolle, $p < 0,001$)**

3. Ergebnisse

	Normierte Calciumantwort	Standardfehler	n
ATP			
Gp120(NL4-3)	0.78***	0.03	858
Gp120(952/61)	1.49***	0.07	737
Gp120(952/105)	0.9	0.04	880
Gp120(991/7A)	1.44***	0.09	628
Gp120(tat-rev-3Stop)	0.66***	0.02	870
Kontrolle ATP	1.0	0.03	786

Tabelle 5: Einfluss der Inkubation in verschiedenen gp120-Isoformen auf den ATP-induzierten Calciumeinstrom von Astrozyten (*) = hochsignifikanter Unterschied zur Kontrolle, $p < 0,001$)**

Nach Inkubation in X4-tropem gp120 wurde die Calciumantwort auf Glutamat in Astrozyten hochsignifikant gesenkt und zwar um 0.23 ± 0.04 RU ($n=848$) durch gp120 NL4-3 und 0.31 ± 0.04 RU durch gp120(tat-rev-3STOP) ($n=654$) bei einer normierten Calciumantwort in Astrozyten auf Glutamat von 1. Durch Inkubation der Zellen in M-tropem gp120(991/7A) wurde die normierte Calciumantwort auf Glutamat hochsignifikant vergrößert auf 2.17 ± 0.14 RU ($n=568$). Einen geringeren Anstieg der Calciumantwort, aber dennoch hochsignifikant höher als bei der Kontrolle, verursachte die Glutamatapplikation nach Inkubation in dualtropem gp120(952/61) ($n=659$) mit einer durchschnittlichen Amplitude von 1.58 ± 0.1 RU. Einen nicht-signifikanten Einfluss auf den Calciumeinstrom nach Glutamatapplikation hatte das an g17 nicht-glycosylierte gp120 (952/105). Hierbei entsprach die gemessene Calciumantwort mit 1.06 ± 0.06 RU ($n=795$) dem Kontrollwert (s. Abb. 15). Ähnlich verhielten sich die Amplituden bei den durch ATP hervorgerufenen Calciumeinstromen. Auch hier zeigte sich durch Inkubation der Astrozyten in den T-tropen Isoformen eine signifikante Reduktion der Calciumantwort. Eine Vergrößerung der Amplitude wurde ebenfalls nach Einwirkung von M-tropen gp120 und dualtropen gp120 beobachtet. Bei dualtropem gp120 war der Effekt ebenfalls abhängig von der Glycosylierung an Position g17(s. Abb. 16).

3. Ergebnisse

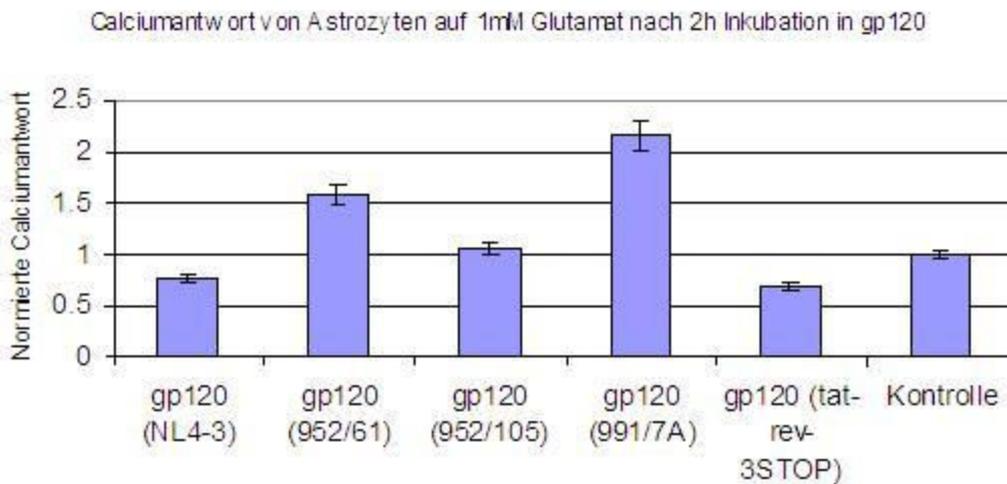


Abbildung 15: Darstellung der normierten Calciumantwort der Astrozyten auf 1 mM Glutamat nach zweistündiger Inkubation in gp120. Nach Inkubation in T-tropem gp120 ist die Calciumantwort im Vergleich zur Kontrolle vermindert, während nach Inkubation in M-tropem gp120 und dualtropem gp120 die Calciumantwort im Vergleich zur Kontrolle steigt. Das an g17 nicht-glycosylierte dualtrophe gp120 ändert die Calciumantwort im Vergleich zur Kontrolle nicht

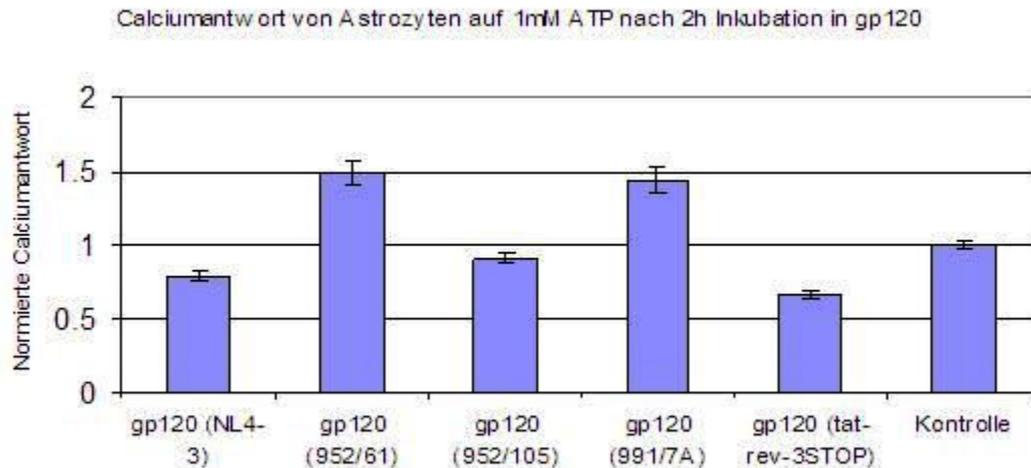


Abbildung 16: Darstellung der normierten Calciumantwort der Astrozyten auf 1 mM ATP nach zweistündiger Inkubation in gp120. Nach Inkubation in T-tropem gp120 ist die Calciumantwort im Vergleich zur Kontrolle vermindert, während nach Inkubation in M-tropem gp120 und dualtropem gp120 die Calciumantwort im Vergleich zur Kontrolle steigt. Das an g17 nicht-glycosylierte dualtrophe gp120 ändert die Calciumantwort im Vergleich zur Kontrolle nicht

3.4. Untersuchungen zur gp120 induzierten Apoptose in Neuronen und Astrozyten

Die Neuronendegeneration ist ein wichtiger Faktor der HIV-1-Infektion, der zur HIV-1-induzierten Enzephalopathie führt. Obwohl Neuronen kein CD4 exprimieren, gibt es vielfältige Studien, die die Rolle des gp120 an der HIV-1 induzierten Apoptose in Neuronen unterstreichen (Hesselgesser et al., 1998; Kaul und Lipton, 1999). Dreyer und Mitarbeiter (1990) und später Meucci und Miller (1996) konnten zeigen, dass gp120 Astrozyten und Neurone schädigt und in vivo und in vitro Apoptose in Neuronen induziert. Als Ursache für die Neurotoxizität des gp120 sind direkt und indirekt toxische Wirkungen des gp120 beschrieben worden (Kaul und Lipton, 1999). Im folgenden Abschnitt werden Ergebnisse der Experimente gezeigt, die die gp120-induzierte Apoptose im Hinblick auf den Tropismus des Virus untersuchen.

3.4.1. Hippocampale Rattenneurone und humane Astrozyten exprimierten CXCR4 und CCR5

Bezüglich der Fähigkeit zur Apoptoseinduktion in Rattenneuronen und humanen Astrozyten wurden T-trope, M-trope und dualtrope gp120-Isoformen untersucht. Um zu überprüfen, ob die verwendeten Zellen CXCR4 und CCR5 exprimieren, wurde eine CXCR4- und CCR5-Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-humanen polyklonalen Kaninchenantikörpern (Cell Science) an den Neuronen und Astrozyten durchgeführt. Auf den Rattenneuronen und den humanen Astrozyten waren beide Rezeptoren nachweisbar. Klein et al. (1999) haben die Anwesenheit von CXCR4- und CCR5-Rezeptoren auf Astrozyten beschrieben. Insofern konnten ihre Ergebnisse hiermit bestätigt werden (s. Abb. 17, Abb. 18, Abb. 19).

3. Ergebnisse

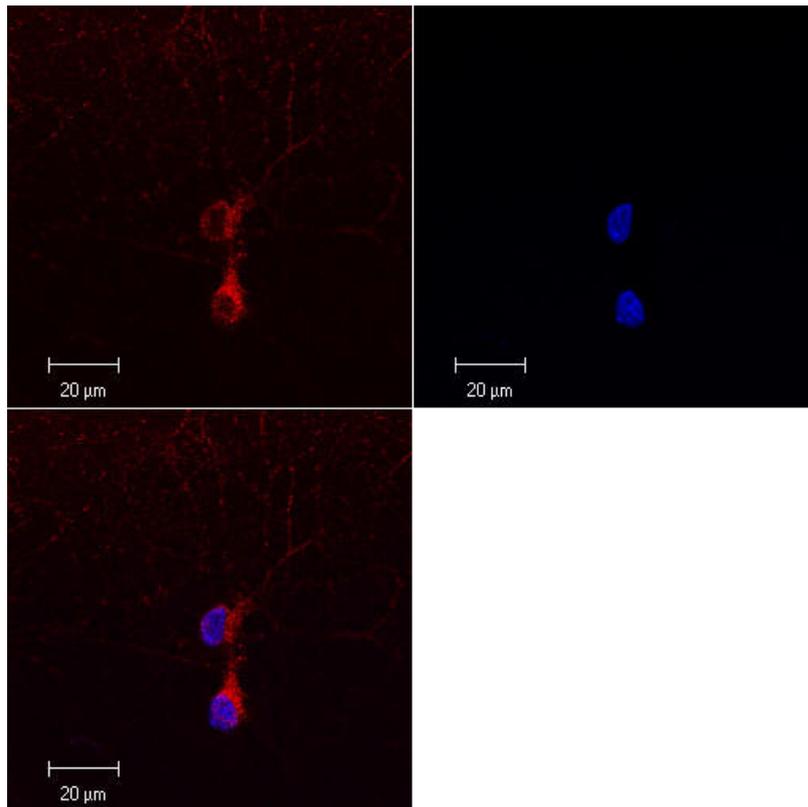


Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung der CXCR4-Rezeptoren (links oben) und Zellkerne (rechts oben) auf Neuronen. Unten: Zusammengesetztes Bild

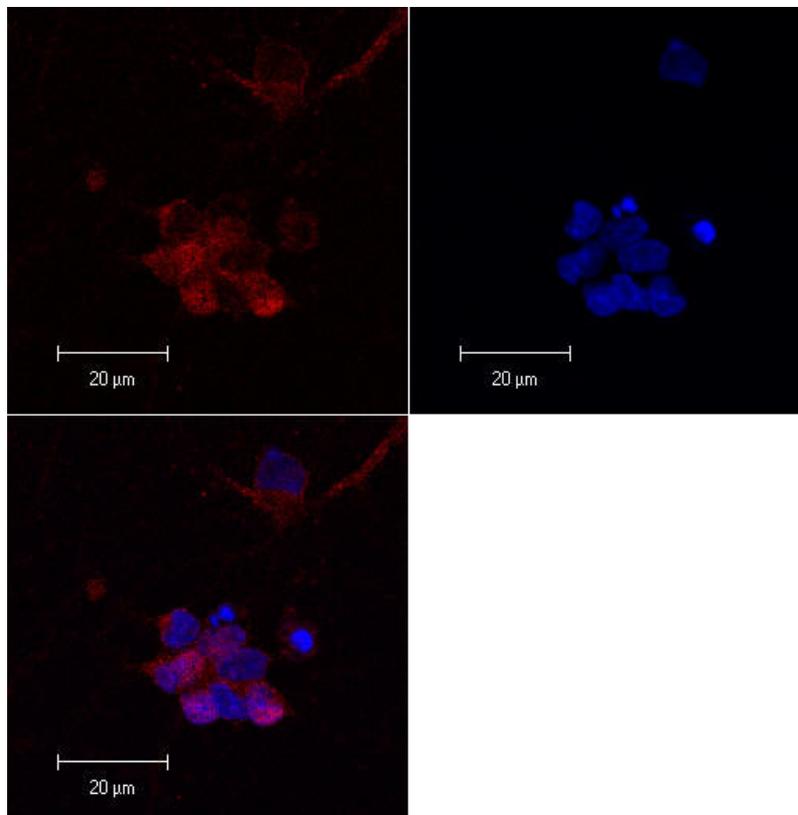


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung der CCR5-Rezeptoren (links oben) und Zellkerne (rechts oben) auf Neuronen. Unten: Zusammengesetztes Bild

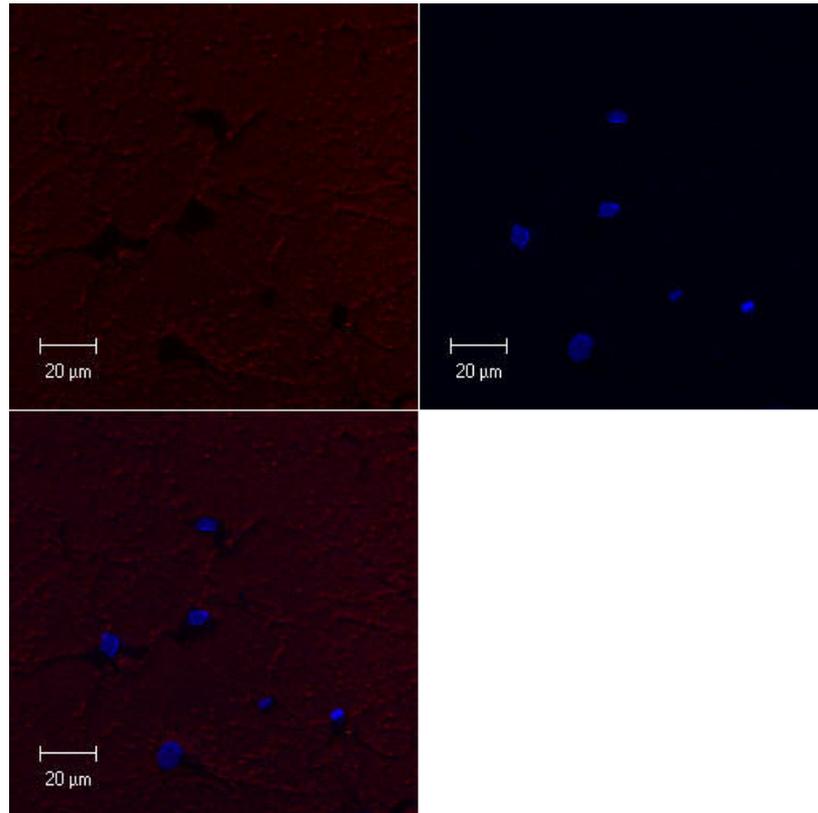


Abbildung 19: Negativkontrolle: unspezifische Farbstoffbindung (links oben) und Zellkerne (rechts oben) von Neuronen. Unten: Zusammengesetztes Bild

3.4.2. Die Neurotoxizität des gp120 wird durch dessen Tropismus beeinflusst

Es ist bekannt, dass T-tropes gp120 ein neurotoxisches Protein ist. Da gesehen wurde, dass die gp120-induzierte Calciumdysregulation in Astrozyten von Tropismus und Glycosylierung des HIV-Oberflächenproteins abhängt, sollte untersucht werden, ob die Struktur des gp120 auch seine Neurotoxizität bestimmt. Dazu wurden hippocampale Rattenneurone 2 Stunden in 500 µl gp120-haltigen Überständen inkubiert. Die für die Experimente verwendeten gp120-Isoformen wurden durch Transfektion von HeLa-Zellen mit T-tropen, dualtropen und M-tropen gp120-Expressionsvektoren hergestellt, wobei die Transfektionseffizienz der Expressionsvektoren gleich groß war (s.o.). So konnte davon ausgegangen werden, dass trotz fehlender Konzentrationsbestimmung des gp120 im Wesentlichen gleiche Mengen des Proteins in den Überständen waren. Gp120 wurde mit rev kotransfiziert. Deshalb wurde zusätzlich die Toxizität von rev als Kontrollparameter überprüft. Nach zweistündiger Inkubation der Neurone in den gp120-haltigen Überständen wurde nach Trypanblau- und Hoechst-33342-Färbung der relative Anteil avitaler Zellen

3. Ergebnisse

bestimmt. Im Vergleich zur Kontrolle induzierte X4-tropes gp120 einen 1.46-fach+/-0.01 vermehrten Zelltod (n=835) (hochsignifikant), R5-tropes gp120 vergrößerte den Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle 1.37-fach+/-0.01 (n=757) (hochsignifikant). Die dualtropen gp120-Proteine erwiesen sich unterschiedlich neurotoxisch. Während das glycosylierte gp120(952/61) einen 1.27-fach+/-0.01 (n=917) signifikant verstärkten Zelltod induzierte, veränderte das nicht-glycosylierte gp120(952/105) (n=852) den Anteil gestorbener Zellen nicht signifikant (s. Abb. 20, Tab. 6).

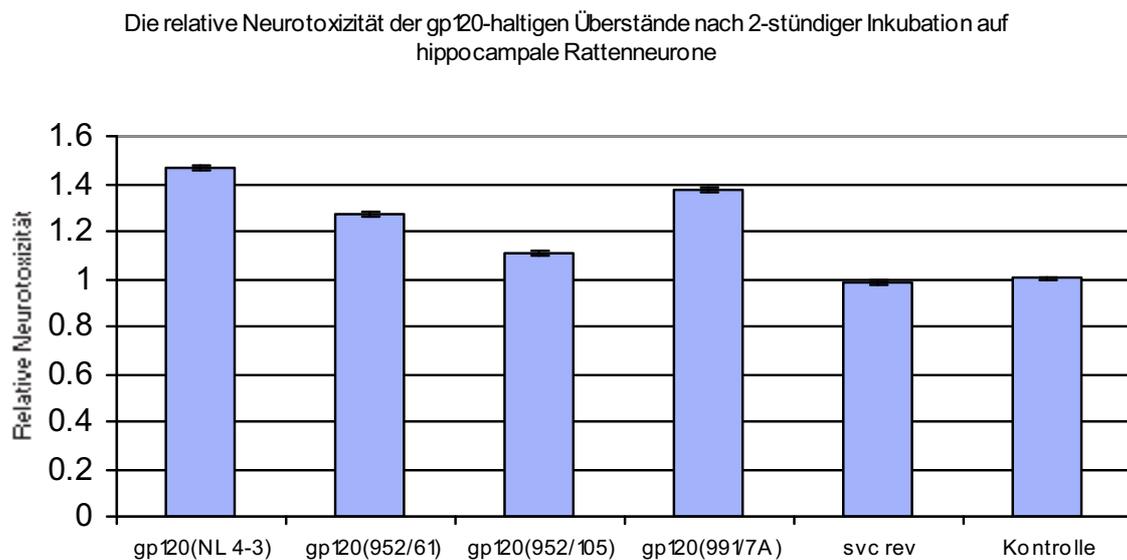


Abbildung 20: Dargestellt ist die Anzahl avitaler Rattenneurone nach zweistündiger Inkubation in verschiedenen gp120- und rev-Überständen normiert an der Kontrolle

	Rel. Neurotoxizität	Standardfehler	N
Gp120(NL4-3)	1.47***	0.01	835
Gp120(952/61)	1.28*	0.01	917
Gp120(952/105)	1.10	0.01	852
Gp120(991/7A)	1.37***	0.01	757
svc rev	0.99	0.01	849
Kontrolle	1.0	0.01	941

Tabelle 6: Die Neurotoxizität der gp120-Isoformen nach 2-stündiger Inkubation auf hippocampale Rattenneuronen (***) = hochsignifikanter Unterschied zur Kontrolle, $p < 0,001$; * = signifikanter Unterschied zur Kontrolle, $p < 0,01$)

3.4.3. Durch Anti-CXCR4-Rezeptor- und Anti-CCR5-Rezeptor-Antikörper wird die Neurotoxizität des gp120 blockiert

Um herauszufinden, ob der gesehene Effekt durch gp120 vermittelt wird, wurde dasselbe Experiment mit Zugabe von 500 µl einer 1:100 Verdünnung mit Anti-CXCR4 und/oder Anti-CCR5-Antikörpern (Cell Science, Polyclonal rabbit anti-human) in DMEM/FCS wiederholt. Der relative Anteil nicht vitaler Zellen unterschied sich nun nicht mehr signifikant, wobei besonders der Effekt des T-tropen gp120 (durch den Anti-CXCR4-Antikörper) blockiert wurde (s. Abb. 21, Tab. 7).

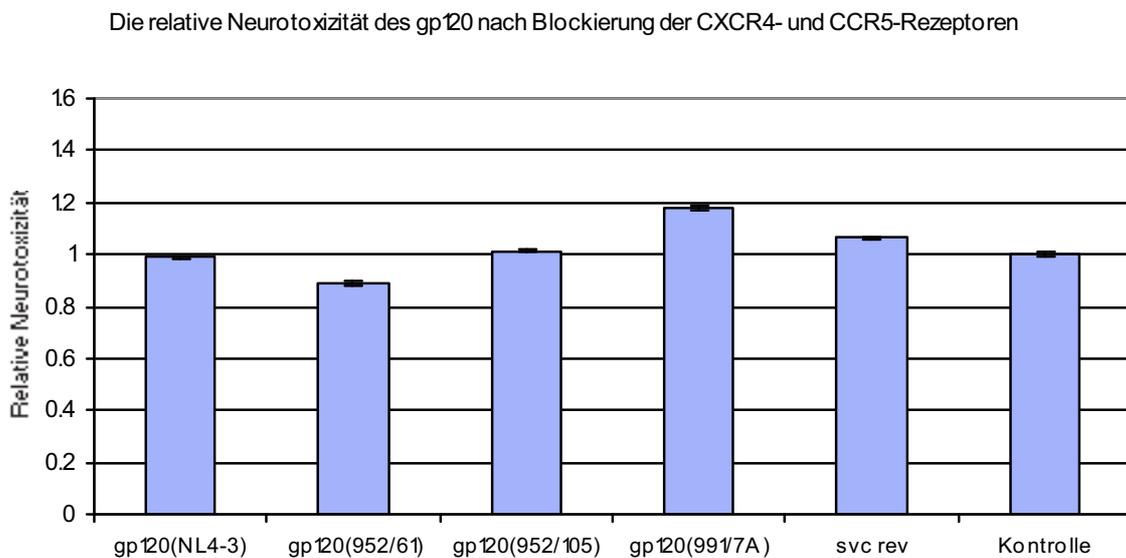


Abbildung 21: Dargestellt ist der Anteil avitaler Neurone nach zweistündiger Inkubation in verschiedenen gp120-Überständen und nach Blockierung von CXCR4 und/oder CCR5 normiert an der Kontrolle

	Rel. Neurotoxizität	Standardfehler	n	Blockade
Gp120(NL4-3)	0.988	0.23	1461	Anti-CXCR4
Gp120(952/61)	0.89	0.27	1283	Anti-CXCR4, Anti-CCR5
Gp120(952/105)	1.014	0.23	1635	
Gp120(991/7A)	1.18	0.33	1495	Anti-CCR5
Svc rev	1.06	0.24	1639	keine
Kontrolle	1.0	0.26	1585	keine

Tabelle 7: Die Neurotoxizität der gp120-Isoformen nach Blockade von CCR5 und CXCR4

3.4.4. Die Neurotoxizität der dualtropen gp120-Proteine ist abhängig von der Einwirkungsdauer auf Neurone

Gp120 kann im Liquor von Patienten mit HAD nachgewiesen werden (Ruff et al., 1990; Buzy et al, 1992)). Somit kann eine chronische Einwirkung des Proteins angenommen werden. Es stellt sich die Frage, ob die Einwirkungsdauer des gp120 einen Einfluss auf dessen Neurotoxizität hat. Deshalb wurden Neurone 2 h und 4 h in gp120 inkubiert und der Anteil avitaler Zellen im Anschluss bestimmt und verglichen. Gp120(952/61) induzierte nach zweistündiger Inkubationszeit eine im Vergleich zur Kontrolle 1.27-fach+/-0.01 (n=1283) (signifikant) verstärkte Neurotoxizität; nach vierstündiger Inkubationszeit wurde eine 1.51-fache+/-0.01 (n=1387) (hochsignifikante) Erhöhung des relativen Anteils apoptotischer Zellen gesehen. Der Anstieg der Neurotoxizität ist allerdings nur gering signifikant (p=0.03). Das nicht-glykosylierte gp120(952/105) induzierte nach 2h einen 1.1-fach +/- 0.01 (n=1635) erhöhten Anteil avitaler Zellen (nicht signifikant), welcher nach 4h auf 1.2 +/-0.01 (n=1069) (nicht signifikant) anstieg. Die Vergrößerung der Neurotoxizität nach 4h ist nicht signifikant (p=0.34) (s. Abb. 22).

Der nicht-normierte, in den Kontrollgruppen gemessene Anteil avitaler Zellen betrug nach 2 h und 4 h je 0.2 und unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant (p>0.85) (s. Abb. 23, Tab. 9)

		Mittelwert	Standardfehler	N
2 h	Gp120(952/61)	1.27*	0.01	1283
	Gp120(952/105)	1.1	0.01	1635
	Kontrolle 2h	1.0	0.01	1585
4 h	Gp120(952/61)	1.51***	0.01	1387
	Gp120(952/105)	1.2	0.01	1069
	Kontrolle 4h	1.0	0.01	811

Tabelle 8: Der Einfluss der Einwirkungsdauer auf die Neurotoxizität der dualtropen gp120 (= hochsignifikanter Unterschied zur Kontrolle, p<0,001; * = signifikanter Unterschied zur Kontrolle, p<0,01)**

Die relative Neurotoxizität dualtroper gp120-Isoformen nach 2h und 4h

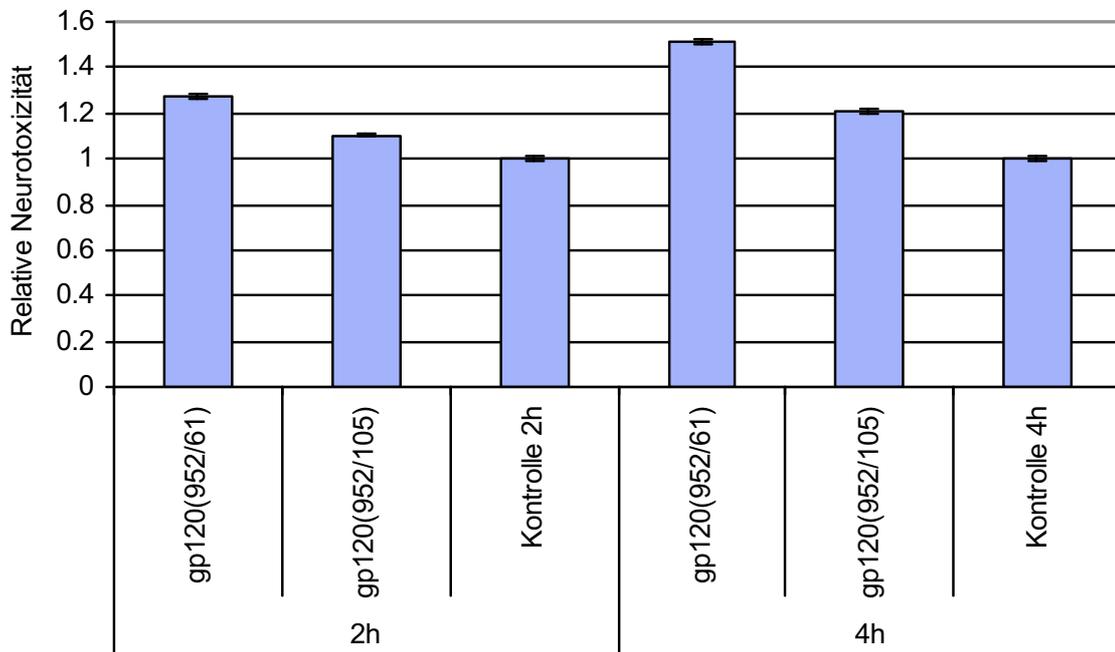


Abbildung 22: Vergleich der normierten Neurotoxizität der dualtropen gp120-Isoformen nach 2 h und 4 h. Die dargestellte Neurotoxizität von gp120 wurde in den beiden Gruppen jeweils an dem Anteil avitaler Zellen in der Kontrolle normiert

Die durchschnittliche Neurotoxizität in den Kontrollgruppen nach 2h und 4h

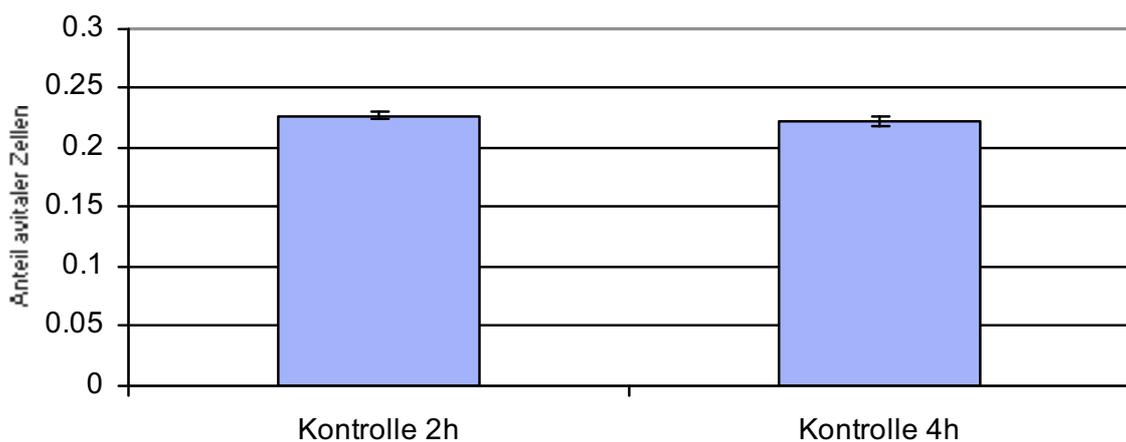


Abbildung 23: Der in den Kontrollgruppen gemessene Anteil avitaler Zellen nach 2 h und 4 h

	Mittelwert	Standardfehler	n
Kontrolle 2 h	0.2	0.01	1585
Kontrolle 4 h	0.2	0.01	811

Tabelle 9: Der nicht-normierte, in den Kontrollgruppen gemessene Anteil avitaler Zellen nach 2h und 4h

3.4.5. Gp120 wirkt auf Astrozyten nicht Apoptose-induzierend

Astrozyten wurden 24 h in dem gp120-haltigen Überstand inkubiert und danach die Zytotoxizität gemessen. In keinem Überstand wurde eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Gliotoxizität nachgewiesen.

3.4.6. Unter den gegebenen Zellkulturbedingungen sezernieren Astrozyten keine neurotoxischen Faktoren

Lange wurde angenommen, dass gp120 in erster Linie durch Bindung an den CXCR4-Rezeptor auf Neuronen einen direkten neurotoxischen Effekt hat. Kaul et al. konnten 1999 einen indirekt neurotoxischen Effekt des Proteins nachweisen. Dabei aktiviert gp120 Makrophagen und Mikroglia, welche daraufhin toxische Chemokine oder inflammatorische Cytokine (z.B. Metaboliten der Arachidonsäure) sezernieren, welche die Neuronendegeneration in Gang setzen (s. Schema auf Seite 9). Auch Astrozyten wurde ein Anteil an der indirekten Neurotoxizität zugesprochen (Bezzi et al., 2001). Hierbei wird die gp120-induzierte NO-Synthetase in Astrozyten als Ursache für die indirekte, astrozytär vermittelte Neurotoxizität diskutiert (Nath, 1999). Deshalb sollte die indirekte, durch Astrozyten vermittelte gp120-induzierte Apoptose in Neuronen untersucht werden. Dazu wurden 750 µl gp120-haltiger Überstände 60 min auf Astrozyten gegeben, um die Zellen anzuregen. Dann wurde das Medium gewechselt und nach 3 h kollektiert. Die Überstände, die nun die durch die Astrozyten in den Überstand sezernierten Faktoren enthielten, wurden auf Neurone gegeben und wirkten 12 h ein. Es konnte bei keinem der Überstände eine erhöhte Neurotoxizität im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (s. Abb. 24, Tab. 10).

3. Ergebnisse

Anteil avitaler Zellen nach 12-stündiger Inkubation hippocampaler Rattenneuronen in Astrozytenüberständen

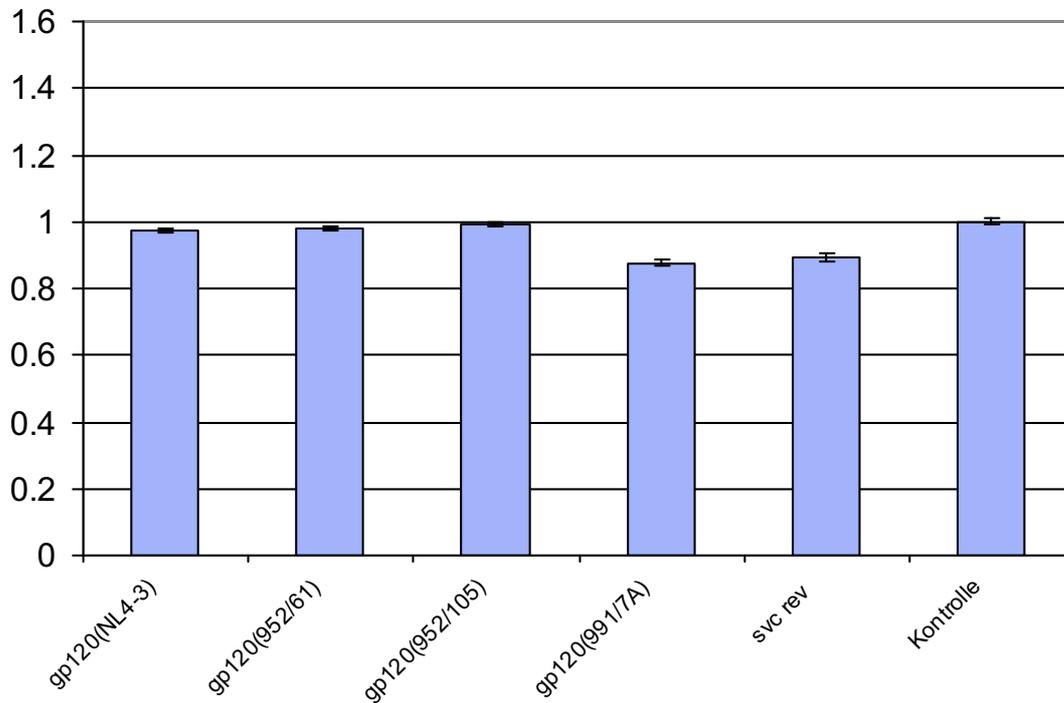


Abbildung 24: Darstellung der normierten Neurotoxizität der Überstände von Astrozyten, die 60 min durch gp120 angeregt wurden. Unabhängig von dem Tropismus des gp120 induzierte kein Überstand verstärkt Apoptose

	Mittelwert	Standardfehler	n
Gp120(NL4-3)	0.97	0.007	1672
Gp120(952/61)	0.98	0.008	1683
Gp120(952/105)	0.99	0.007	1264
Gp120(991/7A9)	0.88	0.01	688
Svc rev	0.9	0.01	419
Kontrolle	1	0.01	734

Tabelle 10: Die Daten zeigen den an der Kontrolle normierten Anteil avitaler Neurone nach zwölfstündiger Inkubation in Überständen von Astrozyten, die 60 min durch gp120 angeregt wurden. Unabhängig von dem Tropismus des gp120 induzierte kein Überstand verstärkt Apoptose

4. Diskussion

4.1. Methodenkritik

In der vorliegenden Arbeit wurden gp120-Isoformen, die sich in Tropismus und Glycosylierung unterschieden, hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Transmitter-induzierten intrazellulären Calciumanstiege, Sekretion neurotoxischer Stoffe und Apoptoseinduktion in Astrozyten untersucht und verglichen. Außerdem wurde die Neurotoxizität dieser gp120-Isoformen gemessen.

Für die Calciummessungen in Astrozyten wurde die Methode nach Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985) genutzt, eine Methode, bei der ein Fluoreszenzmikroskop (D104G, Deltascan) intrazelluläre Calciumkonzentrationen als relative Werte ermittelt. Die Messung und Auswertung der Rohdaten erfolgte automatisch mittels Fluoreszenzmikroskops und Computerprogramms und war durch den Untersucher kaum beeinflussbar. Somit konnte bei dieser Experimentenreihe der Untersucherfehler gering gehalten werden. Kritisch zu sehen ist, ob die Messergebnisse tatsächlich auf die applizierten Substanzen oder auf unspezifische Reaktionen zurückzuführen sind. Für einen spezifischen, Rezeptor vermittelten Effekt von gp120 sprechen mehrere Punkte:

- Es ist bekannt, dass Astrozyten die Korezeptoren CXCR4 und CCR5 exprimieren. Unter Zellkulturbedingungen, zeigten Köller und Mitarbeiter 2000, ist die Aktivität des astrozytären CXCR4-Rezeptors am 8.- bis 12.Tag in serumfreien Medium am größten. Die Experimente wurden deshalb nur an entsprechend kultivierten Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurde vor den Experimenten die funktionelle Aktivität des Rezeptors durch Applikation seines Liganden SDF1- β (Bleul et al., 1996; Obelin et al., 1996) und Messung eines evozierten Calciumanstiegs gesichert.
- Die Calciummessungen wurden als Blindexperimente in mehreren Messreihen durchgeführt. Unabhängig voneinander zeigten in den Inkubationsexperimenten zwei T-trope gp120-Isoformen eine gleiche Wirkung auf Astrozyten, aber eine gegensätzliche Wirkung zu den M-tropen Isoformen,

was den Einfluss des Tropismus von gp120 und damit die Spezifität des gesehenen Effekts unterstreicht.

- Der Verlust der Glycosylierung an Glycosylierungsstelle g17 ging mit einem Wirkungsverlust des gp120 einher. Dieser Effekt konnte in zwei verschiedenen Laboren - im Neurochemischen Labor in Düsseldorf und im Neurochemischen Labor in Baltimore - nachgewiesen werden. Die Konstanz dieses Phänomens unter verschiedenen Zellkulturbedingungen unterstreicht die Spezifität der Messergebnisse.

Die Toxizitätsexperimente wurden mittels Trypanblau-Vitalitätstests und Hoechst 33342-Färbung in Baltimore an Astrozyten und Neuronen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der gefärbten Zellen am kombinierten Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Zeiss AxioCam HRC, Software: Openlab 3.5 alias) durch den Untersucher. Um den Untersucherfehler kontrollierbar zu machen, wurden pro auszuwertendem, behandelten Deckgläschen 10 zufällig eingestellte Mikroskopaufnahmen abfotografiert und ausgezählt. Das maschinelle Auszählen ist eine Alternative mit geringerem Einfluss des Untersuchers, wurde aber wegen des systematischen Fehlers bei Größenveränderung der Zellen durch Zelltod bewusst abgelehnt.

Auch bei den Toxizitätsexperimenten stellt sich die Frage nach der Spezifität des gesehenen Effekts.

- Unter den gegebenen Laborbedingungen hatten die gp120-Isoformen keinen morphologisch-nachweisbar toxischen Effekt auf Astrozyten, während Neurone sehr sensitiv im Vitalitätstest nachweisbar auf gp120 reagierten. Auch zeigte sich die Toxizität der gp120-Isoformen nicht nur abhängig von dem untersuchten Zelltyp, sondern auch abhängig von der Isoform selbst. Gp120-Überstände, die die gp120-Isoform ohne Glycosylierung an g17 enthielten, waren nicht neurotoxisch. Beide Punkte sprechen für einen spezifischen Effekt des gp120 und gegen unspezifische Toxizität.
- Die Toxizität der dualtropen gp120-Überstände war abhängig von der Einwirkungsdauer der Überstände auf Neurone, während bei unterschiedlicher Inkubationsdauer in gp120-freien Kontrollmedien der Anteil avitaler Neurone in den Kontrollgruppen konstant blieb. Je länger die Zellen in gp120 inkubierten,

desto größer war die Toxizität. Auch dies spricht für einen spezifischen, durch gp120 induzierten Effekt.

- Als dritter Punkt, der unterstreicht, dass die Toxizität in den Experimenten auf gp120 zurückzuführen war, ist zu nennen, dass der Anteil avitaler Neurone nach Inkubation in gp120-Überständen vermindert werden konnte, wenn zuvor eine Blockade von CXCR4 und/oder CCR5, den Rezeptoren, an die gp120 bindet, erfolgte.

Bezüglich der Neurotoxizität stellt sich die Frage, ob dieser gp120-Effekt in den Experimenten direkt durch Bindung an neuronale Rezeptoren ausgelöst wurde oder ob dieses Phänomen indirekt durch aktivierte Gliazellen oder Makrophagen vermittelt wurde. Wahrscheinlich handelt es sich um einen direkten gp120-vermittelten Effekt, denn für die Experimente wurden Rattenneuronenkulturen genutzt, deren Reinheit (mittels immunhistochemischer Methoden nachgewiesen) über 98% betrug (Haughey et al., 2001). So wurde versucht, die indirekte gp120-induzierte Neurotoxizität so gering wie möglich zu halten. Dennoch kann bei einem Glia- und Makrophagenanteil von etwa 2% in den Neuronenkulturen der gesehene gp120-induzierte Effekt indirekt vermittelt sein. Der Anteil der Astrozyten an der indirekten Neurotoxizität kann weitgehend ausgeschlossen werden, da die Überstände von gp120-aktivierten Astrozyten keinen morphologisch nachweisbaren, toxischen Einfluss auf Neurone hatten. Dabei wurden die Überstände nach Aktivierung der Astrozyten mit gp120 und nachfolgend mehrmaligem Waschen der Zellen gewonnen. Der Mediumwechsel erfolgte dabei, um gp120 aus den Überständen zu entfernen. Offen bleibt allerdings, ob Astrozyten nur während Präsenz von gp120 toxisch wirkende Mediatoren sezernieren, dieser Effekt nach Entfernen von gp120 aufhört und deshalb die Überstände nach Mediumwechsel nicht neurotoxisch wirkten.

Die Daten der vorgelegten Arbeit sind am Zellkulturmodell erhoben worden. Für das Zellkulturmodell wurden menschliche, aber auch Rattenzellen genutzt. Es kann nicht ohne weiteres auf die beim Menschen in vivo geltenden Verhältnisse geschlossen werden.

Die Experimente wurden mit passagierten Zellen durchgeführt. 8-10 Tage vor den Experimenten wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt, was die Zellen zur Differenzierung anregt. Trotzdem sind kultivierte Zellen oft unreif und damit weniger differenziert als Zellen in vivo. Außerdem wurden embryonale Zellen sowie Zellen

4. Diskussion

neugeborener Tiere untersucht, welche weniger differenziert sind als Zellen des ausgereiften humanen Gehirns.

Trotz dieser Kritikpunkte erlauben diese in vitro Modelle in Bezug auf Induktion von Calciumströmen in Astrozyten und Neurotoxizität von gp120 eine Aussage zu treffen, da in vitro unter reproduzierbaren und kontrollierten Bedingungen gearbeitet werden kann.

4.2. Mechanismen der HIV-Enzephalopathie - Die Calciumdysregulation durch gp120

2001 veranschaulichten Kaul und Mitarbeiter in der Zeitschrift „Nature“ Mechanismen der HIV-Enzephalopathie anhand eines Schemas. Sie zeigten zwei Hauptwege der Neuropathogenese von HIV:

- die direkte Infektion von Makrophagen oder Mikroglia im Gehirn mit HIV-1, welche auf die Infektion mit Sekretion von Cytokinen, Neurotoxinen und viralen Proteinen reagieren und
- die Freisetzung von gp120, welches unter anderem an Makrophagen und Mikroglia binden kann, woraufhin Neurotoxine sezerniert werden

In dieser Arbeit wurde der zweite Weg, die gp120-induzierte Neuropathogenese der HIV-Enzephalopathie, genauer untersucht (s. Abb. 25).

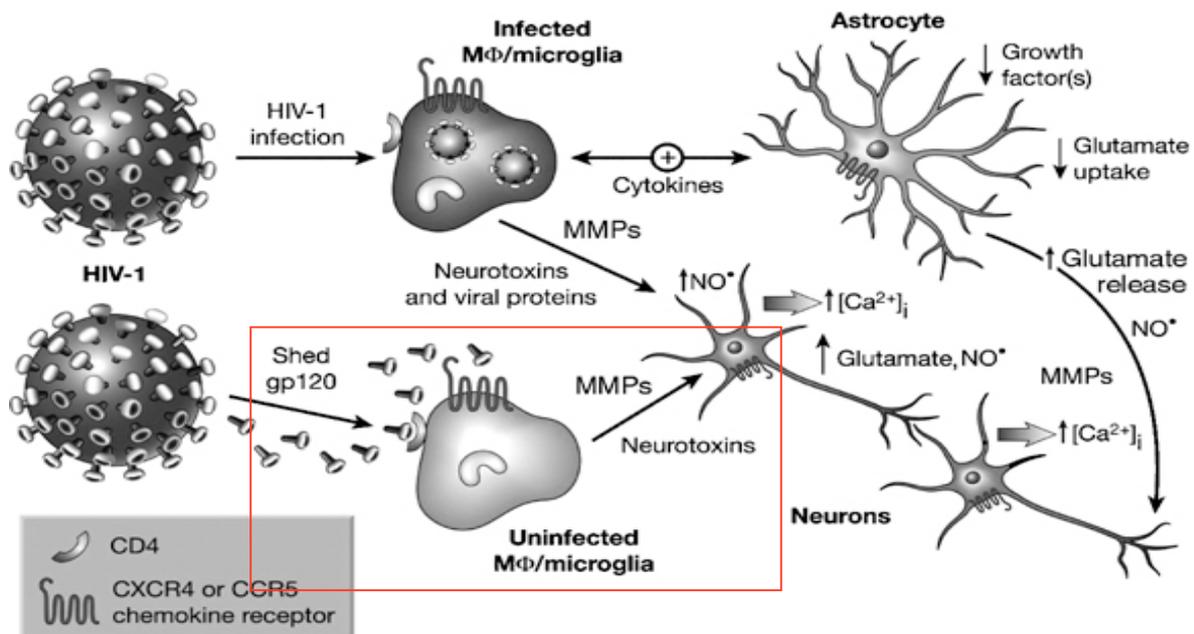


Abbildung 25: Die Neuropathogenese der HIV-Enzephalopathie: zwei ihrer Hauptwege. Das Schaubild verdeutlicht den in dieser Arbeit untersuchten Mechanismus der HIV-induzierten Enzephalopathie über freigesetztes gp120 (Aus: Nature 410, 2001: Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. Kaul, Garden, Lipton)

2002 beschrieben Haughey und Mitarbeiter weitere Mechanismen der HIV-Enzephalopathie und spezialisierten sich dabei auf die Störung der Calciumhomöostase in Astrozyten und Neuronen durch die HIV-Proteine Tat und gp120. In den folgenden Kapiteln wird die gp120-induzierte Calciumdysregulation in

4. Diskussion

Astrozyten behandelt. Das von Haughey und Mitarbeitern entwickelte Schema soll zuvor die Mechanismen der Calciumdysregulation veranschaulichen (s. Abb. 26).

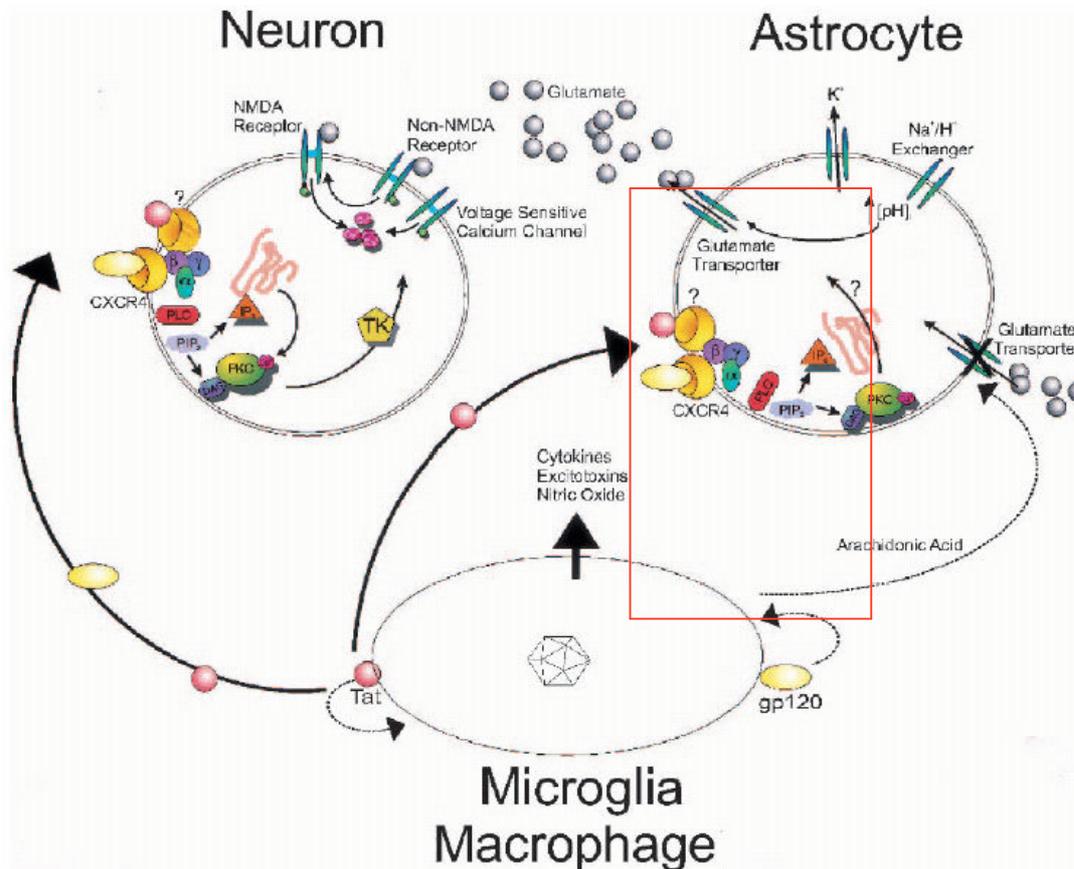


Abbildung 26: Mechanismen der Alterierung der Calciumhomöostase bei der HIV-Enzephalitis in Neuronen und Astrozyten durch gp120 und Tat. Tat und gp120 werden von HIV-1 infizierten Mikroglia freigesetzt. Beide Proteine wirken direkt neurotoxisch - unter anderem durch IP₃-vermittelte Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum in Neuronen. Von Mikroglia freigesetzte Zytokine, Excitotoxine und Stickstoffmonoxid amplifizieren die Effekte von gp120 und Tat auf Astrozyten und Neurone (Aus: JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. 2002.31:55-61. Calcium Dysregulation and Neuronal Apoptosis by the HIV-Proteins Tat und gp120. Haughey N, Mattson MP)

4.2.1. Gp120 verursacht einen Calciumeinstrom in Astrozyten abhängig von dessen Tropismus und N-Glycosylierung: Potentielle Mechanismen dieses Effekts

1994 zeigten Lipton und seine Mitarbeiter, dass die Calciumdysregulation ein zentraler Mechanismus bei der Entstehung der gp120-induzierten Neuronendegeneration ist (Lipton et al., 1994). Da Astrozyten den größten Teil der Hirnpopulation darstellen und sie ebenso wie Neurone Rezeptoren, an die gp120 binden kann, exprimieren, wurde bald der Einfluss von gp120 auf die Calciumhomöostase in Astrozyten untersucht.

2002 analysierten Köller und Kollegen den Einfluss von gp120 auf Astrozyten. Sie zeigten, dass T-tropes gp120 genauso wie SDF-1 α , der natürliche Ligand von CXCR4, einen Calciumeinstrom in Astrozyten verursacht (Meucci et al., 1998; Köller et al., 2002). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Kapitel 3.1.2. und 3.2.1). In der vorgelegten Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass auch M-tropes (991-7A) und dualtropes gp120 ((952/61) und (952/105)) einen Calciumanstieg in Astrozyten auslösen.

Potentielle Signalwege des gp120-induzierten Calciumeinstroms in Astrozyten und Neuronen wurden von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. So konnten Lo et al. 1992 nachweisen, dass der gp120-induzierte Calciumeinstrom in Neuronen unter anderem durch Aktivierung des NMDA-Rezeptors vermittelt wird und konnten den evozierten Calciumstrom durch Blockade der NMDA-Rezeptoren hemmen (Lo et al., 1992). 1999 zeigten Medina und Mitarbeiter, dass der gp120-induzierte Calciumanstieg in Neuronen aus einer Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum resultiert. Die gp120-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern wurde 2002 durch Köller und Mitarbeiter vor dem Hintergrund, dass Astrozyten und Neurone Chemokinrezeptoren exprimieren (Ohtani et al., 1998; Zheng et al., 1999), genauer untersucht. Die Daten von Köller und Mitarbeitern zeigten, dass die durch T-tropes gp120 induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern in Astrozyten und Neuronen mit der Induktion von funktionellem CXCR4 korreliert und dass der gp120-induzierte Calciumeinstrom dem nach direkter CXCR4-Aktivierung durch SDF-1 α gleicht. Ihre Daten sprechen dafür, dass der durch T-tropes gp120 induzierte Calciumeinstrom CXCR4-vermittelt ist. Es ist daher denkbar, dass auch der in dieser Arbeit gesehene,

durch T-, M- und dualtropes gp120 evozierte Calciumanstieg in Astrozyten durch Chemokinrezeptoraktivierung anteilig verursacht ist.

Im Aufbau unterschied sich das dualtrope gp120(952/105) von gp120(952/61) durch das Fehlen der Glycosylierung an Position g17 (s.Kap.2.1.2). Es verursachte einen hochsignifikant geringeren Calciumeinstrom in Astrozyten als das an Stelle g17 glycosylierte gp120(952/61). Polzer zeigte, dass SDF-1 α das glycosylierte dualtrope gp120 NL-952 durch kompetitive Hemmung am CXCR4-Rezeptor blockiert (Polzer, 2002). Fehlte die Glycosylierung an Position g15, verstärkte sich zwar die Affinität des Stammes zu CXCR4, doch das Virus wurde resistent gegenüber SDF-1 α , es konnte durch SDF-1 α nur noch in geringerem Maße antagonisiert werden. Es ist folglich denkbar, dass es durch Änderung der Glycosylierungen innerhalb der V3-Schleife zu Konformationsänderungen von gp120 kommt, die bedingen, dass das Molekül an eine andere Stelle des Rezeptors bindet. Fehlte neben g15 auch die Glycosylierung an Position g17, wurde die Resistenz gegenüber SDF-1 α weiter verstärkt.

In dieser Arbeit wurden zwei dualtrope Stämme verglichen, die sich durch die Glycosylierung an Position g17 unterschieden. Sie zeigten hochsignifikante Unterschiede bezüglich der Induktion von Calciumströmen. Diese Daten unterstützen die These von Polzer, dass der Verlust der Glycosylierung an Position g17 innerhalb dualtroper gp120-Moleküle deren Bindung an den CXCR4-Rezeptor verändert und zeigen dessen funktionelle Konsequenzen. Möglich ist auch, dass durch Verlust der Glycosylierung an g17 die CCR5-Affinität von gp120 abnimmt und deshalb der Calciumeinstrom reduziert wird. Durch Verlust der Glycosylierung an g15 ist eine Abnahme der CCR5-Affinität dualtroper gp120-Isoformen durch Polzer 2002 beschrieben worden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Höhe des gp120-induzierten Calciumstroms nicht nur abhängig ist von N-Glycosylierungen innerhalb der V3-Schleife, sondern auch von dem Tropismus. Gp120(991/7A), R5-trop, und gp120(952/61), dualtrop, induzierten die stärksten Calciumströme.

4.2.2. Gp120 verringert Glutamat- und ATP-induzierte Calciumströme in Astrozyten oder verstärkt diese abhängig von dessen Tropismus

Glutamat ist ein wichtiger Neurotransmitter, der außer zur synaptischen Übertragung auch zur Kommunikation zwischen Astrozyten und Neuronen dient. Dabei reagieren Astrozyten auf neuronale Aktivierung typischerweise mit Calciumsignalen, die durch Blocker für metabotrope Glutamatrezeptoren gehemmt werden können (Porter und McCarthy, 1996). Dani et al. beschrieben 1992 als mögliche Aufgabe der Astrozyten die Kommunikation mit Neuronen. Ihre Daten weisen darauf hin, dass durch Aktivierung von Astrozyten ein lokales Calciumsignal generiert wird, das den Astrozyten die Möglichkeit gibt, Netzwerke von Neuronen zu beeinflussen oder die lokale Aktivität an entfernte Stellen innerhalb des astrozytären Netzwerkes weiterzuleiten. Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben die Mechanismen dieser inter-astrozytären Signalweiterleitung und zeigten dabei die besondere Rolle der ATP-Freisetzung und Aktivierung von purinergen Rezeptoren auf (Fam et al., 2000; Cotrina et al., 1998). Entsprechend gehören Glutamat und ATP zu wichtigen Botenstoffen der Astrozyten, die über Calciumsignale wirken.

In dieser Arbeit wurde die subakute Wirkung von gp120 auf den astrozytären Calciumstoffwechsel untersucht. Köller et al. zeigten 2002, dass T-tropes gp120 die astrozytäre Calciumantwort auf ATP und Glutamat verringert (Köller et al., 2002). Die Mechanismen, die zur Verringerung der astrozytären ATP- und Glutamatantwort nach Inkubation in gp120 führen, sind bisher noch unklar. Köller und Mitarbeiter zeigten, dass eine Interaktion zwischen gp120 und CXCR4 den astrozytären Calciumstoffwechsel beeinflusst, da durch Hemmung von CXCR4 der gesehene Effekt aufgehoben wurde. Zudem bewirkte die Inkubation der Zellen in SDF-1 α , dem natürlichen Liganden von CXCR4, ebenso eine Verringerung der astrozytären Calciumantwort auf Glutamat und ATP. Eine direkte Interaktion zwischen gp120 und Glutamat- oder ATP-Rezeptoren konnte aus mehreren Gründen ausgeschlossen werden:

- Die Glutamatantworten waren in Gegenwart von gp120 ohne vorherige Inkubation nicht verändert
- Neurone, die ebenfalls Glutamat- und ATP-Rezeptoren aufweisen, waren diesbezüglich gegenüber gp120 nicht sensibel (Köller et al., 2002)

Es wird daher davon ausgegangen, dass komplexe intrazelluläre Signalwege durch gp120-Bindung aktiviert werden und den Calciumstoffwechsel von Astrozyten beeinflussen. Es ist zum Beispiel bekannt, dass T-tropes gp120 die PKC aktiviert (Wyss-Coray et al., 1996). Die Aktivierung der PKC kann über komplexe Kaskaden zu einer Dysregulation des zellulären Calciumhaushalts führen (Iwamoto, 1996). Auch das HIV-Protein Tat ist als Aktivator der PKC bekannt. Köller et al. zeigten 2001, dass Tat glutamat-induzierte intrazelluläre Calciumströme in Astrozyten reduziert (Köller et al., 2001). Dieser Effekt konnte durch Antagonisten der PKC gehemmt werden, was den Anteil der PKC an der gesehenen Calciumdysregulation unterstreicht.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit bestätigten den beschriebenen Einfluss, den T-tropes gp120 auf die Glutamat- und ATP-Antwort in Astrozyten nach mehrstündiger Inkubation ausübte. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt auch durch verschiedene T-trope Isoformen verursacht werden kann.

Dualtrope oder M-trope gp120-Isoformen zeigten eine entgegengesetzte Wirkung auf die astrozytäre Calciumantwort auf Glutamat oder ATP. Nach Inkubation der Zellen in Überständen, die R5-tropes gp120 enthielten, fand sich eine stärkere Calciumantwort auf Glutamat und ATP in den Astrozyten als in der Kontrolle (s. Kap. 3.3).

RANTES, der natürliche Ligand am CCR5-Rezeptor, greift unter anderem über Senkung von cAMP und Hemmung der PKA in den Calciumstoffwechsel von Astrozyten ein: der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, der durch die PKA phosphoryliert und damit aktiviert wird, spielt eine wichtige Rolle im astrozytären Calciumstoffwechsel, indem er Calcium nach einem Calciumeinstrom (z.B. nach Aktivierung durch Glutamat oder ATP) aus dem Zytosol pumpt (Golovina et al., 1996; Takuma et al., 1996). Dieser Mechanismus wird durch RANTES gehemmt und die resultierenden Calciumeinströme erscheinen stärker. Zusätzlich werden diese Prozesse durch ein komplexes System aus Proteinkinasen und zellulären sowie subzellulären Calciumsignalen moduliert (Dipolo et al., 1997).

Möglicherweise verstärkt M-tropes gp120 analog zu RANTES durch Bindung an den CCR5-Rezeptor und Induktion intrazellulärer Signalwege die zelluläre Glutamat- und ATP-Antwort. Die Mechanismen, die dazu führen, sind bisher unklar. Die Hemmung der PKA als auch die Modulation durch komplexere intrazelluläre Wege könnten auch hier eine Rolle spielen.

4. Diskussion

Auch bei der Untersuchung der subakuten gp120 Wirkung auf Astrozyten zeigte sich ein Einfluss der N-Glycosylierungen der V3-Schleife. Der Verlust der Glycosylierung an Stelle g17 der dualtropen Isoform führte auch bei diesen Experimenten zu einer starken Abnahme des gp120-Effekts. Die Glutamatantwort unterschied sich nicht mehr von der Kontrolle, die Antwort der Astrozyten auf ATP war etwas geringer als die der Kontrolle. Dieser Effekt könnte analog zu der These Polzers dadurch erklärt werden, dass durch Verlust der N-Glycosylierung an g17 die Affinität des dualtropen gp120 zu CCR5 abnimmt. Die Daten zeigen, dass ein Fehlen der Glycosylierung g17 im gp120 mit einem Wechsel der Proteineigenschaften einhergeht.

4.3. Mechanismen der Neuronendegeneration bei HIV

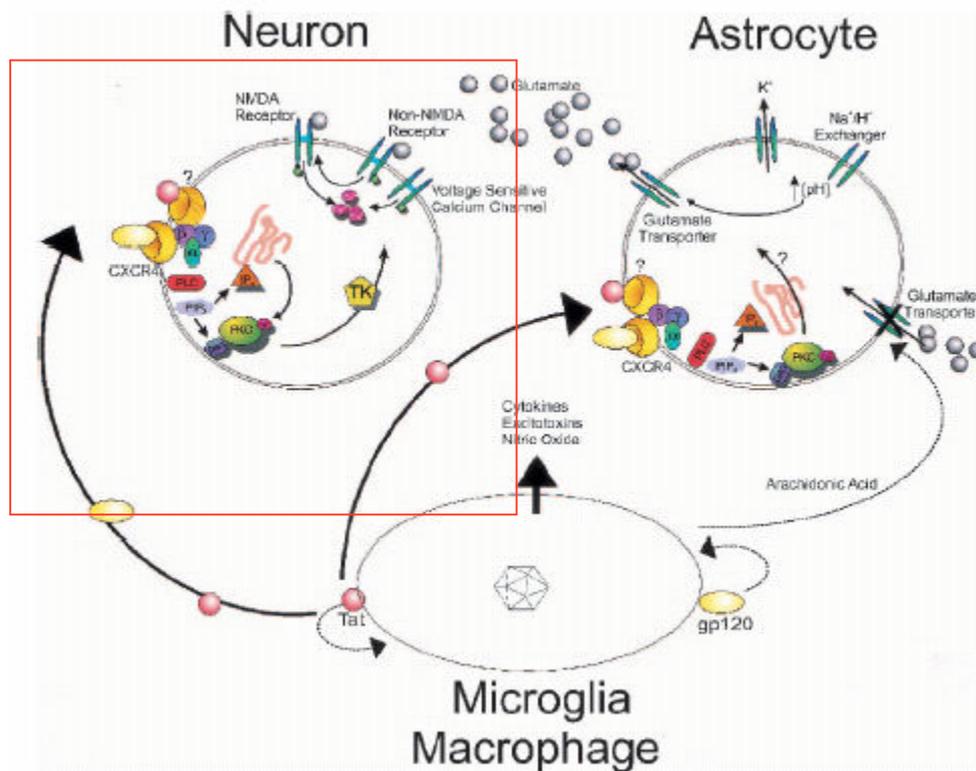


Abbildung 27: Mechanismen der gp120-induzierten Neuronendegeneration. Erläuterungen s. Abb. 26

Obwohl HIV-1 Neurone nicht infizieren kann, kommt es im Rahmen der HIV-Enzephalopathie zu einer Neuronendegeneration. Folglich müssen andere Faktoren als die Infektion dieser Zellen ursächlich an dem Nervenzelluntergang beteiligt sein. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass verschiedene virale Proteine wie Tat, Nef, Vpr und die Env-Proteine gp120 und gp41 Neurone schädigen können. Die Ergebnisse haben zu 2 Theorien geführt, die die HIV-assoziierte

Neuronendegeneration erklären, wobei die eine direkte und die andere indirekte Mechanismen im Sinne eines „bystander effects“ als Ursache der Degeneration nennt. Bisherige Arbeiten unterstützen beide Theorien (Zheng et al., 2001).

Die Theorie der direkten Neurotoxizität besagt, dass virale Proteine wie etwa gp120 durch direkten Kontakt auf Nervenzellen toxisch wirken. Dies konnte durch Apoptoseinduktion nach Inkubation von Neuroblastomzellen und neuronalen Primärkulturen in gp120 gezeigt werden (Meucci et al., 1998; Hesselgesser et al., 1997). Der Einfluss von potentiell sezernierten Zytokinen oder anderen neurotoxischen Stoffen wurden in diesen Arbeiten dadurch kontrolliert, dass die Neuronenkulturen in serumfreiem Medium untersucht wurden. Fontana et al. zeigten 1997, dass gp120 unter anderem an den NMDA-Rezeptor binden kann, wodurch die Zellen apoptotisch werden. Das Virusprotein Vpr gehört durch Bildung eines Kation-durchlässigen Kanals in der Zellmembran zu den direkt nervenschädigenden Proteinen (Piller et al., 1998). Als ebenfalls neurotoxisch gilt das HIV-Protein Tat, das rezeptor-gekoppelt in die Zellen aufgenommen werden und durch Beeinflussung der Transkription zur Exzitotoxizität führen kann (Nath et al., 2000).

Die Bystander-Theorie beschreibt einen HIV-induzierten Nervenzellschaden, der sekundär durch infizierte oder aktivierte Hirnzellen wie Makrophagen oder Gliazellen provoziert wird. Die Zellen sind in ihrer nutritiven oder supportiven Funktion geschädigt oder sezernieren im Zuge der Immunabwehr toxische Faktoren. Zu diesen Faktoren gehören neurotoxische Substanzen wie lösliche Virusproteine, Chemokine sowie pro-inflammatorische Zytokine (wie TNF- α oder Interleukin1- β). Diese führen zu einer Aktivierung nicht-infizierter Zellen (Williams und Hickey, 2002; Gartner, 2000) und zur Migration HIV-spezifischer, aktivierter T-Zellen ins ZNS (Marcondes et al., 2001) und so zur Amplifikation der HIV-induzierten Neurotoxizität. Es kommt zur Sekretion von Neurotoxinen, die auf Neurone exzitotoxisch wirken (Kaul et al., 1999).

Eine weitere Ursache wird in der gestörten Clearancefunktion der Astrozyten gesehen. Astrozyten entfernen Glutamat aus dem synaptischen Spalt und sorgen so für die Beendigung eines exzitatorischen Signals. Als Folge der geschädigten Clearancefunktion wird Glutamat vermindert abgebaut, was auf Neurone exzitotoxisch wirkt und zur Neuronendegeneration führt (Kaul et al., 1999). Aktuelle Arbeiten zeigen einen darüber hinausgehenden Effekt der Astrozyten: 2007 schrieben Vesce und Mitarbeiter, dass Astrozyten Glutamat unter physiologischen

Zuständen kontrolliert freisetzen, im inflammatorischen Milieu dies aber übermäßig erfolgt und so die Exzitotoxizität verstärkt wird.

4.3.1. Vergleich der Neurotoxizität von R5-, X4- und R5X4-tropen gp120-Isoformen

Den ersten Hinweis darauf, dass gp120 eine Rolle bei der Neuronendegeneration durch HIV spielen könnte, gaben Brennemann und Kollegen 1988 als sie demonstrierten, dass picomolare Konzentrationen von gp120 ohne Anwesenheit des Virus *in vitro* neurotoxisch wirkten (Brennemann et al., 1988). Barks et al. konnten dies 1997 auch *in vivo* bestätigen, in dem sie gp120 in Rattenhippocampi injizierten, die dadurch entstandene Neuronendegeneration mit den pathologischen Veränderungen in Gehirnen HIV-Infizierter verglichen und feststellten, dass beide pathologischen Bilder einander entsprachen.

In der vorgelegten Arbeit wurde der neurotoxische Effekt von verschiedenen gp120-Isoformen untersucht (s. Kap. 3.4.2). Es wurde die Toxizität X4-, R5-monotroper und dualtroper gp120 Isoformen, sowie von Varianten, die sich in Glycosylierungen unterschieden, verglichen.

Die Arbeitsgruppe von Ohagen konnte 1999 zeigen, dass in zerebrokortikalen Neuronen sowie in neuronalen Zelllinien picomolare Konzentrationen von T-tropem gp120 CXCR4-vermittelt Apoptose induzieren können. Auch Meucci und Mitarbeiter fanden 2000, dass gp120 durch Bindung an den CXCR4-Rezeptor auf Neuronen Apoptose-induzierend wirkt und konnten durch Blockierung des CXCR4-Rezeptors die Neurotoxizität von gp120 hemmen (Meucci et al., 2000).

Zheng et al. fanden 1999, dass nanomolare Konzentrationen von SDF-1 α/β durch Interaktion mit dem CXCR4-Rezeptor neurotoxisch wirken. In höheren Konzentrationen, konnten Meucci und Kollegen zeigen, schützt SDF-1 α hippocampale Rattenneuronen allerdings vor der durch X4-tropes gp120 induzierten Apoptose.

In einer anderen Arbeit wurde vermutet, dass die CXCR4-vermittelte, gp120 induzierte Apoptose in Neuronen vornehmlich indirekt durch Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia vermittelt wird, während SDF-1 α direkt neurotoxisch wirkt. So konnte das Tripeptid TKP, das die Aktivierung von Makrophagen und Mirkoglia hemmt, die gp120-induzierte Apoptose in Neuronen inhibieren, während es auf die SDF-1 α -induzierte Apoptose keinen Einfluss hatte. In dieser Arbeit wurde

kein präventiver Anteil von SDF-1 α/β an der gp120-induzierten Neuronendegeneration gesehen (Kaul und Lipton, 1999)

In der Arbeitsgruppe von Kaul wurden auch dualtrope und R5-affine HIV-Stämme auf ihre Toxizität untersucht. Dort zeigte sich, dass sowohl R5- und X4-monotrope als auch dualtrope gp120 Isoformen neurotoxisch sind. 2002 fanden Kaul und Mitarbeiter, dass durch Fehlen des CXCR4-Rezeptors auf Neuronen dualtrope und X4-monotrope gp120 Isoformen nicht mehr Apoptose-induzierend wirken und bestätigten damit die Theorie, dass gp120 unter anderem CXCR4-vermittelt neurotoxisch wirkt. Interessanterweise fanden sie, dass dualtropes gp120_{SF2} auf CCR5-defiziente Neuronen im Vergleich zu CXCR4-defizienten oder Wildtyp-Neuronen verstärkt toxisch wirkt. Sie vermuteten deshalb, dass CCR5 in Abhängigkeit von der aktivierenden gp120-Isoform einen neuroprotektiven Einfluss besitzt. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass die β -Chemokine MIP-1 β und RANTES durch Interaktion mit CCR5 Neurone vor der gp120-induzierten Apoptose schützen.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten weisen ebenfalls daraufhin, dass M- und T-trope sowie dualtrope gp120-Varianten neurotoxisch wirken (s. Kap. 3.4.2). Das X4 trope gp120 hatte verglichen mit den dualtrophen und M-tropen Isoformen den stärksten toxischen Effekt. In den Blockierungsexperimenten konnten M- und T-trope sowie dualtrope gp120-Isoformen durch Anti-CXCR4 und Anti-CCR5 funktionell blockiert werden, was eine Interaktion der Moleküle mit CXCR4 und CCR5 bei der Apoptoseinduktion unterstreicht. Allerdings konnte das X4-trope gp120 in stärkerem Ausmaß durch Antikörper blockiert werden als die R5-trope Isoform. Vorstellbar wäre, dass das untersuchte M-trope gp120 auch an andere Rezeptoren binden und Apoptose induzieren kann. Kaul et al. diskutierten den neuroprotektiven Effekt von CCR5 (s.o.). Vielleicht wurde durch Blockierung von CCR5 dieser neuroprotektive Effekt gehemmt und deshalb trotz Blockade von CCR5 ein neurotoxischer Effekt von M-tropem gp120 gesehen? Natürlich ist es auch denkbar, dass in den durchgeführten Experimenten die CCR5-Blockierung nicht ausreichend war und von daher nur ein geringer Effekt gemessen wurde. Dagegen spricht, dass die verwendeten Anti-CCR5 Antikörper in der für die Experimente verwendeten Konzentration in anderen Arbeiten desselben Labors und unter gleichen Bedingungen erfolgreich eingesetzt werden konnten (Melli et al., 2006). Im gleichen experimentellen Ansatz konnte die Toxizität der dualtrophen Proteine durch Anti-CXCR4 und Anti-CCR5 gut blockiert werden, was darauf hindeutet, dass die Toxizität

des dualtropen gp120 besonders CXCR4-vermittelt ist. Diese Daten unterstreichen die 2002 von Kaul und Mitarbeitern aufgestellte These, dass die dualtropen gp120-Isoformen vor allem durch Bindung an CXCR4 toxisch wirken.

Auch zeigten die Daten einen Einfluss der Glycosylierung von gp120 auf seine Pathogenität: Fehlte die Glycosylierung an Position g17, so hatte das dualtrophe gp120 keinen neurotoxischen Effekt.

4.3.2. Gp120-induzierte Chemokinsekretion in Astrozyten

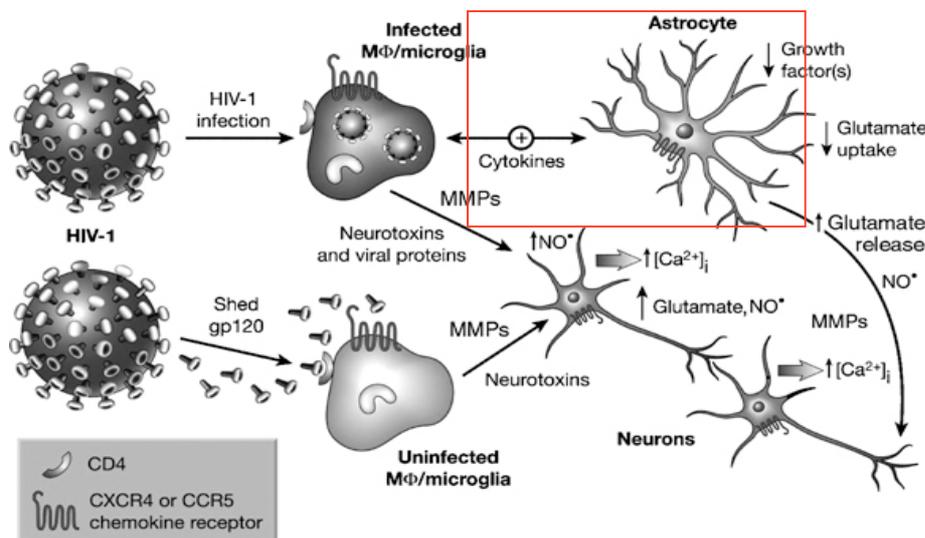


Abbildung 28: Die Rolle der Astrozyten an der gp120-induzierten Apoptose. Erläuterung s. Abb. 25

2000 untersuchten Cota et al. die Rolle von Astrozyten als chemokinsezernierende Zellen in der HIV-Enzephalitis. Sie zeigten, dass HIV-infizierte Astrozyten Chemokinrezeptoren überexprimieren. Außerdem sezernierten HIV-infizierte Astrozyten proinflammatorische Mediatoren wie TNF-alpha und das Chemokin IL-8. Cota et al. vermuteten, dass Astrozyten dadurch im chronisch-infizierten Gehirn zur Entstehung der HIV-Enzephalopathie beitragen. 2003 fanden Rostasy et al., dass in Astrozyten von Patienten mit HIV-Enzephalopathie die SDF1- α -Expression erhöht ist. Peng und Mitarbeiter untersuchten die SDF1- α -Expression in Astrozyten genauer. Sie zeigten 2006, dass die SDF1- α -Expression in Astrozyten über IL-1 β durch HIV-1 infizierte oder aktivierte Makrophagen reguliert wird. Damit bestätigen sie Kaul und Lipton, die schon 1999 die parakrine Kommunikation zwischen infizierten Makrophagen und Astrozyten beschrieben und damit eine Möglichkeit zur Amplifikation des inflammatorischen Signals nannten.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Astrozyten, die in gp120 inkubierten, Faktoren sezernieren, die neurotoxisch wirken. Es wurden M-trope, T-trope und dualtrope Isoformen genutzt, um die Astrozyten zu aktivieren. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen konnte für keine gp120-Isoform ein Effekt auf Astrozyten nachgewiesen werden, Faktoren zu sezernieren, die morphologisch-nachweisbar neurotoxisch sind. Die Ergebnisse unterstützen Galey et al., die 2003 zeigten, dass die HIV-Infektion die Chemokintranskription in Astrozyten verändert, eine Aktivierung der Astrozyten mit X4-tropem gp120 aber ohne Effekt auf die Chemokintranskription bleibt.

4.4. Die gp120-induzierte Apoptose in Astrozyten

Viele Arbeitsgruppen haben die gp120-induzierte Apoptose in Neuronen untersucht. Über die gp120-induzierte Apoptose in Astrozyten gibt es bisher wenig Literatur. 2000 verglichen Aquaro et al. die Toxizität des HIV-Oberflächenproteins gp120 und des nukleären HIV-Regulationsproteins Tat. Während Tat 10% Apoptose in Astrozyten induziert, blieb gp120 diesbezüglich ineffektiv. 2007 untersuchten Saha et al. die gp120-induzierte Apoptose in Astrozyten und Neuronen genauer: Während gp120 einen großen oxidativen Stress auf Neuronen ausübte, zeigte es keine Wirkung auf Astrozyten. Die Ursache wird in einem höheren Antioxidations-Level in Astrozyten gesehen. Darüberhinaus stieg in Astrozyten, die mit gp120 behandelt wurden, die intrazelluläre Antioxidantienkonzentration an.

Die Daten zeigten ebenfalls, dass keine der untersuchten gp120-Isoformen eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Apoptose in Astrozyten induziert. Gp120 bindet über die Chemokinrezeptoren an Astrozyten und beeinflusst den Stoffwechsel von Astrozyten, scheint aber bezüglich Apoptoseinduktion ineffektiv zu sein.

5. Literaturverzeichnis

Aquaro S, Panti S, Caroleo MC, Balestra E, Cenci A, Forbici F, Ippolito G, Mastino A, Testi R, Mollace V, Caliò R, Perno CF. Primary macrophages infected by human immunodeficiency virus trigger CD95-mediated apoptosis of uninfected astrocytes. *J. Leukoc. Biol.*; 2000; 68(3):429-35.

Arendt G, Hefter H, Buescher L, Hilperath F, Elsing C, Freund HJ. Improvement of motor performance of HIV-positive Patients under AZT therapy. *Neurology*; 1992; 42: 891-895

Arendt G, Hefter H, Elsing C, Strohmeyer G, Freund HJ. Motor dysfunction in HIV-infected patients without detectable central-nervous deficit. *J Neurol.*; 1990; 237:362-368

Arendt G, Hefter H, Elsing C, Neuen-Jacob E, Strohmeyer G, Freund H. Neue elektrophysiologische Befunde zur Häufigkeit der Gehirnbeteiligung bei klinisch-neurologisch asymptomatischen Patienten. *EEG-EMG*; 1989; 20:280-287

Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*; 1992; 307: 97-101

Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*; 1998; 392: 565-568

Barks JDE, Liu X-H, Sun-R, Silverstein FS. Gp120, a human immunodeficiency virus-1 coat protein, augments excitotoxic hippocampal injury in perinatal rats. *Neuroscience*; 1997; 76:397-409

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-Lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*; 1983 May 20; 220(4599): 868-871

Berger T, Schnitzer J, Kettenmann H. Developmental changes in the membrane current pattern, K⁺ buffer capacity, and morphology of glial cells in the corpus callosum slice. *J. Neurosci.*; 1991; 11:2008-30024

Berger T, Walz W, Schnitzler J, Kettenmann H. GABA and glutamate activated currents in glial cells of the mouse corpus callosum slice. *Journal of Neuroscience Research*; 1992; 31:21-27

Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clerq E, Volterra A. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat. Neuroscience*; 2001; 4:702-710

Bezzi P, Volterra A. A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr. Opin. Neurobiol.*; 2001; 11:387-394

- Björndal A, Denkg H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, Albert J, Scarlatti G, Littman DR, Fenyo EM.** Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol.*; 1997; 71:7478-87
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA.** The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and block HIV-1 entry. *Nature*; 1996; Aug. 29;382(6594):829-33
- Brenneman DE, Gozes I.** A femtomolar-acting neuroprotective peptide. *J Clin. Invest.*; 1996; 97 (10): 2299-2307
- Brennemann DE, Westbrook GL, Fitzgerald SP, Ennist DL, Elkins KL, Ruff MR, Pert CB.** Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide. *Nature (Lond)*; 1988; 335:639-642
- Buzy J, Brennemann DE, Pert CB, Martin A, Salazar A, Ruff MR.** Potent gp120-like neurotoxic activity in the cerebrospinal fluid of HIV-infected individuals is blocked by peptide T. *Brain Res.*; 1992; 11;598(1-2):10-8
- Carrow EW, Vujcic LK, Glass WL, Seamon KB, Rastogi SC, Hendry RM, Boulos R, Nzila N, Quinnan GV Jr.** High prevalence of antibodies to gp120 V3 region principal neutralizing determinant of HIV-1 MN in sera from Africa and the Americas. *Aids Res. Hum. Retroviruses*; 1991; 7: 831-838
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC.** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*; 1994 Feb. 11;263(5148)802-5
- Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, Levy JA.** Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science*; 1988; 240: 80-82
- Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J.** The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*; 1996; 85: 1135-1148
- Ciardo A, Meldolesi J.** Effects of the HIV-1 Envelope Glycoprotein gp120 in Cerebellar Cultures. [Ca²⁺]I Increases in a Glial Cell Subpopulation. *Europ. Journ. Neurosci.*; 1993; (5) 12:1711
- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira O.** Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*; 1986 July 18; 233(4761): 343-346
- Clifford DB.** Human immunodeficiency virus-associated dementia. *Arch. Neurol.*; 2000; 57: 321-324
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P.** The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med.*; 1996; 2:1244-7

Conant K et al. Cerebrospinal fluid levels of MMP-2,7 and 9 are elevated in association with human immunodeficiency virus dementia. *Ann Neurol.*; 1999; 46: 391-398

Connor RI, Ho DD. Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J Virol.*; 1994; 68: 4400-4408

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*; 1990; 247: 470-473

Cota M, Kleinschmidt A, Ceccherini-Silberstein F, Alois I F, Mengozzi M, Mantovani A, Brack-Werner R, Poli G. Upregulated expression of interleukin-8, Rantes and chemokine receptors in human astrocytic cells infected with HIV-1. *J. Leukoc. Biol.*; 2000; 68(3):429-35

Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1998; 95(26):15735-15740

Cotrina ML, Lin JH, Nedergaard M. Cytoskeletal assembly and ATP release regulate astrocytic calcium signaling. *J Neurosci.*; 1998; 18(21):8794-8804

Dani JW, Chernjasky A, Smith SJ. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocytes networks.. *Neuron*; 1992; 8(3):429-440

De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol.*; 1992; 66:6777-80

DiPolo R, Berberian G, Delgado D, Rojas H, Beauge L. A novel 13 kDa cytoplasmic soluble protein is required for the nucleotide (MgATP) modulation of the Na/Ca exchange in squid nerve fibers. *FEBS Lett.*; 1997 Jan 13; 401(1):6-10.

Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven transmembrane segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.*; 1991; 60: 653-688

Doranz BJ, Rucker J, Yi , Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Colman RG, Doms RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3 and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*; 1996; 85: 1149-1158

Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms R. A dual-tropic primary HIV-isolate that uses Fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3 and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell Press*; 1996; 85: 1149-1158

Dore GJ, Correll PK, Li Y, Kaldor J M, Cooper DA, Brew BJ. Changes to AIDS dementia complex in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*; 1999; 13: 1245-1253

Dore GJ, Hoy JF, Mallal SA, Li Y, Mijch AM, French MA, Cooper DA, Kaldor JM. Trends in incidence of AIDS illnesses in Australia from 1983 to 1994: the Australian AIDS cohort. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*; 1997; 16:39-43

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. Hiv-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*; 1996; 381:667-673

Dreyer E B, Kaiser P K, Offermann J T, Lipton S A. HIV-1 coat protein neurotoxicity prevented by calcium channel antagonists. *Science*; 1990; 248:364-367

Edinger AL, Blanpain C, Kunstman KJ, Qolinsky SM, Parmentier M, Doms RW. Functional dissection of CCR5 coreceptor function through the use of CD4-independent simian immunodeficiency virus strains. *J Virol.*; 1999; 73: 62-73

Ellis RJ, Deutsch R, Heaton RK, Marcotte TD, McCutchan JA, Nelson JA, Abramson I, Thai LJ, Atkinson JH, Wallace MR, Grant I. Neurocognitive impairment is an independent risk factor for death in HIV infection. San Diego HIV Neurobehavioral Research Center Group. *Arch. Neurol.*; 1997; 54: 416-424

Enkvist MOK, McCarthy KD. Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K⁺ concentration. *J Neurochem.*; 1994; 62: 489

Enting RH, Hoetelmans RM, Lange JM, Burger DM, Beijnen JH, Portegies P. Antiretroviral drugs and the central nervous system. *AIDS*; 1998; 12: 1941-1955

Fam SR, Gallagher CJ, Salter MW. PsY(1) purinoceptor-mediated Ca(2+) signaling and Ca(2+) wave propagation in dorsal spinal cord astrocytes. *J. Neurosci.*; 2000; 20(8):2800-2808

Federspiel B, Melhado IG, Duncan AM, Delaney A, Schappert K, Clark-Lewis I, Jirik FR. Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics*; 1993; 16:707-712

Ferrando S, van Gorp W, McElhiney M, Goggin K, Sewell M, Rabkin J. Highly active antiretroviral treatment in HIV infection: benefits for neuropsychological function. *AIDS*; 1998; 12: F65-F70

Fine SM, Angel RA, Perry SW, Epstein LG, Rothstein JD, Dewhurst S, Gelbard HA. Tumor Necrosis Factor α inhibits Glutamate uptake by primary human Astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. *J Biol. Chem.*; 1996 April 25; 271 (26): 15303-15306

Fontana G, Valenti L, Raiteri M. Gp120 can revert antagonism at the glycine site of NMDA receptors mediating GABA release from cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*; 1997; 49:732-738

Galey D, Becker K, Haughey N, Kalehua A, Taub D, Woodward J, Mattson MP, Nath A. Differential transcriptional regulation by human immunodeficiency virus type 1 and gp120 in human astrocytes. *Neurovirol.*; 2003; 9(3):358-71

Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M. Isolation of human T-cell-leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*; 1983 May 20; 220(4599): 865-867

Garden GA, GUO W, Jayadev S, Tun C, Balcaitis S, Choi J, Montine TJ, Möller T, Morrison RS. Hiv associated neurodegeneration requires p53 in neurons and microglia. *The FASEB Journal*; 2004; 18:1141-1143

Gartner S, Popovic M. Macrophage tropism of HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*; 1990; 6 (8): 1017-1021

Gartner S. HIV-infection and dementia. *Science*; 2000; 287: 602-604

Ghatan S, Lerner S, Kinoshita Y, Hetman M, Patel L, Xia Z, Youle RJ, Morrison RS. P38 MAP kinase mediates bax translocation in nitricoxide-induced apoptosis in neurons. *J Cell Biol.*; 2000; 150:335-347

Giaume C, Venance L. Intracellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia*; 1998; 24:50-64

Giulian D, Vaca K, Noonan CA. Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science*; 1990; 250: 1593-1596

Giulian D, Wendt E, Vaca K, Noonan CA. The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 stimulates release of neurotoxins from monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1993; 90: 2769-2773

Glushakova S, Baibakov B, Margolis LB, Zimmerberg J. Experimental HIC infection of human lymphoid tissue: correlation of CD4+T cell depletion and virus syncytium-inducing/non-syncytium-inducing phenotype in histoculture inoculated with laboratory strains and patient isolates of HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*; 1997; 13:461-471

Golovina VA, Mambrick LL, Yarowski PJ, Krueger BK, Blaustein MP. Modulation of two functionally distinct Ca²⁺ stores in astrocytes: role of plasmalemmal Na/Ca exchanger. *Glia*; 1996; 16(4):296-305

Gorry PR., Bristol G, Zack JA, Ritola K, Swanstrom R, Birch CJ, Bell JE, Bannert N, Crawford K, Wang H, Schols D, De Clercq E, Kunstman K, Wolinsky SM, Gabuzda D. Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 isolates from brain and lymphoid tissues predicts neurotropism independent of coreceptor specificity. *Journal of Virology*; 2001; 75, 10073-10089.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.*; 1985; 260:3440-3450.

Haughey NJ, Nath A, Mattson MP, Slevin JT, Geiger JD. HIV-1 Tat through phosphorylation of NMDA receptors potentiates glutamate excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*; 2001; 78: 457-467.

Haydon PG. Glia: listening and talking to the synapse. *Nat Reviews Neurosci.*; 2001; 2:185-193

Hesselgesser J, Horuk Richard. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J. NeuroVir.*; 1999; 5: 13-26

Hesselgesser J, Taub D, Baskar P, Hoxie J, Kolson DL, Horuk R. Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 α is mediated by the chemokine receptor CXCR4. *Curr. Biol.*; 1998; 8:595-598

Iwamoto T, Pan Y, Wakabayashi S, Imaqawa T, Yamanaka HI, Shigekawa M. Phosphorylation dependent regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger via protein kinase C. *J Biol Chem.*; 1996; 271(23):13609-13615

Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci.*; 1998; 1: 683-692

Kaul M, Garden GA, Lipton SA. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*; 2001; 410:988-994

Kaul M, Lipton SA. Chemokines and activated macrophages in HIV-induced neuronal apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 1999; 96:8212-8216

Kaul M, Zheng J, Okamoto S, Gendelman HE, Lipton SA. HIV-1 infection and AIDS: consequences for the central nervous system. *Cell death and differentiation*; 2005 April 15; 12: 878-892

Klein RS, Williams KC, Alvarez-Hernandez X, Westnoreland S, Force T, Lackner AA, Luster AD. Chemokine Receptor Expression and Signaling in Macaque and Human Fetal Neurons and Astrocytes: Implication for the Neuropathogenesis of AIDS. *The Journal of Immunology*; 1999; 163: 1636-1646

Köller H, Schaal H, Freund M, Garrido SR, von Giesen HJ, Ott M, Rosenbaum C, Arendt G. HIV-1 protein Tat reduces the glutamate-induced intracellular Ca²⁺ increase in cultured cortical astrocytes. *Eur. J. Neurosci.*; 2001; 14(11):1793-1799

Köller H, Schaal H, Rosenbaum C, Czardybon M, von Giesen HJ, Müller HW, Arendt G. Functional CXCR4 receptor development parallels sensitivity to HIV-1 gp120 in cultured rat astroglial cells but not in cultured rat cortical neurons. *J Neurovirol.*; 2002; 8(5):411-9

Lannuzel A, Lledo PM, Lamghitnia HO, Vincent JD, Tardieu M. HIV-1 envelope proteins gp120 and gp160 potentiate NMDA-induced [Ca²⁺]_i increase, alter [Ca²⁺]_i homeostasis and induce neurotoxicity in human embryonic neurons. *Eur J Neurosci.*; 1995 Nov 1; 7(11): 2285-1193

Lavi E, Strizki JM, Ulrich AM, Zhang W, Fu L, Wang Q, O'Connor M, Hoxie JA, Gonzalez-Scarano F. CXCR-4 (Fusin), a co-receptor for the type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1), is expressed in the human brain and a variety of cell types, including microglia and neurons. *Am. J. Pathol.*; 1997; 151: 1035-1042

- Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ.** Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovarian cells. *J Biol Chem.*; 1990; 265: 10373-10382
- Levin S.** Commentary: implementation of the STP recommendations on the nomenclature of cell death. Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol.*; 1999; 27(4):491. No abstract available.
- Lipton SA, Sucher NJ, Kaiser PK, Dreyer EB.** Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Neuron*; 1991; 7: 111-118
- Lipton SA.** AIDS-related dementia and calcium homeostasis. *Ann NY Acad. Sci.*; 1994; 747:205-224
- Lipton SA.** Treating AIDS dementia [letter; comment]. *Science*; 1997; 276: 1629-1630
- Liu Y, Tang XP, McArthur JC, Scott J, Gartner S.** Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gp160 sequences from a patient with HIV dementia: evidence for monocyte trafficking to the brain. *J NeuroVirol.*; 2000; 6: S70-S81
- Lo TM, Fallert CJ, Piser TM, Thayer SA.** HIV-1 envelope protein evokes intracellular calcium oscillations in rat hippocampal neurons. *Brain Res.*; 1992; 594(2):189-196
- Luster AD.** Chemokines chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl. J. Med.*; 1998; 338: 436-445
- Majno G, Joris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.*; 1995; 146(1):3-15
- Major EO, Rausch D, Marra C, Clifford D.** HIV-associated dementia. *Science*; 2000; 288: 440-442
- Manji H, Conolly S, McAllister R et al.** Serial MRI of the brain in asymptomatic patients infected with HIV: results from the UCMSM/Medical Research Council neurology cohort. *J Neurol., Neurosurg., Psychiatry*; 1994; 57:144-149
- Marcondes MC et al.** Highly activated CD8⁺ T cells in the brain correlate with early central nervous system dysfunction in simian immunodeficiency virus infection. *J Immunol.*; 2001; 167:5429-5438
- Maruyama I, Hasegawa T, Yamamoto T, Momose K.** Effects of Pluronic F-127 on loading of fura 2/AM into single smooth muscle cells isolated from guinea pig taenia coli. *J. Toxicol. Sci.*; 1989; 14:153-163
- Mayne M, Holden CP, Nath A, Geiger ID.** Release of calcium from inositol 1,4,5-triphosphate receptor-regulated stores by HIV-1 Tat regulates TNF- α production in human macrophages. *J Immunol.*; 2000; 164: 6538-6542

Medina I, Ghose S, Ben-Ari Y. Mobilization of intracellular calcium stores participates in the rise of $[Ca^{2+}]_i$ and the toxic actions of the HIV coat protein GP120. *Europ. J. Neurosci.*; 1999; 11 (4):1167-1178

Melli G, Keswani SC, Fischer A, Chen W, Höke A. Spatially distinct and functionally independent mechanisms of axonal degeneration in a model of HIV-associated sensory neuropathy. *Brain*; 2006; 129(5):1330-1338

Mennicken F, Maki R, de Souza EB, Quirion R. Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol. Sci.*; 1999; 20:73-78

Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Bushell TJ, Gray PW, Miller RJ. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1998; 95: 14500-14505

Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Miller RJ. Expression of CXCR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 2000; 97:8075-8080

Meucci O, Miller RJ. Gp120-induced neurotoxicity in hippocampal pyramidal neuronal cultures: protective action of TGF- β 1. *J Neurosci.*; 1996; (16) 13:4080-4088

Moore JP, Sodroski J. Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. *J Virol.*; 1996; 70: 1863-1872

Murphy P, Baggiolini M, Charo I, Hebert C, Horuk R, Matsushima K, Miller L, Oppenheim J, Power CA. International union of pharmacology. XXII. nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.*; 2000; 52(1): 145-76

Muyderman H, Nilsson M, Blomstrand F, Khatibi S, Olsson T, Hansson E, Ronnback L. Modulation of mechanically induced calcium waves in hippocampal astroglial cells. Inhibitory effects of alpha 1-adrenergic stimulation. *Brain Res.*; 1998; 793 (1-2): 127-135

Nath A, Geiger JD. Neurobiological aspects of HIV infections: neurotoxic mechanisms. *Prog Neurobiol.*; 1998; 54:19-33

Nath A, Haughey NJ, Jones M, Anderson C, Bell JE, Geiger JD. Synergistic neurotoxicity by human immunodeficiency virus proteins Tat and gp120: protection by memantine. *Ann. Neurol.*; 2000; 47:186-194

Nath A. Human Immunodeficiency Virus (HIV) Proteins in Neuropathogenesis of HIV dementia. *Journ. Inf. Dis.*; 2002; 186(Suppl2):S193-8

Nath A. Pathobiology of human immunodeficiency virus dementia. *Semin. Neurolo.*; 1999; 19:113-127

Navia BA, Cho E-S, Petit CK; et al. The AIDS dementia complex: II. Neuropathology. *Ann Neurol.*; 1986; 19: 525-535

Navia BA, Jordan BD, Price RW. The AIDS Dementia Complex: I. Clinical features. *Ann Neurol.*; 1986; 19:517-524

Nicotera P, Ankarcrona M, Bonfoco E, Orrenius S, Lipton SA. Neuronal necrosis and apoptosis: two distinct events induced by exposure to glutamate and oxidative stress. *Adv. Neurol.*; 1997; 72:95-101

Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line adapted HIV-1. *Nature*; 1996 Aug. 29;382(6594):833-5. Erratum in *Nature* 1996 Nov. 21;384(6606):288

Ohagen A, Ghosh S, He J, Huang K, Chen Y, Yuan M, Osathanondh R, Gartner S, Shi B, Shaw G, Gabuzda D. Apoptosis induced by virus type 1 isolates: evidence for a role of the envelope. *J Virol.*;1999; 73:897-906.

Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bi-directional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci.*; 1997; 17:7817-7830

Patton HK, Zhou ZH, Bubien JK, Benveniste EN, Benos DJ. Gp120-induced alterations of human astrocyte function: Na(+)/H(+) exchange, K(+) conductance and glutamate flux. *Am J Physiol Cell Physiol*; 2000; 279:C700-8

Peng H, Erdmann N, Whitney N, Dou H, Gorantla S, Gendelman HE, Ghorpade A, Zheng J. HIV-1 infected and/or immune activated macrophages regulate astrocyte SDF-1 production through IL-1 beta. *Glia*; 2006; 54 (6):619-629

Persidsky Y, Buttini M, Limoge J, Bock P, Gendelman HE. An analysis of HIV-1 associated inflammatory products in brain tissue of humans and SCID mice with HIV-1 encephalitis. *J Neurovirol.*; 1997; 3: 401-416

Piller SC, Jans P, Gage PW, Jans DA. Extracellular HIV-1 virus protein Vpr causes a large inward current and cell death in cultured hippocampal neurons: implications for AIDS pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 1998; 95:4595-4600

Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H, Meyer B, Müller H, Krausslich HG, Schreiber M. Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology*; 2001; 11: 11-19

Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H, Schreiber M. The N-linked Glycan g15 within the V3 Loop of the HIV-1 External Glycoprotein gp120 Affects Coreceptor Usage, Cellular Tropism, and Neutralization. *Virology*; 2002; Art. 1760 published online

Polzer S. Bedeutung von N-Glykanen im V3-Bereich des HIV- Hüllproteins gp120 für die Korezeptornutzung und Neutralisierbarkeit von HIV-1. 2002; Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

- Porter JT, McCarthy KD.** Hippocampal astrocytes in situ respnd to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci.*; 1996; 16(16):5073-5081
- Powderly WG.** Current approaches to treatment for HIV-1 infection. *J NeuroVirol.*; 2000; 6 (supplement 1): S8-S13
- Price RW, Brew BJ.** The AIDS dementia complex. *J Infect. Dis.*; 1988; 158:1079-1083
- Price RW, Navia BA, Cho ES.** Aids Encephalopathy. *Neurol Clin.*; 1986; 4(1)
- Reed CJ.** Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death. *Semin. Hematol.*; 2000; 37(4 Suppl 7):9-16. Review.
- Rosci MA, Pigorini F, Bernabei A, Pan FM, Merigliano DE, Meligrana MF.** Methods for detecting early signs of AIDS dementia complex in asymptomatic HIV-1 infected subjects. *AIDS.*; 1992; 6(11): 1309-1316
- Rostasy K, Egles C, Chauhan A, Kneissl M, Bahrani P, Yiannoutsos C, Hunter DD, Nath A, Hedree JC, Navia BA.** SDF-1 alpha is expressed in astrocytes and neurons in the AIDS dementia complex: an in vivo and in vitro study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 2003; 62(6):617-626
- Rottmann JB, Ganley KP, Williams K, Wu LJ, Mackay CR, Ringler DJ.** Cellular localization of the chemokine receptor CCR5- Correlation to cellular targets of HIV-1 infection. *Am. J. Pathol.*: 1997; 151: 1341- 1351
- Ruff M, O'Neill B, Barbour J, Mayer K, Moon M, Huyett J, Heseltine P, Bridge P, Pert CB, Jaffe H.** A pathogenic fragment of gp120 concentrated in HIV plasma and CSF. *Int. Conf. AIDS.* :1990; 20-23; 6:350
- Ryzhova E et al.** Simian immunodeficiency virus encephalitis: analysis of envelope sequences from individual brain multinucleated giant cells and tissue samples. *Virology*; 2002; 297:57-67
- Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, Kleeberger C, Selnes OA, Miller EN, Becker JT, Cohen B, McArthur JC.** HIV-associated neurologic disease incidence changes: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998. *Neurology*; 2001; 56: 257-260
- Saha RN, Pahan K.** Differential regulation of Mn-superoxide dismutase in neurons and astroglia by HIV-1 gp120: Implications for HIV-associated dementia. *Free Radic. Biol. Med.*; 2007; 42(12):1866-1878
- Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M.** Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry*; 1996; 35:3362-3367
- Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, Fredriksson R, Colognesi C, Deng HK, Malnati MS, Plebani A, Siccardi AG, Littman DR, Fenyo EM, Lusso P.** In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat. Med.*; 1997; 3: 1259-1265

Schall T. The Chemokines- In: The Cytokine Handbook. Thompson A. Academic Press: San Diego; 1994; pp 419-460

Sharer LR. Pathology of HIV-1 Infection of the Central Nervous System. A review. J. Neuropathol. Exp. Neurol.; 1992, 1(1): 3-11

Simpson DM, Berger JR. Neurologic manifestation of the HIV infection. Med. Clin. North Am.; 1996 Nov; 80 (6):1363-1394

Stichel CC, Müller HW. Expression of inherent neuronal shape characteristics after transient sensitivity to epigenic factors. Brain Res. Dev. Brain Res.; 1992; 68(2):149-62

Takahashi A, Lechleiter JD, Herman B. Measurement of Intracellular Calcium. Physiol. Rev.; 1999; 79: 1089-1125

Takuma K, Matsuda T, Hashimoto H, Kitanaka J, Asano S, Kishida Y, Baba A. Role of Na(+)-Ca²⁺ exchanger in agonist-induced Ca²⁺ signaling in cultured rat astrocytes. J Neurochem.; 1996; 67(5):1840-1845

Tanabe S, Heesen M, Yoshizawa I, Berman MA, Luo Y, Bleul CC, Springer TA, Okuda K, Gerard N, Dorf ME. Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes. J Immunol.; 1997; 159: 905-911

Tersmette M, de Goede RE, Al BJ, Winkel IN, Gruter RA, Cuypers HT, Huisman HG, Miedema F. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. J Virol.; 1988; 62:2026-2032

Tersmette M, Gruter RA, de Wolf F, de Goede RE, Lange JM, Schellekens PT, Goudsmit J, Huisman HG, Miedema F. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. J Virol.; 1989; 63:2118-2125

Thordsen I. Bedeutung der N-Glycosylierung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 für die Infektion mit Humanem Immundefizienzvirus-1. 2002; Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hamburg

Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of synapse number by Glia. Science; 2001; 291(5504): 657-661

Vazeux R. AIDS Enzephalopathy and Tropism of HIV for Brain Monocytes/Macrophages and Microglial Cells. Pathobiology; 1991; 59:214-218

Venance L, Cordier J, Monge M, Glowinski J, Giaume C. Homotypic and heterotypic coupling mediated by gap junctions during glial cell differentiation in vitro. Eur. J Neurosci.; 1995; 7: 451

- Vesce S, Rossi D, Mrambilla L, Volterra A.** Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int. Rev. Neurobiol.*; 2007; 82:57-71. Review
- Walz W, Gimpl G, Ohlemeyer C, Kettenmann H.** Extracellular ATP-induced currents in astrocytes: involvement of cation channel. *J Neurosci. Res.*; 1994; 38: 12-18
- Walz W.** Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem. Int.*; 2000; 36: 291-300
- Williams KC, Hickey WF.** Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS. *Ann Rev Neurosci.*; 2002; 25:537-562
- Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG.** The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*; 1998; 393: 705-711
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR.** Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*; 1980; (68):251-306
- Wyss-Coray T, Masliah E, Toggas SM, Rockenstein EM, Brooker MJ, Lee HS, Mucke L.** Dysregulation of signal transduction pathways as a potential mechanism of nervous system alterations in HIV-1 gp120 transgenic mice and humans with HIV-1 encephalitis. *J Clin. Invest.*; 1996; 97(3):789-798
- Xu Y, Kulkosky J, Acheampong E, Nunnari G, Sullivan J, Pomerantz RJ.** HIV-1-mediated apoptosis of neuronal cells: Proximal molecular mechanisms of HIV-1 induced Encephalopathy. *PNAS*; 2004; published online April 21
- Zheng J, Thylin MR, Ghorpade A, Xiong H, Persidsky Y, Cotter R, Niemann D, CHE M, Zheng YC, Gelbard HA, Shepard RB, Swartz JM, Gendelman HE.** Intracellular CXCR4 signaling, neuronal apoptosis and neuropathogenic mechanisms of HIV-1 associated dementia. *J Neuroimmunol.*; 1999; 98:185-200
- Zheng J, Thylin MR, Persidsky Y, Williams CE, Cotter RL, Zink W, Ryan L, Ghorpade A, Lewis K, Gendelman HE.** HIV-1 infected immune competent mononuclear phagocytes influence the pathways to neuronal demise. *Neurotox. Res.*; 2001; 3:461-484
- Zwart G, Langedijk H, De Jong Jj, Wolfs TF, Ramautarsing C, Bakker M, De Ronde A, Goudsmit J.** Immunodominance and antigenic variation of the principal neutralization domain of HIV-1. *Virology*; 1991; 181: 481-489

6. Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immuno deficiency syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCR5	CC-Chemokinrezeptor 5
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
cm	Zentimeter
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor 4
DMEM	<i>Dulbecco´s modified Eagle´s medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EAAS	<i>excitatory amino acids</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
G	Gauge
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp41	Glycoprotein 41
gp120	Glycoprotein 120
gp160	Glycoprotein 160
h	Stunde
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HAD	HIV-assoziierte Demenz
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus-1</i>
HIV-2	<i>human immunodeficiency virus-2</i>
HIVE	HIV-Encephalopathie
IL	Interleukin
l	Liter

6. Abkürzungen

mg	Milligramm
Min	Minute
MIP-1 α , β	<i>macrophage inflammatory protein 1α, β</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
NO	<i>nitric oxide</i>
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PKA	Proteinkinase vom Typ A
PKC	Proteinkinase C
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RU	<i>ratio unit</i>
SDF-1 α , β	<i>stromal derived factor 1α,β</i>
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TB	Trypanblau
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer der Arbeit, Herrn Prof. Dr. Hubertus Köller, der mir das interessante Promotionsthema zur Verfügung stellte und bei Fragen mit wertvollen Ratschlägen und Anregungen immer ein Ansprechpartner war. Er war eine sehr wertvolle Unterstützung bei der Vorbereitung auf das Stipendium in Baltimore.

Auch möchte ich Frau Prof. Dr. Arendt danken, die den Kontakt mit der Johns Hopkins University in Baltimore herstellte und es mir ermöglichte, einen Teil meiner Experimente dort durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Heiner Schaal sei gedankt für die Überlassung der gp120-Expressionsplasmide und die Nutzungsmöglichkeit seines Labors

Der Hedwig und Waldemar Hort-Stipendienstiftung danke ich dafür, dass sie mir mit dem Stipendium den Aufenthalt in Baltimore realisiert hat.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Avi Nath, dem Leiter des Neurochemischen Labors der Johns Hopkins University in Baltimore, der nicht nur mit interessanten Diskussionen das Gelingen der Experimente sicherte, sondern mir auch Unterstützung bei der Wohnungssuche und dem Bewältigen der bürokratischen Schwierigkeiten zu Beginn meines Aufenthaltes in Baltimore bot.

Dr. Kathrin Hahn, danke, dass ich bei Deiner Familie wohnen durfte, und Niclas, danke, dass Du zwei Wochen lang Dein Kinderzimmer für mich geräumt hast. Kathrin, Deine Anregungen und Ideen waren für das Gelingen dieser Arbeit sehr wertvoll!

Ich danke Dr. Jessica Opatz für ihr offenes Ohr und ihre Ratschläge zur Verbesserung der Experimente und Brigida Ziegler für ihre ständige Unterstützung im Neurochemischen Labor in Düsseldorf. Fabian Kruse gilt mein Dank für das Überlassen der von ihm entwickelten Software.

7. Danksagung

Meiner Familie danke ich ganz herzlich für die fortwährende Unterstützung und ihr Interesse an der Arbeit.

Ebenso sei all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Steinbach
Vorname:	Rebekka
Geburtsdatum / -ort:	26.06.1980 in Siegen
Familienstand:	ledig

Beruflicher Werdegang:

Seit 07/2007	Assistenzärztin an der Augenklinik der Universität Düsseldorf
--------------	--

Hochschulbildung:

06/2007	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, mündlicher Teil, Erhalt der Approbation
04/2007	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, schriftlicher Teil
03/2006-02/2007	Praktisches Jahr an der Uniklinik Düsseldorf, 3. Fach Neurologie
03/2006	Zulassung zum Praktischen Jahr
08/2005	Famulatur Neurologische Klinik, Johns Hopkins Hospital, Baltimore, USA
03/2005	Famulatur Neurologische Ambulanz, Universitätsklinikum Düsseldorf
09/2004	Famulatur Geriatrie, Conquest Hospital, Hastings, England
08/2004	Famulatur Kardiologie, Universitätsklinik Düsseldorf
09/2003	Famulatur Augenheilkunde, Conquest Hospital Hastings, England
04/2003	Physikum
05/2001-06/2007	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf

9. Zusammenfassung

Etwa ein Drittel der unbehandelten Patienten, die mit dem humanen Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) infiziert sind, entwickelt im Verlauf der Infektion die HIV-Enzephalopathie, ein dementielles Syndrom, das mit schwersten kognitiven, psychosozialen und motorischen Störungen einhergeht. Als pathologisches Korrelat kommt es zu einer Neuronendegeneration, die zum einen direkt durch Virusproteine wie gp120 oder tat verursacht, zum anderen indirekt durch Induktion toxischer, körpereigener Entzündungsmediatoren vermittelt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Glycosylierung und des Tropismus des HIV-Oberflächenproteins gp120 auf dessen Calciumdysregulation und Toxizität in Astrozyten und Neuronen untersucht. Es wurde gesehen, dass gp120 abhängig von seinem Aufbau den Calciumhaushalt in Astrozyten beeinflusst. Direkt auf die Zellen appliziert, führte es zu einem Calciumeinstrom in Astrozyten. Überdies beeinflusste gp120 die astrozytäre Calciumantwort auf Glutamat und ATP: T-tropes gp120 verminderte die Calciumantwort auf Glutamat und ATP während M-tropes gp120 und dualtropes gp120 die Calciumantwort verstärkten. Bei den dualtropen Isoformen war die Fähigkeit zur Calciumdysregulation abhängig von der Glycosylierung an Position g17: Fehlte die Glycosylierung an Stelle g17, zeigte sich das Molekül ineffektiv.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der verschiedenen gp120-Isoformen auf die Sekretion neurotoxischer Stoffe in Astrozyten untersucht. Diesbezüglich zeigten sich alle gp120-Moleküle neutral und es konnte durch Inkubation in Überständen gp120-aktivierter Astrozyten keine im Trypanblau-Vitalitätstest nachweisbare Veränderung in Neuronenkulturen induziert werden.

Des Weiteren wurde die Toxizität der verschiedenen gp120-Isoformen auf Astrozyten und Neurone untersucht und verglichen. Während in Astrozytenkulturen keine Veränderung des Anteils avitaler Zellen nach Inkubation in T-, M- und dualtropen gp120-Überständen gemessen wurde, reagierten neuronale Kulturen sehr vulnerabel auf gp120-Applikation. T-tropes gp120 zeigte sich am stärksten neurotoxisch, aber auch M-tropes und dualtropes gp120 induzierten Neurodegeneration. Auch bei der Neurotoxizität der dualtropen gp120-Isoformen spielte die Glycosylierung an Position

gp17 eine wichtige Rolle: Nur das an gp17 glycosylierte Protein induzierte Zelltod in Neuronen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass gp120 zu einer Calciumdysregulation in Astrozyten führt und dass dieser Effekt abhängig von Tropismus und Glycosylierung des gp120 ist. Gp120 induzierte keine Apoptose in Astrozyten, dafür aber in Neuronen. Dieser Effekt war ebenfalls abhängig von Tropismus und Glycosylierung des gp120.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten weisen darauf hin, dass beide Faktoren, die gp120-induzierte Neuronendegeneration sowie das Überleben dysfunktionaler gp120-geschädigter Astrozyten mögliche Pathomechanismen der HIV sind.