

**Etablierung eines sensitiven quantitativen Nachweises proviraler
HIV-1 – DNA zur Lokalisation der HIV-1 - Reservoirs**

BACHELORARBEIT

im Studiengang Biologie
der Freien Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Science (B. Sc.)

vorgelegt von

Luise Krüger

Berlin, Januar 2015

Angefertigt am Robert Koch – Institut in Berlin im FG 18 „Zentrum für HIV und andere
Retroviren“

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> , erworbenes Immunschwäche Syndrom
AK	Antikörper
ART	antiretrovirale Therapie
bp	Basenpaare (Einheit für die Genomgröße)
CCR5	<i>chemokine (C-C motif) receptor 5</i>
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
C _T	<i>threshold cycle</i>
CXCR4	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
DMEM	Zellkulturmedium (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
FBS	Fetales Kälberserum (= <i>fetal bovine serum</i>)
g	Einheit für die Erdbeschleunigung (Zentrifugation)
HEX	Hexachlorfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IL – 2	Interleukin 2
kb	Kilobasenpaare (=1000 bp)
LB _{Amp} – Medium	LB – Medium mit Ampicillin, LB für <i>lysogeny broth</i> (nach <i>G. Bertani</i>)
LTR	<i>long terminal repeats</i>
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
mRNA	→ messenger RNA

PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCP	<i>Pneumocystis carinii Pneumonie</i> , eine aggressive Form der Lungenentzündung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
qPCR	quantitative real-time PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds/revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute (Einheit für die Drehzahl)
RPMI	Zellkulturmedium, benannt nach dem <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Retroviren	1
1.1.1	Aufbau eines Retroviruspartikels am Beispiel von HIV-1	2
1.1.2	Aufbau des viralen Genoms	2
1.1.3	Replikationszyklus von HIV-1	3
1.2	HIV-Infektion und AIDS	4
1.3	Therapie	6
1.4	HIV – Reservoir	7
1.5	Immunologische Aspekte	8
1.6	Zielsetzung	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Biologisches Material	13
2.1.2	PCR - Komponenten	13
2.1.3	Puffer und Medien	14
2.1.4	Chemikalien	15
2.1.5	Kits	16
2.1.6	Geräte	16
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.8	Software	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	18
2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.1.3	Herstellung von Plasmid – Standardreihen	21
2.2.1.4	Herstellung einer ACH-2 DNA Verdünnungsreihe	21
2.2.1.5	DNA-Aufreinigung	22
2.2.2	Zellbiologische Methoden	23
2.2.2.1	Zellkultivierung	23
2.2.2.2	Zellfixierung	23

2.2.2.3	In vitro-Infektion der PBMC mit HIV-1	24
2.2.2.4	Spiken (Versetzen) von Mauszellen bzw. DNA aus Mäusen mit den infizierten PBMC	24
2.2.3	Immunbiochemische Methoden.....	25
2.2.3.1	Durchflusszytometrie	25
2.2.3.2	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Validierung einer real-time PCR zur Quantifizierung der zellulären HIV-1 Proviruslast	30
3.2	Optimierung der HIV-spezifischen real-time PCR	30
3.3	Testen der Sensitivität der HIV-spezifischen real-time PCR	33
3.4	Durchflusszytometrie	37
3.5	Aufarbeitung der FACS-Proben für die real-time PCR	40
3.5.1	Umgang mit fixierten Zellen.....	40
3.5.2	DNA-Isolation aus geringen Zellzahlen und Versetzen der humanen Zellen mit murinen Zellen.....	43
3.6	Duplex PCR.....	51
4	Diskussion	53
4.1	Optimierung der HIV-spezifischen real-time PCR	53
4.2	Durchflusszytometrie	56
4.3	Aufarbeitung der Proben für die real-time PCR.....	57
4.4	Duplex PCR.....	62
5	Zusammenfassung.....	64
6	Ausblick	66
7	Anhang.....	67
	Literaturverzeichnis	68
	Abbildungsverzeichnis	70
	Tabellenverzeichnis	72
	Danksagung.....	74
	Eidesstattliche Erklärung	75

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Die Familie der Retroviren (*Retroviridae*) bezeichnet membranumhüllte Viruspartikel, die als Genom einzelsträngige (+)-RNA und als Intermediat im Replikationszyklus DNA vorweisen (3). Diese Viren zeichnen sich vor Allem dadurch aus, dass sie mithilfe des Enzyms *reverse Transkriptase* dazu fähig sind, ihre RNA über ein einzelsträngiges DNA-Intermediat in doppelsträngige DNA umzuschreiben und somit die Integration in das Wirtsgenom möglich ist. Dieser Vorgang widersprach dem zentralen Dogma vom unidirektionalen Fluss der genetischen Information (DNA → RNA → Proteine) und war für die Benennung dieser Virusfamilie (*Retroviridae*; „retro“ = *lat.*: zurück, rückwärts) ausschlaggebend.

Die im Wirtsgenom integrierte Virus-DNA wird als Provirus bezeichnet und dient als Template für die mRNA-Synthese.

Die Übertragung der Retroviren kann nicht nur horizontal (als freigesetztes Partikel) sondern auch vertikal (in die nächste Generation) erfolgen, wenn im Genom der Keimbahnzellen Proviren integriert sind. Demnach kann man zwischen endogenen und exogenen Retroviren unterscheiden. Endogene Retroviren sind in das Wirtsgenom integriert und meist inaktiviert; sie werden über die Keimbahn übertragen während exogene Retroviren von Organismus zu Organismus (horizontal) übertragen werden; sie besitzen alle Informationen für den Infektionszyklus und die folgende Virusfreisetzung in ihrem Genom (2).

Weiterhin lassen sich die Retroviren einteilen in Spumaviren und Orthoretroviren. Zu den Letzteren gehören die α -, β -, γ -, δ - und ε - Retroviren sowie die Lentiviren. Die Abgrenzung dieser sechs Genera untereinander erfolgt dabei auf Ebene der Besonderheiten der Infektionsverläufe und Erkrankungsformen sowie der genetischen und morphologischen Unterschiede der Viren. Die Benennung der Lentiviren (*lat.*: *lentus* = langsam) erfolgte aufgrund der Tatsache, dass diese Viren langsam fortschreitende funktionsmindernde Krankheiten und eine z.T. lang andauernde Latenzphase verursachen. Wichtige Vertreter der Lentiviren sind die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2.

Infiziert werden von den Retroviren vor Allem Wirbeltiere. Neben ihrem onkogenen Potential gehören Retroviren zu den Erregern vieler Infektionskrankheiten, die für Mensch und Tier lebensbedrohlich werden können. Zu den bekanntesten Vertretern zählen hierbei die humanen Immundefizienzviren, welche die erworbene Immunschwäche (AIDS, *acquired immune deficiency syndrome*) hervorrufen (2).

1.1.1 Aufbau eines Retroviruspartikels am Beispiel von HIV-1

Retroviren haben einen Durchmesser von ca. 100 nm und bestehen aus einem Capsid, welches von Matrixproteinen und einer Hüllmembran umgeben ist. Die Hüllmembran entsteht bei der Freisetzung des Viruspartikels aus der Wirtszelle. Im Capsid befindet sich das Virusgenom in Form von zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen (→ Abb. 1).

Mit der Hüllmembran verankert sind die transmembranen und externen Glykoproteine gp120 und gp41. Nach innen hin ist eine Schicht von Matrixproteinen (p17) mit der Hüllmembran verbunden. Im Zentrum des Viruspartikels befindet sich das Capsid, welches aus den Capsidproteinen (p24) besteht und über das Link-Protein (p6) mit der Hüllmembran verbunden ist. Die virale RNA innerhalb des Capsids bildet einen Komplex mit den sogenannten Nucleocapsidproteinen (p7).

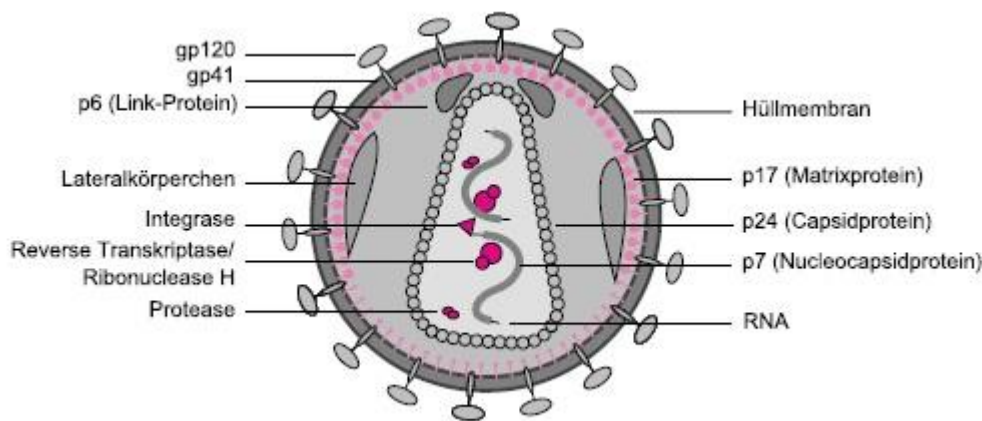


Abb. 1: Aufbau eines Retroviruspartikels (HIV-1) (2)

Capsid-, Matrix-, Nucleocapsid- sowie Link-Proteine gehören zu den *Gag*-Proteinen, welche vom *gag*-Gen exprimiert werden.

Im Viruspartikel sind außerdem die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease enthalten, welche wichtiger Bestandteil des Replikationszyklus der Viren sind. Die Reverse Transkriptase (RT) dient u.a. zur Transkription der viralen RNA in DNA. Die Integrase ist für die Integration der Virus-DNA in die des Wirts verantwortlich und die Protease ist wichtig für das Zerschneiden der *Gag*-Vorläuferproteine im Verlauf des Replikationszyklus (2).

1.1.2 Aufbau des viralen Genoms

Im Viruspartikel liegen zwei Kopien des RNA-Genoms vor, wobei ein RNA-Strang ca. 9,2 kb (bei HIV-1) lang ist. Das Genom der Retroviren besteht mindestens aus den Genen *gag*, *pol*

und *env*. Diese Gene codieren für die jeweiligen Proteine Gag (gruppenspezifische Antigene), Pol (Polymerase) und Env (Envelope, die Glykoproteine der Hülle).

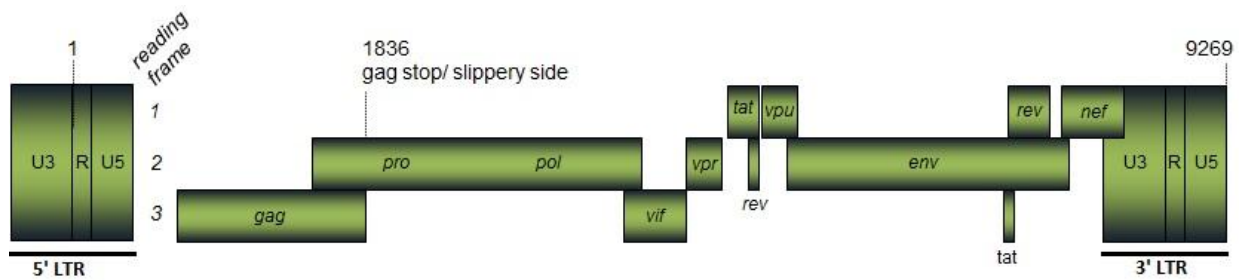


Abb. 2: provirale Genomstruktur von HIV-1

Im HIV-1 – Genom (→ Abb. 2) sind zusätzlich noch weitere Gene für regulatorische Proteine vorhanden, welche für die reverse Transkription und die Integration wichtig sind. Die regulatorischen bzw. akzessorischen Gene heißen *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu*.

Ist das Virusgenom im Wirtsgenom integriert, so flankieren den Provirus lange identische Sequenzfolgen. Diese werden LTR's genannt (*long terminal repeats*) und enthalten Promotor- und Enhancer – Elemente, welche für die Kontrolle der Genexpression unerlässlich sind (2).

1.1.3 Replikationszyklus von HIV-1

HI-Viren können in der Blutbahn Zellen infizieren, die auf der Oberfläche CD4-Rezeptoren besitzen; dies sind vor Allem CD4+ - T-Zellen und Makrophagen.

Mithilfe des Glykoproteins gp120 bindet das Virus an einen CD4-Rezeptor einer dieser Zellen (→ Abb. 3). Um das Verschmelzen mit der Zellmembran möglich zu machen, wird jedoch zusätzlich zum CD4-Rezeptor noch ein Chemokinrezeptor (CCR5 bei Makrophagen oder CXCR4 bei T-Lymphocyten) als Corezeptor benötigt. Hat das Virus an diese beiden Strukturen auf der Oberfläche der Zielzelle gebunden, so fusioniert die Virushülle mit der Zellmembran und das Capsid kann in die Zelle eintreten (*Uncoating*).

Mit dem Capsid gelangen nun auch die beiden RNA-Genome und die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease ins Zellinnere. Im Cytoplasma erfolgt unmittelbar die reverse Transkription des Virusgenoms, wonach das Virusgenom als doppelsträngige DNA vorliegt. Mithilfe des Matrixproteins p17 und eines weiteren Proteins (Vpr) ist der Transport der viralen DNA durch die Kernporen in den Zellkern möglich und somit auch die Infektion ruhender Zellen. Dies funktioniert allerdings ausschließlich bei den Lentiviren; alle anderen Retroviren sind nur dazu fähig, bei sich teilenden Zellen zu integrieren.

Im Zellkern geschieht die Integration des Virusgenoms in das Wirtsgenom mithilfe der Integrase. Damit liegt das Virus dann als Provirus vor. Ehe die Genexpression beginnt, kann das Provirus lange latent bleiben.

Nach Beendigung der Latenzphase erfolgt die Transkription der Provirus-DNA durch die humane RNA-Polymerase II, welche die DNA in mRNA und in genomische RNA umschreibt. Bei der Translation im Cytoplasma werden daraufhin die Virusproteine (und z.T. Vorläuferproteine) gebildet und anschließend zusammengesetzt. Durch die Knospung an der Zellmembran wird das unreife Viruspartikel freigesetzt und reift dann zum infektiösen Virus, welches weitere Zellen infizieren kann (2, 3).

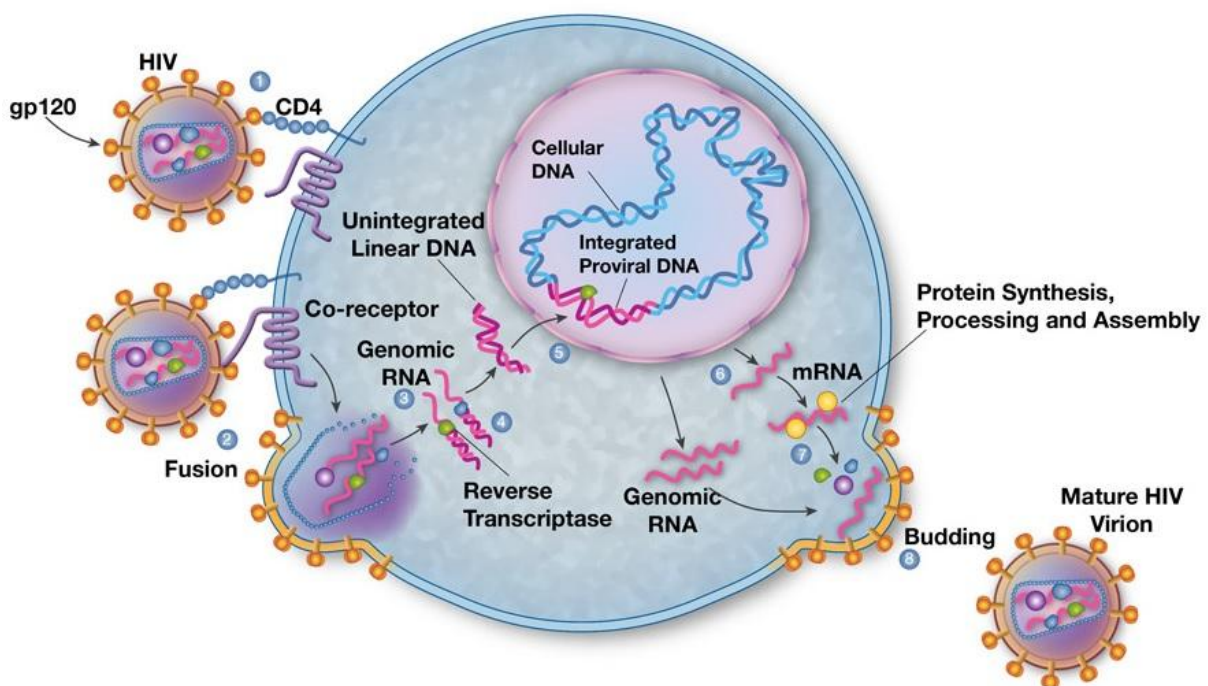


Abb. 3: Replikationszyklus der HI-Viren [Aus: <http://www.vsbassociates.com/images/powerpoint/2HIV-replication-cycle.jpg>]

1.2 HIV-Infektion und AIDS

Weltweit sind heutzutage circa 35 Millionen Menschen mit HIV infiziert (Stand 2012, UNAIDS, www.unaids.org). Die Übertragung von HIV erfolgt durch infektiöse Körperflüssigkeiten und geschieht in den meisten Fällen über Sexualkontakte. Ebenso kann das Virus über kontaminiertes Blut bei Transfusionen oder mit Injektionsnadeln beim Drogenkonsum, sowie auch bei der Geburt oder beim Stillen von Babys übertragen werden. Das HI-Virus wird dabei nicht nur als freies Viruspartikel übertragen, sondern auch über infizierte Zellen, die das Provirus in sich tragen (2, 3). HI-Viren lassen sich nicht über Tröpfchen- oder Schmierinfektion übertragen,

sodass HIV, im Vergleich zu anderen Krankheitserregern, oft als schwer übertragbar bezeichnet wird. Die Übertragbarkeit des Virus sollte jedoch nicht unterschätzt werden, denn die Gefahr der Übertragung über die oben genannten Wege ist gerade bei hohen Viruslasten sehr groß.

Als gebräuchlichster und routinemäßig durchgeführter HIV-Test gilt der ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), der auf dem Nachweis von im Blut befindlichen Antikörpern gegen Proteine des HIV, vor Allem gegen p24 (dem Capsidprotein) und Env (den Glykoproteinen der Hülle), beruht.

Der Verlauf der HIV-Infektion lässt sich in die folgenden drei Phasen einteilen (→ Abb. 4):

Die erste Phase (auch *Primärinfektion*) dauert ca. einen bis sechs Monate an und verläuft häufig unauffällig. Es können grippeähnliche Symptome wie Fieber, Gelenkschmerzen und Lymphknotenschwellungen, eventuell auch Hautausschlag, auftreten. In dieser Phase befinden sich große Virusmengen im Blut und die CD4+-Lymphocyten-Anzahl sinkt vorübergehend etwas ab (oft um mehrere 100 CD4-Zellen/ μ l Blutplasma)(4), steigt jedoch zum Ende dieser Phase wieder an.

Da die Viruslast in dieser Phase extrem hoch ist, ist auch das Übertragungsrisiko höher als im weiteren Verlauf der Infektion.

Die zweite Phase nennt sich *Latenzphase* und kann durchschnittlich 10 Jahre andauern. Der Patient befindet sich in dieser Phase in einem symptomfreien Zustand. Durch die Immunantwort sinkt die Viruslast im Blut und die CD4+-Zellzahl nimmt nur sehr gering im Laufe der Jahre ab. Insgesamt herrscht im Körper des Infizierten ein Gleichgewicht zwischen Virusreplikation (und demzufolge Zelltod) und der Produktion neuer CD4+-Zellen.

In der letzten Phase, der *symptomatischen Phase*, kommt es zur Immunschwäche und das AIDS-Krankheitsbild tritt hervor. Die CD4+-Zellzahl nimmt rapide ab während die Viruslast im Blut wieder zunimmt. Durch die Schwächung des Immunsystems kommt es zu HIV-assoziierten Infektionen wie Pilzinfektionen, Gürtelrose oder bakterieller Lungenentzündung. Sinkt die CD4-Zellzahl unter ein bestimmtes Level (200 Zellen/ μ l), so treten AIDS-opportunistische Krankheiten, wie z.B. Kaposi-Sarkom, Candida-Infektion oder PCP, auf. Die erforderliche Vielfalt an spezifischen Antikörpern ist im Körper dann nicht mehr gegeben und verschiedenste Keime können sich vermehrt im Körper ausbreiten, was bei immungeschwächten Personen besonders gefährlich werden kann. Opportunistische Krankheiten sind demnach Infektionen, die nur bei Menschen mit einer Immunschwäche zu einer Erkrankung führen. Letztlich versagt das Immunsystem, wobei eine mögliche Ursache der drastische Verlust der CD4+-T-Zellen ist. Der Patient erliegt dabei einer der opportunistischen Infektionen (2-5).

Verlauf der HIV-Infektion

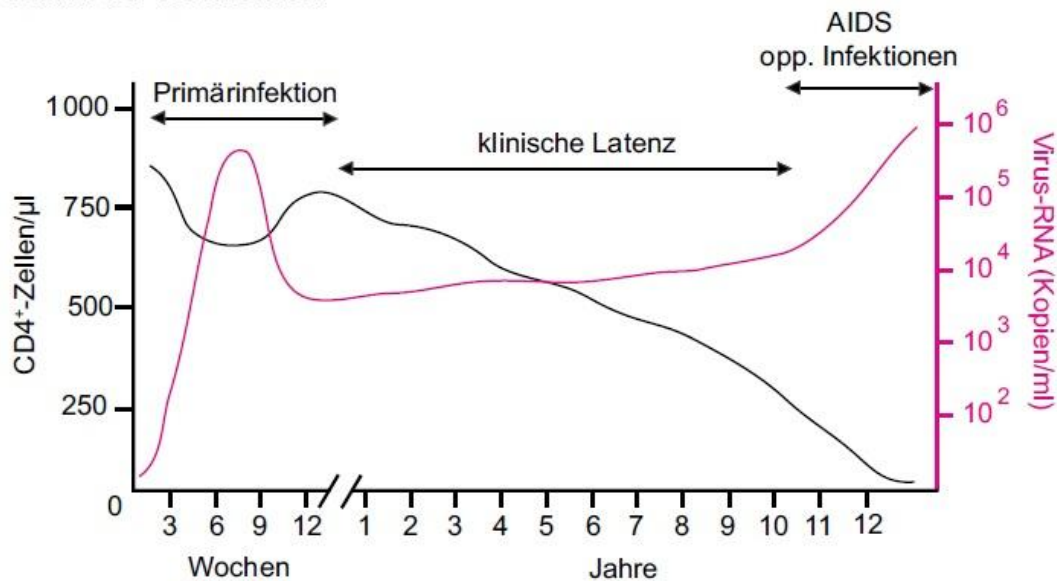


Abb. 4: natürlicher Verlauf der HIV-Infektion (2)

1.3 Therapie

Um die Latenzphase zu verlängern und Symptome zu mildern gibt es nun seit ca. 20 Jahren antiretrovirale Therapien (ART) (4). Die Initiation der Therapie hängt von der Viruslast im Blut, der CD4+-Zellzahl und der klinischen Symptomatik ab. Zur Behandlung werden verschiedene Medikamente (meist Hemmstoffe) in Kombination eingesetzt, um möglichst viele Funktionen des Virus zu treffen. Bei der HAART (*highly active antiretroviral therapy*), einer Therapie, die in der Klinik heutzutage meistens angewandt wird, werden Kombinationen von einem Protease-Inhibitor und mindestens zwei verschiedenen Reverse Transkriptase - Hemmstoffen verwendet. (2); zusätzlich dazu kommen meist Entry- und Integrase-Inhibitoren.

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass mithilfe antiretroviraler Therapien die Anzahl infizierter Zellen und die Viruslast reduziert, HIV-spezifische Immunantworten erhöht und auch die CD4-Zellzahl stabilisiert wird (1, 4, 6-8). Es besteht sogar die Möglichkeit, dass, im Gegensatz zu unbehandelten Patienten, behandelte Patienten als *Post-treatment-controller (PTC)* die Infektion öfter ohne ART kontrollieren können, sodass die Viruslast unter der Nachweisgrenze von 50 Kopien/ml Plasma bleibt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie (9) zeigte, dass ein möglichst früher Beginn der ART zu einem Rückgang zellassoziierter HIV-1 – DNA nach Langzeit –Behandlung führt.

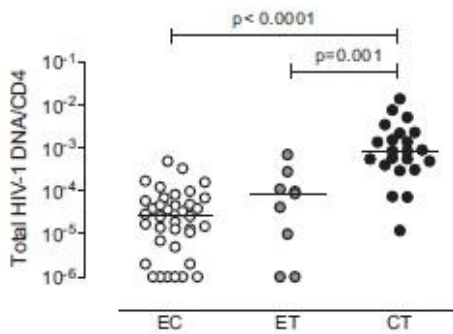


Abb. 5: zellassoziierte HIV-1 DNA in CD4+ T-Zellen, Vergleich der Patienten, welche die ART frühzeitig begonnen haben (ET) mit Patienten, welche die ART während der chronischen Infektion begonnen haben (CT) und mit Elite controller (EC) (9)

Die Vorteile der ART liegen in der Remission, in verbesserten Immunantworten, dem verminderten Übertragungsrisiko auf Andere und darin, dass die Eradikationschance für die Zukunft erhöht wird. Des Weiteren kann mithilfe der Antiretroviralen Therapien eine normale (d.h. in Bezug auf gesunde Menschen) Lebenserwartung erreicht werden. Jedoch birgt die ART auch Nachteile, wie etwa die Risiken, die bei Abbruch der Therapie auftreten können und auch die Toxizität der Medikamente und die Entwicklung von Resistenzen im Virus, wobei ART-resistente Formen übertragen werden können.

1.4 HIV – Reservoir

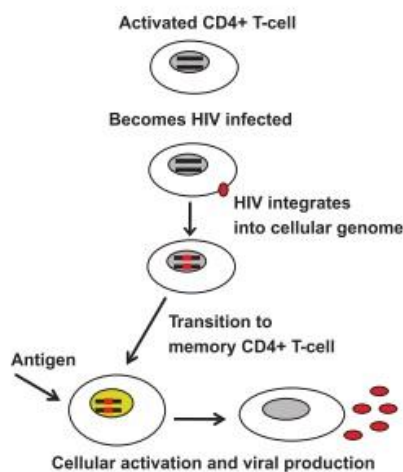


Abb. 6: CD4+ T-Gedächtniszellen als HIV-Reservoir: eine aktivierte CD4+ T-Zelle wird durch HIV infiziert und geht anschließend in eine Gedächtniszelle über, welche durch Antigene reaktiviert werden kann. (1)

Trotz verschiedener Therapien ist es bis heute nicht gelungen, HIV-Infektionen komplett zu heilen (bis auf einen Ausnahmefall (10)). Der Grund dafür sind die HIV-Reservoir; bestimmte Zellen mit integriertem HI-Provirus, welche von den Medikamenten bei der antiretroviralen Therapie nicht beeinflusst werden. Die Ursache dafür liegt darin, dass die Proviren inaktiv sind; sie exprimieren keine viralen Proteine und stellen dadurch für das Immunsystem keinen Unterschied zu gesunden T-Zellen dar. Es wurde festgestellt, dass auf zellulärer Ebene vor Allem ruhende, latent infizierte CD4 – Gedächtnis-T-Zellen als HIV-Reservoir dienen (11). Dabei bildet sich die Latenz aus, nachdem aktivierte CD4+ T-Zellen mit HIV infiziert wurden und kurz darauf, bevor sie eliminiert werden, zu Gedächtniszellen werden. Somit sind diese Zellen dann für das

Immunsystem unauffällig, ehe sie von einem Antigen reaktiviert werden und erneut Viren produziert werden können (1).

HIV-Reservoirire erlauben also trotz Therapie den Fortbestand replikationskompetenter Viren, was bedeutet, dass bei einer Therapiepause wieder eine vermehrte Virusproduktion stattfinden kann. (12-17).

Um einen Ansatz zur Eradikation von HIV zu finden, ist es notwendig, die provirale HIV DNA nachzuweisen und genau zu lokalisieren. Zudem dient der Nachweis proviraler HIV DNA der Feststellung der Menge der infizierten Zellen und damit auch der Feststellung des Grades der Infektion.

Anders als die Viruslast, welche am Anfang der Infektion noch gut aber später während der ART schwierig nachzuweisen ist, sind die latenten Proviren zu jedem Zeitpunkt, auch bei Unterdrückung der Virusproduktion, in den Zellen vorhanden und mittels PCR nachweisbar. Demnach ist die Quantifizierung proviraler DNA zusätzlich zur Detektion der Viruslast im Blut und der CD4+-Zellzahl eine gute ergänzende Methode zum Aufklären des Infektionsstatus.

Zwecks der Detektion zellulärer HIV-1 Reservoirire wurde unter anderem von der Arbeitsgruppe um P. Lusso (18) eine Methode entwickelt, mit der es möglich ist, mittels quantitativer real-time PCR provirale HIV-1 DNA zu quantifizieren. Das Besondere an dieser Methode ist, dass die Detektion spezifisch für HIV-1 möglich ist, aber auch sensitiv für alle acht Subtypen (A, B, C, D, F, H, J, K) der HIV-1 M – Untergruppe ist. So kann mittels real-time PCR die Menge proviraler HIV DNA aus einer Probe bestimmt werden.

1.5 Immunologische Aspekte

Die Zielzellen des HI-Virus sind Zellen, welche auf ihrer Oberfläche einen CD4 – Rezeptor besitzen. Dies sind vor Allem T-Lymphozyten; aber auch auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen oder Mikrogliazellen finden sich CD4-Rezeptoren.

Primär werden von dem Virus CD4+ - T-Zellen infiziert, seltener auch Makrophagen. Frühzeitig etablieren sich in diesen Zellen permanente Virusreservoirire, wodurch potentiell weitere Zellen infiziert werden können.

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems und maßgeblich an der Erregerabwehr beteiligt. Sie sind oftmals die ersten Zellen, welche eingedrungene Erreger erkennen. Durch Phagozytose beseitigen sie diese im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr. Zu den weiteren Aufgaben der Makrophagen zählt die Inangsetzung einer Immunantwort durch

Sekretion von Cytokinen. Auch als Antigen-präsentierende Zellen (APC) haben Makrophagen eine wichtige Funktion. Durch bestimmte Mechanismen werden Antigene an die Oberfläche der Makrophagen gebracht, um anschließend von T-Helferzellen (=CD4+-T-Zellen) erkannt zu werden und eine Antikörperproduktion auszulösen (5).

T-Zellen gehören zum adaptiven Immunsystem. Sie werden unterteilt in Zytotoxische T-Zellen (CTLs) und T-Helferzellen (T_H). Da T-Helferzellen CD4 exprimieren und sie damit Zielzellen für HIV darstellen, soll vor Allem auf diese Zellen eingegangen werden.

T_H -Zellen sind primär für die Erkennung von Antigenen zuständig, welche ihnen von den APC's präsentiert werden. Indem sie die Antikörper-Synthese der B-Zellen induzieren, optimieren die T_H -Zellen die spezifische Immunantwort (5).

Über eine Aktivierung durch Antigene erfahren naive T-Zellen (T_N) eine Differenzierung hin zu Effektorzellen. In diesem ausdifferenzierten Zustand sind die Zellen in der Lage, die spezifischen Funktionen in der Immunabwehr auszuführen. Nach Abwehr der Antigene sterben etwa 95 % der T-Effektorzellen ab, während sich ein kleiner Teil dieser Zellen zu langlebigen Gedächtnis-T-Zellen entwickelt (*Memory T cells*) (19). Gerade die Gedächtnis-T-Zellen dienen während einer HIV-Infektion als latente Virusreservoir (11), denn sie sind über Jahre stabil, funktionell ruhig und somit für das Immunsystem unauffällig.

Im Zuge der letzten Jahre fand man mittels Durchflusszytometrie heraus, dass sich die Gedächtnis-T-Zellen in verschiedene Subtypen unterteilen lassen, welche jeweils spezifische zelluläre Funktionen übernehmen. Die Subtypen lassen sich anhand der Expression unterschiedlicher Kombinationen von Oberflächenmarkern unterscheiden (→ Abb. 7) (19).

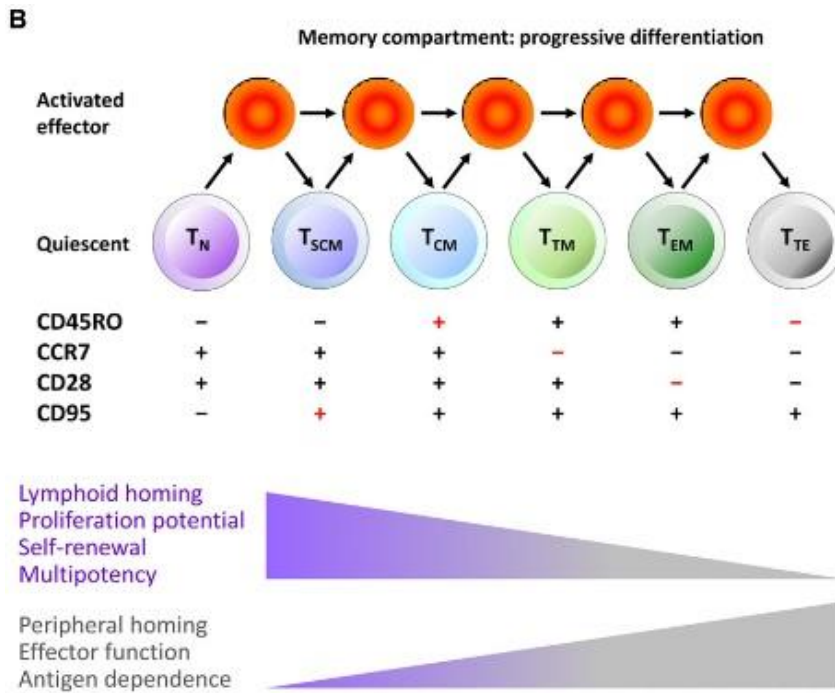


Abb. 7: Subtypen der T-Zellen mit Darstellung der Funktionen und der spezifischen Kombinationen ihrer Oberflächenproteine (19) (T_N = naive T cells, T_{SCM} = stem cell memory T cells, T_{CM} = central memory T cells, T_{TM} = transitional memory T cells, T_{EM} = effector memory T cells)

T_{CM} - (*central memory*) Zellen und T_{EM} - (*effector memory*) Zellen sind nach ihrer Funktion definiert. Während die T_{EM} -Zellen nach Antigenkontakt erneut schnell reaktiviert werden können und vielfach neue Effektorzellen bilden, ruhen die T_{CM} -Zellen zunächst einmal in den Sekundären Lymphatischen Organen, ehe sie aktiviert werden und selbst zu Effektorzellen werden. T_{CM} -Zellen werden frühzeitig differenziert (Vorläuferzellen) und weisen ein hohes Potential an Selbsterneuerungs- und Proliferationsfähigkeit auf.

T_{TM} - (*transitional memory*) Zellen wurden nach ihrem Differenzierungsgrad benannt. Der Grad der Differenzierung ist hierbei so definiert, dass Zellen, die in Bezug auf naive T-Zellen (T_N) eine möglichst ähnliche Kombination von Oberflächenproteinen haben, weniger ausdifferenziert sind als solche, die in der Kombination ihrer Oberflächenmarker eine große Abweichung zu den T_N -Zellen zeigen. Mit dem Grad der Differenzierung steigt auch die Fähigkeit der Effektorfunktion. T_{TM} -Zellen wurden demnach definiert als Zellen, die differenzierter als T_{CM} -Zellen, aber nicht so ausdifferenziert wie T_{EM} -Zellen sind, weshalb sie *transitional memory* – Zellen heißen.

Als Subtyp von T_{EM} -Zellen entstehen T_{TE} - (*terminal effector*) Zellen. Diese sind im Bezug zu T_N -Zellen am ausdifferenziertesten.

T_{SCM} - (*stem cell memory*) Zellen zeigen Stammzell-ähnliche Eigenschaften. Sie haben, im Gegensatz zu den anderen Gedächtniszell-Subtypen, großes Potential in der Fähigkeit der Selbsterneuerung, der Proliferation und der Multipotenz.

Die Differenzierung der humanen T-Gedächtniszellen folgt einer linearen Progression, bei der nach Stimulation durch Antigene oder nach Signalübertragung wenig differenzierte Zellen mehr differenzierte Abkömmlinge hervorbringen. Der Erwerb bzw. Verlust spezifischer Funktionen mit steigendem Differenzierungsgrad ist dabei Teil der Progression (19).

Da sich HIV-Reservoirire, wie schon oben erwähnt, in den meisten Fällen in CD4+ Gedächtnis-T-Zellen befinden, stellt sich die Frage, in welchem Subtyp genau sich die latente provirale DNA befindet. Im Jahr 2009 wurden Ergebnisse publiziert, welche darauf hinwiesen, dass die zwei Hauptreservoirire für HIV DNA T_{CM} – und T_{TM} -Zellen sind (13). Kürzlich jedoch fanden unabhängig voneinander zwei weitere Arbeitsgruppen heraus, dass vor Allem die T_{SCM} -Zellen als Langzeit- Reservoirire für HIV dienen, und zwar auch während der HAART (11, 20-22).

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit soll eine Strategie zum Nachweis proviraler HIV-1 DNA in verschiedenen humanen T-Zell-Subpopulationen etabliert werden, welche zur Lokalisation der HIV-Reservoirire führt.

Zunächst einmal soll der Prozess der Zellanalyse und –Sortierung mittels FACS dahingehend optimiert werden, dass es möglich ist, die verschiedenen T-Zell-Subtypen voneinander zu trennen und zu sortieren. Dazu sollen aus Buffy Coat PBMC isoliert werden und anschließend mittels MACS gegen CD4 selektiert werden. Die CD4+ angereicherten Zellen sollen dann einer FACSFärbung unterzogen werden, nach welcher die Durchflusszytometrie stattfindet. Mit Hilfe eines bestimmten *Gating*-Schemas ¹ sollte es dann möglich sein, die unterschiedlichen Zell-Subpopulationen voneinander zu unterscheiden und somit die Sortierung möglich zu machen.

Weiterhin soll im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die für die FACS-Analyse fixierten Zellen nach der Sortierung noch mittels real-time PCR auf HIV-1 untersucht werden können. Dazu sollen verschiedene Methoden der DNA Isolierung getestet werden, um aus einer geringen Anzahl von Zellen für die real-time PCR geeignete DNA zu isolieren.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde bereits eine geeignete Methode, humane Zellen anhand eines spezifischen Gen-Abschnittes zu detektieren und quantifizieren, getestet und optimiert. Es soll nun geprüft werden, ob diese Methode geeignet ist, humane Zellen innerhalb von murinen Zellen, die zur Erhöhung der Effizienz der DNA Isolierung eingesetzt werden sollen, zu bestimmen.

¹ Von Prof. Y. Taoufik, Service d'Immunologie Biologique, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Frankreich; persönliche Mitteilung

Ebenso soll untersucht werden, ob diese real-time PCR zusammen mit der hier zu etablierenden real-time PCR für die Quantifizierung von HIV-1 Proviren in einem Duplex-Ansatz angewendet werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *Biologisches Material*

HIV-1	HIV-1 _{BAL} zur Verfügung gestellt von Dr. S. Norley, RKI
PBMC	aus Buffy Coat (aus Blutspenden vom DRK)
ACH-2 Zellen	erhalten von: NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: ACH-2 from Dr. Thomas Folks
C8166 – Zellen	ATCC
P815 – Zellen	ATCC
Buffy Coat	DRK Blutspendendienst
Antikörper (14 Stk.)	eBioscience
DNA aus Maus-Milzzellen	zur Verfügung gestellt von Dr. O. Hohn, RKI
DNA von Schweinen	zur Verfügung gestellt von Dr. O. Hohn, RKI
AG 3.0 Monoklonale Antikörper	hergestellt von Dr. S. Norley, RKI (23)
Inaktiviertes HI-Virus (für ELISA)	zur Verfügung gestellt von Dr. S. Norley, RKI
HIV-1 + Plasma Pool	zur Verfügung gestellt von Dr. S. Norley, RKI

2.1.2 *PCR - Komponenten*

10 x Puffer	QIAGEN
5 x Sequenzier – Puffer	ABI Terminator Chemie
Big Dye	ABI Terminator Chemie

CCR5 – Forward Primer (<i>Malnati</i>) ²	TIB Molbiol Berlin
CCR5 – Reverse Primer (<i>Malnati</i>) ³	TIB Molbiol Berlin
CCR5 – Sonde (<i>Malnati</i>) ⁴	TIB Molbiol Berlin
DMSO	Sigma
dNTP's	Fermentas International Inc.
HIV-1 – Forward Primer (<i>Malnati</i>) ⁵	Invitrogen
HIV-1 – Reverse Primer (<i>Malnati</i>) ⁶	Invitrogen
HIV-1 – Sonde (<i>Malnati</i>) ⁷	Invitrogen
HotStart <i>Taq</i> Polymerase	QIAGEN
pNL4-3 Plasmid	erhalten von: NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pNL4-3 from Dr. Malcolm Martin
TaqMan Universal Mastermix	Applied Biosystems
TaqMan Universal Mastermix II	Applied Biosystems
Nucleasefreies Wasser	QIAGEN

2.1.3 Puffer und Medien

1x TAE – Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,2
6x DNA Ladepuffer	10 mM Tris-Acetat, 50 mM EDTA, 10 % Ficoll-400(w/v) (Serva), 0,4 % (w/v) Orange G (Sigma) in H ₂ O
FBS	Biochrom AG

² Sequenz 5'-3': ATGATTCCTGGGAGAGACGC

³ Sequenz 5'-3': AGCCAGGACGGTCACCTT

⁴ Sequenz 5'-3': HEX – AACACAGCCACCACCCAAGTGATCA-BHQ1

⁵ Sequenz 5'-3': TACTGACGCTCTCGCACC

⁶ Sequenz 5'-3': TCTCGACGCAAGGACTCG

⁷ Sequenz 5'-3': FAM – CTCTCTCCTTCTAGCCTC-MGB

PBS	0,01 M NaH ₂ PO ₄ , 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl in aqua dest., mit HCl auf pH 7,2 einstellen
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH
Histopaque	Sigma
MACS Puffer	PBS, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA; steril filtriert
FACS Puffer	PBS, 1 % BSA, 0,1 % NaN ₃ ; steril filtriert
BD Cell Fix™ (Fixierungspuffer)	BD Biosciences
Carbonat/ Bicarbonat Puffer	Sigma
Phosphat Citrat Puffer	Sigma

2.1.4 Chemikalien

Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH
Coulter® Isoton® II Diluent	Beckman Coulter GmbH
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (10.000 in water)	Biotium, Inc.
Generuler 100bp DNA Ladder	Fermentas International Inc.
Generuler 1kb plus DNA Ladder	Fermentas International Inc.
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	0,84%
CD4+ T-cell antibody cocktail	MACS Miltenyi Biotec
CD4+ T-cell microbead cocktail	MACS Miltenyi Biotec
Ultra Comp Beads	eBioscience
Tryptan Blue Solution (0,4 %)	Sigma
OPD (60 mg)	Sigma
Anti-Human IgG HRPO Konjugat	Sigma
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) (30 %)	Merck
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) (25 %)	Merck
Tween 20	Sigma

Milchpulver

„Sucofin Magermilchpulver – leicht löslich“ von Edeka

2.1.5 Kits

QIAamp DNA Blood Mini Kit

QIAGEN

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

QIAGEN

2.1.6 Geräte

Bright-Line Hemacytometer

Sigma

Centrifuge 5415 R

Eppendorf

Coulter Particle Count & Size Analyzer Z2

Coulter Electronics Inc.

DNA Engine[®] Peltier Thermal Cycler

Bio-Rad

Eppendorf research plus (Pipetten)

Eppendorf

Heraeus Biofuge fresco

Thermo Scientific

Heraeus Multifuge 3SR+

Thermo Scientific

HLC (Heizblock)

Haep Labor Consult

Julabo TW20 (Wasserbad)

Julabo

Labotect C200 Inkubator

Labotect Labor – Technik – Göttingen

NanoDrop Spektrophotometer ND-1000

Nanodrop

Nunc Flow AURA PCR (Sterilbank)

Nunc GmbH & Co. KG

PG 5002-S Delta Range[®] (Waage)

Mettler-Toledo GmbH

Pipetman (Pipetten)

Gilson Inc.

Power Pac 200 (Elektrophorese Stromversorgung)

Bio-Rad

Sprout (Tischzentrifuge)

Heathrow Scientific

Sterilbank Thermo HeraSafe

Kendro

Stratagene Mx 3000P qPCR System

Agilent Technologies

Vortex Genie 2

Scientific industries

Wide mini-sub[®] Cell GT (Gelelektrophoresekammer)

Bio-Rad

BD LSR II Flow Cytometer

BD Biosciences

MACS	MACS Miltenyi Biotec
Vacusafe	Integra Biosciences
Mikroskop	ZEISS
Geldokumentationsanlage	PHASE GmbH
Multichannel Pipetten	Thermo Scientific
Skat Washer 300	Skatron Instruments
Tecan Sunrise ELISA reader	Tecan

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

NeoTouch Neopren-Handschuhe	Ansell
PCR SingleCap 8er-SoftStrips (0,2 ml für PCR)	Biozym Scientific
PCR Tubes – Caps (8er Streifen) (für real-time PCR)	Applied Biosystems
PCR Tubes (8er Streifen) (0,2 ml für real-time PCR)	Applied Biosystems
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	TPP
Zellkulturflaschen	TPP
Zentrifugenröhrchen (50 ml, 15 ml)	Sarstedt
BD Falcon Cell Strainer (40µm)	BD Biosciences
LS Säulen für MACS	Miltenyi Biotec
Micronic Tubes	Micronic
96-Well Platte	Thermo Scientific

2.1.8 Software

FireCam Control	PHASE GmbH
MxPro ET Software	Agilent Technologies
NanoDrop® ND-1000	Molecular Dynamics/ Amer- sham Bioscience , Nanodrop
FlowJo	FlowJo, LLC
EasyReader (ELISA Software)	entwickelt von Dr. S. Norley, RKI

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode zur exponentiellen Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen. Das Verfahren beruht auf der enzymatischen Aktivität der Polymerase, mithilfe derer einzelne Nukleotide zu einer langen Kette als Kopie der Template-Sequenz polymerisiert werden. Bei der real-time PCR wird durch das Hinzufügen einer sequenz-spezifischen Sonde, die von der Polymerase im Rahmen der Amplifikation gespalten wird, ermöglicht, zeitgleich mit der Amplifikation die Menge der Produkte durch proportionale Fluoreszenz zu messen.

Konventionelle PCR


Für die Amplifikation ohne Einsatz der fluoreszenz-markierten Sonde wurde der folgende Ansatz verwendet:

Tab. 1: Schema eines Mastermix für die PCR mit CCR5

Komponenten	Eingesetztes Volumen pro Reaktion
10x Puffer	2,5 µl
dNTPs (25 µM each)	1 µl
Forward Primer (10 µM)	0,5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl
Qiagen® Hot Start <i>Taq</i> Polymerase (10 µM)	0,125 µl
H ₂ O (bi-dest.)	10,375 µl (ad. 15 µl)

Pro Reaktion wurden zum Mastermix jeweils 10 µl des Templates hinzugegeben und die PCR mit dem entsprechenden Thermocycler-Programm (Tab.2) gestartet.

Tab. 2: Thermocycler-Programm für die CCR5-spezifische PCR

	Zyklus	Temperatur (°C)	Dauer
45 x 	1	95	15 min
	2	95	15 sec
	3	60	1 min
	4	72	5 min
	5	4	∞

Zur Auswertung der PCR wurden die Produkte über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Real-time PCR


Für die Amplifikation mit Einsatz der fluoreszenz-markierten Sonde wurde ein Mastermix folgend des Protokolls von *Malnati et al. (18)* mit den entsprechenden speziell designten Primern und der dazugehörigen Sonde hergestellt (Reaktionsansatz siehe Tab. 3). Von dem Mastermix wurden pro Reaktion 20 µl eingesetzt und dazu 5 µl Template (immer 25 µl Gesamtvolumen pro Reaktion). Um eine ausreichende Menge an Zellgenom-Äquivalenten einzusetzen, wurde bei gering konzentrierter genomischer DNA das einzusetzende Volumen für das Template erhöht auf 10 µl, dementsprechend wurden dann nur 15 µl des Mastermix eingesetzt.

Tab. 3: Schema eines Mastermix für die CCR5-spezifische real-time PCR nach *Malnati et al.*

Komponenten	Eingesetztes Volumen pro Reaktion
<i>Taq Man</i> Universal Mastermix	12,5 µl
CCR5 Forward Primer (10 µM)	0,75 µl
CCR5 Reverse Primer (10 µM)	0,75 µl
CCR5 Sonde HEX (10 µM)	0,5 µl
H ₂ O (bi-dest.)	Ad. 15 µl bzw. 20 µl (je nachdem, ob 5 oder 10 µl Template eingesetzt werden)

Gemessen wurde jede Probe stets dreifach, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Das Thermocycler-Programm wurde über 45 Zyklen entsprechend des Protokolls gefahren (Tab. 4). Die Auswertung erfolgte über die Software „MxPro“ von *Agilent Technologies*.

Tab. 4: Thermocycler-Programm für die CCR5- und HIV-1-spezifische real-time PCR nach *Malnati et al.*

	Zyklus	Temperatur (°C)	Dauer
45 x 	1	95	15 min
	2	95	15 sek
	3	60	1 min

Als Standardreihe für die CCR5-spezifische real-time PCR diente die CCR5 Plasmid-Standardreihe, welche im Vorfeld laut Protokoll (18) hergestellt wurde. Eingesetzt wurde diese in den Titrationsstufen von $2,8 \times 10^6$ Kopien/ μl bis $2,8 \times 10^{-1}$ Kopien/ μl mit jeweils 5 μl pro Reaktion.

Um zusätzlich zur Zellgenomquantifizierung mittels CCR5-spezifischer real-time PCR auch die HIV-1 proviralen Genome quantifizieren zu können, wurde eine HIV-spezifische real-time PCR durchgeführt. Als Standardreihe diente hierbei eine pNL4-3⁸ Standardreihe (in H₂O- sowie auch DNA-Background), welche zuvor in den Stufen 1×10^6 bis 1×10^{-1} angesetzt wurde. In den Mastermix wurde anstelle der CCR5-spezifischen Primer und der Sonde eine ebenfalls von *Malnati et al.* veröffentlichte HIV-1-spezifische Primer-Sonden-Kombination eingesetzt.

Duplex real-time PCR

Um beide Standardreihen im Duplex Format zu testen wurde ein Mastermix erstellt, in dem sowohl die CCR5-spezifische - sowie auch die HIV-1-spezifische Primer-Sonden-Kombination enthalten sind. Als Templates dienten die CCR5-Plasmid-Standardreihe und die pNL4-3 Standardreihe in H₂O, wovon jeweils pro Reaktion immer 5 μl eingesetzt wurden. In der folgenden Tabelle ist der Mastermixansatz dargestellt.

Tab. 5: Ansatz des Mastermix für die Duplex real-time PCR

Komponenten	Eingesetztes Volumen pro Reaktion
Taq Man Universal Mastermix	12,5 μl
HIV-1 Forward Primer (10 μM)	0,75 μl
HIV-1 Reverse Primer (10 μM)	0,75 μl
HIV-1 Sonde FAM (10 μM)	0,5 μl

⁸ pNL4-3 ist ein infektiöser Moleklarklon (Plasmid) des HIV-1 Genoms (24). **Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA.** 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *Journal of virology* **59**:284-291.

CCR5 Forward Primer (10 µM)	0,75 µl
CCR5 Reverse Primer (10 µM)	0,75 µl
CCR5 Sonde HEX (10 µM)	0,5 µl
H ₂ O (bi-dest.)	Ad. 20 µl

Als Negativkontrolle diente Aqua bi-dest. Die real-time PCR lief mit dem von *Malnati et al.* publizierten Thermocycler-Programm (siehe Tab. 4). Die Auswertung erfolgte wiederum mit dem Programm „MxPro“.

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte der konventionellen PCR wurden zur Auswertung auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde ein 1,2 %iges Agarosegel hergestellt (aus 1,2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer), welchem GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, *Biotium Inc.*) als Farbstoff zugefügt wurde (3 µl/100 ml). Die Gelelektrophorese lief bei 85 V über 60 Minuten.

2.2.1.3 Herstellung von Plasmid – Standardreihen

Mit dem HIV-1 Moleklarklon-Plasmid pNL4-3 wurden jeweils eine Standardreihe mit H₂O – Background und eine Standardreihe mit C8166-DNA Background hergestellt. Für den Background mit C8166-DNA wurde im Vorfeld die DNA aus C8166-Zellen isoliert. Die Herstellung der Standardreihen erfolgte nach dem Protokoll von *Malnati et al.* „*Preparation of tenfold serial dilutions of plasmid*“. Dazu wurden vorbereitend in jedes Gefäß (pro Verdünnungsstufe wurde ein Eppendorfgefäß verwendet) jeweils 900 µl C8166-DNA (60 ng/µl) bzw. H₂O gegeben. Es folgte die Zugabe von 100 µl einer bekannten Menge des Plasmids (10⁷ Kopien), welches verdünnt in H₂O vorlag, in das erste Gefäß. Nun wurde das Gefäß 30-mal invertiert, für 5 Minuten bei 56 °C inkubiert und nochmals für eine Minute auf Eis gestellt. Für jede Verdünnungsstufe wurden diese Schritte wiederholt.

Pro Standardreihe wurden die Verdünnungsstufen von 1 x 10⁶ bis 1 x 10⁻¹ Kopien/µl hergestellt.

Um eine eventuelle spätere Kontamination der Standardreihe zu vermeiden, wurden die Standardreihen aliquotiert.

2.2.1.4 Herstellung einer ACH-2 DNA Verdünnungsreihe

Um eine Verdünnungsreihe der ACH-2 DNA herzustellen, wurde im Vorfeld die DNA aus ACH-2 Zellen extrahiert. Im Folgenden wurde die DNA auf 132 ng/µl eingestellt, da für die real-time PCR, in welcher die Verdünnungsreihe getestet werden sollte, in 5 µl genau 660 ng

DNA entsprechend 110.000 Genom-Äquivalenten enthalten sein sollten. Die Verdünnungsstufen wurden anschließend hergestellt von 1×10^5 bis 1×10^{-2} Kopien/ μ l; verdünnt wurde jeweils immer mit H₂O (bi-dist.).

2.2.1.5 DNA-Aufreinigung

DNA-Aufreinigung aus nicht-fixierten Zellen

Um DNA Templates für verschiedene real-time PCRs zu erhalten, sollte aus Zellen (z.B. ACH-2 Zellen) DNA isoliert werden. Vorbereitend dazu wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche in ein Zentrifugengefäß gegeben und für 10 min bei 2000 rpm (863 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in ca. 5 ml PBS aufgenommen. Da auf die Säulen, mit denen im nächsten Schritt die DNA extrahiert werden soll, nur eine gewisse Menge an Zellen gegeben werden kann, wurden die Zellen anschließend mittels des *Coulter Particle Count & Size Analyzer* gezählt. Zusätzlich dazu wurden die Zellen mithilfe des Hämozytometers gezählt, um die Zellzahl zu bestätigen.

Die DNA-Extraktion erfolgte mittels des „QIAamp® DNA Blood mini Kit“ von *QIAGEN* und folgte dem Protokoll „DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)“ nach Herstellerangaben. Das Prinzip beruht dabei auf der Bindung der Nukleinsäuren an die Silica-Membran der Säule. Dazu werden zunächst die Zellen mittels eines Lysis-Puffers lysiert und während der Inkubation bei 56 °C aufgeschlossen. Anschließend wird Ethanol zur Fällung hinzugegeben und der gesamte Inhalt auf eine Silica-Säule gegeben. Mithilfe von Zentrifugation und Verwendung zweier Puffer erfolgt der Waschschrift. Zuletzt wird die reine genomische DNA mittels H₂O oder eines Puffers eluiert.

Im Anschluss an die Extraktion wurde mittels *Nano Drop* die DNA-Ausbeute der jeweiligen Produkte gemessen.

DNA-Aufreinigung aus fixierten Zellen

Um auch aus Zellen, welche im Vorfeld mit PFA-haltigem Puffer fixiert wurden, DNA mit einer hohen Ausbeute extrahieren zu können, bedarf es eines speziellen Verfahrens. Mithilfe des „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ von *QIAGEN* war es möglich, DNA aus fixierten Zellen zu extrahieren. Die Extraktion folgte dem Protokoll „Isolation of genomic DNA from FFPE tissue sections“. Da in dem Protokoll davon ausgegangen wird, dass man als Ausgangsmaterial Gewebesektionen in Paraffin besitzt, beginnt die eigentliche Extraktion in unserem Falle laut dem Protokoll ab Punkt 10. Prinzipiell beruht in dem Fall die Extraktion der DNA auf dem gleichen Verfahren wie bei nicht-fixierten Zellen. Jedoch wird nach der Lysis ein einstündiger Inkubationsschritt bei 90 °C eingefügt, um den Zellaufschluss der fixierten Zellen zu ermöglichen.

Im Anschluss an die Extraktion wurde wiederum mittels *Nano Drop* die DNA-Ausbeute der jeweiligen Produkte gemessen.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultivierung

ACH-2 Zellen

ACH-2 Zellen sind immortalisierte T-Zell Klone, welche nachweislich eine provirale HIV-1 Kopie pro Zellgenom besitzen. Kultiviert wird diese Zellkultur in *RPMI 1640* Zellkulturmedium mit 10 % FBS; das Wachstum erfolgt in Suspension. Das Splitten der Zellen mit Waschen und Mediumwechsel erfolgte zwei Mal pro Woche im Verhältnis 1:5.

C8166 Zellen

C8166 Zellen sind humane Lymphozyten aus dem Blut der Nabelschnur; auch sie sind immortalisiert. In ihrem Genom tragen diese Zellen ein provirales HTLV-1 Genom, welches jedoch inaktiv ist und nicht zur Expression von viralen Partikeln führt. Die Zellkultur wird, ebenso wie die ACH-2 Zellen, in *RPMI 1640* Zellkulturmedium mit 10 % FBS kultiviert und die Zellen wachsen in Suspension. Genau wie die ACH-2 Zellen erfolgte das Splitten der Zellen mit Waschen und Mediumwechsel zwei Mal pro Woche im Verhältnis 1:5.

P815 Zellen

P815 Zellen sind Mastzellen der Hausmaus (*Mus musculus*). Sie wachsen in Suspension und werden kultiviert in *DMEM* Kulturmedium mit 10 % FBS. Das Splitten im Verhältnis 1:5 mit Waschen und Mediumwechsel erfolgte ebenso zwei Mal pro Woche.

PBMC

PBMC sind humane einkernige Zellen des Bluts, wie z.B. Lymphozyten und Monozyten. Kultiviert werden die Zellen in *RPMI 1640* Zellkulturmedium mit 20 % FBS; das Wachstum erfolgt in Suspension. Ebenso ist die Stimulation mittels PHA (5 µg/ml) und IL-2 (180 IU/ml) nach 3 Tagen für das Wachstum der Zellen notwendig. Das Splitten im Verhältnis 1:5 mit Waschen und Mediumwechsel erfolgte ebenso zwei Mal pro Woche.

2.2.2.2 Zellfixierung

Um Zellen zu fixieren wurde nach dem Waschen der Zellen der Überstand zunächst verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 100 - 1000 µl Zellfixierungspuffer (je nach Menge der Zellen) aufgenommen und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Zellen bei 2000 rpm (300 g) für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand ver-

worfen. Die weitere Verwendung und Bearbeitung der Zellen (z.B. DNA-Aufreinigung) konnte dann erfolgen.

2.2.2.3 In vitro-Infektion der PBMC mit HIV-1

Damit die Infektion der PBMC mit HIV-1 ermöglicht werden konnte, mussten die Zellen zunächst einmal stimuliert werden. Dies geschah mithilfe von PHA und IL-2.

Dazu wurden zwei Aliquots à 1 ml Buffy Coat aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad kurz aufgetaut. Anschließend wurden die 2 ml der Zellen in 40 ml Medium (RPMI 1640 mit 20% FBS) gegeben. Zum Waschen der Zellen wurde für 10 min bei 2000 rpm (863 g) zentrifugiert. Währenddessen wurde das Stimulationsmedium vorbereitet. Dazu wurden 50 ml Medium (s.o.) mit 100 µl PHA und 50 µl IL-2 in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand der Zellen verworfen. Von den 50 ml Stimulationsmedium wurden 10 ml abgenommen und zum Resuspendieren des Zellpellets genutzt. Nach erfolgter Resuspension wurden die 10 ml wieder zum Rest des Stimulationsmediums gegeben, das Röhrchen invertiert und der gesamte Inhalt in eine Zellkulturflasche geschüttet. Das Zellwachstum und die Stimulierung erfolgten für 3 Tage bei 37 °C

Nach 3 Tagen wurde die Zellkulturflasche mit den PBMCs aus dem Inkubator entnommen und der Inhalt unter der Sterilbank in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Zum Waschen wurde für 10 min bei 2000 rpm (863 g) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden 500 µl (6×10^5 TCID₅₀) HIV-1_{BAL} zu den Zellen hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 60 min. Nach der Inkubation wurden die Zellen zwei Mal mit Medium gewaschen, um überflüssige Viren zu entfernen. Das Zellpellet wurde im letzten Schritt mit 10 ml Medium resuspendiert und 10 µl IL-2 wurden hinzugegeben (1:1000). Die Zellsuspension wurde umgefüllt in eine Zellkulturflasche und für weitere 7 Tage bei 37 °C im Brutschrank zur Inkubation gelagert. Währenddessen konnte Überstand abgenommen werden, um diesen mittels ELISA auf p24 zu testen. Im Anschluss konnte die DNA-Extraktion der infizierten Zellen erfolgen.

2.2.2.4 Spiken (Versetzen) von Mauszellen bzw. DNA aus Mäusen mit den infizierten PBMC

Durch die Technik der Silica-Säule ist die Aufreinigung von DNA aus geringen Zellzahlen mit dem Verlust von DNA verbunden. Um am Ende der Experimente nach dem Sortieren der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen genügend Zellmaterial pro Subpopulation für die DNA-Aufreinigung bereitstellen zu können, sollten die humanen T-Zellen mit anderen Zellen versetzt werden.

Zum Testen wurden anstatt der T-Zell-Subpopulationen PBMC genutzt, welche als Zellen zum Spiken von Milzzellen bzw. Mastzellen (P815) der Maus verwendet wurden.

Zunächst einmal wurden die Zellen jeweils gezählt. Die PBMC wurden anschließend so eingestellt, dass es möglich war, eine Verdünnungsreihe von 1×10^4 bis 1×10^2 Zellen/ml herzustellen. Zu den einzelnen Verdünnungsstufen der PBMC wurden dann jeweils 5×10^6 Mauszellen gegeben. Es entstanden demnach pro Mauszellenart jeweils drei Proben mit dem folgenden Inhalt:

- 1 1×10^2 Zellen PBMC + 5×10^6 Mauszellen
- 2 1×10^3 Zellen PBMC + 5×10^6 Mauszellen
- 3 1×10^4 Zellen PBMC + 5×10^6 Mauszellen

Die Proben wurden anschließend fixiert und die DNA extrahiert. Sie konnten dann als Templates für die real-time PCR verwendet werden.

2.2.3 Immunbiochemische Methoden

2.2.3.1 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften und Kombinationen an Oberflächenproteinen mittels Fluoreszenz analysieren. Durch das Binden verschiedener fluoreszenzmarkierter Antikörper an Oberflächen- oder auch intrazelluläre Proteine lassen sich verschiedene Zelltypen identifizieren. Über dieses Verfahren können schließlich Gemische verschiedener Zelltypen sortiert werden, was dann als FACS (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung) bezeichnet wird und eine Art der Durchflusszytometrie ist.

Bevor die Durchflusszytometrie gestartet werden kann, müssen Vorbereitungen getroffen werden und die Zellen angefärbt werden.

Buffy Coat Aufreinigung

Um PBMC zu erhalten, wurde vorab der Buffy Coat⁹ einer Blutprobe aufgereinigt. Dazu wurde im ersten Schritt der Buffy Coat 1:2 in PBS verdünnt und vorsichtig auf 15 ml Histopaque im Zentrifugengefäß aufgeschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 2500 rpm (1350 g) für 25 Minuten mit der kleinstmöglichen Brems- bzw. Beschleunigungskraft. Anschließend wurde oberhalb der weißen PBMC-Schicht das PBS bzw. Plasma mithilfe einer Pipette behutsam entfernt, die PBMC-Schicht abgenommen und in ein frisches Zentrifugengefäß gegeben. Der

⁹ = Blutprobe vom Blutspendendienst, aus der der größte Teil der Erythrozyten und des Serums entfernt wurde

Inhalt wurde mit PBS aufgefüllt auf 50 ml und bei 2000 rpm (863 g) für 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 20 ml NH_4Cl (0,84 %) resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 20 min bei 37 °C im Wasserbad, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Nach der Inkubation wurde der Inhalt mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei 2000 rpm (863 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in PBS aufgenommen und erneut auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Um die Blutplättchen zu entfernen, folgte eine Zentrifugation für 12 min bei 200 g. Der Überstand wurde nochmals verworfen und das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gefiltert, um Klumpen zu verhindern. Es folgte die Zählung der Zellen mit dem *Coulter Counter*.

MACS (Magnetic Cell Separation)

Bei der MACS war es wichtig, unter möglichst kalten Bedingungen zu arbeiten. Es wurde eine Menge von 8×10^7 Zellen für die MACS entnommen. Die Zellen wurden für 10 min bei 300 g herunterzentrifugiert und im Anschluss in 320 μl MACS-Puffer resuspendiert. Zu den Zellen wurden dann 80 μl vom *CD4⁺ T-Cell Antibody Cocktail* gegeben; die Ganze wurde gemixt und für 5 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Folgend wurden 240 μl MACS-Puffer und 160 μl des *CD4⁺ T-Cell Microbead Cocktails* hinzugegeben. Der Inhalt wurde gut vermischt und für 10 min zum Inkubieren im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Währenddessen wurde eine LS Säule im MACS Magneten platziert und mit 3 ml MACS-Puffer equilibriert. Die Zellen wurden dann, im Anschluss an die Inkubation bei 4 °C, auf die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Zuletzt wurden erneut 3 ml MACS-Puffer auf die Säule zum Spülen gegeben und in dasselbe Gefäß aufgefangen. Im Gefäß befanden sich nun die angereicherten CD4⁺ Zellen.

FACS-Färbung

Die CD4⁺ Zellen wurden daraufhin für 10 min bei 300 g herunter zentrifugiert, der Überstand vorsichtig verworfen und das Zellpellet in 100 μl FACS-Färbungspuffer aufgenommen. Im folgenden Prozess war es wichtig, die Proben und Materialien möglichst kalt zu halten und sie möglichst wenig Licht auszusetzen. Vorbereitend für die Färbung wurden 11 *Micronic Tubes* beschriftet. In zwei der 11 Gefäße wurden die CD4⁺ Zellen, welche mit dem FACS-Puffer versetzt worden sind, aufgeteilt (ca. 75 μl pro Gefäß) (=Proben C+ und C-). In die verbliebenen neun Gefäße wurde jeweils ein Tropfen der *UltraComp Beads* gegeben (=Proben B6-B14). Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Beads vorher gut resuspendiert worden sind auf dem Vortexer.

Im Anschluss wurden die zwei Pools mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern in zwei Eppendorfgefäßen vorbereitet. Dazu wurden in ein Gefäß (Pool #1) jeweils 7 μl der sechs mit

FITC bzw. Alexa Fluor 488 markierten Antikörper gegeben und gemixt. Der Pool #1 enthielt dann folgende Antikörper:

- Anti-human CD8a FITC
- Anti-human CD14 FITC
- Anti-human CD19 FITC
- Anti-human CD69 FITC
- Anti-human HLA-DR FITC
- Anti-human CD25 Alexa Fluor[®] 488

In das zweite Gefäß wurden 6 µl der folgenden acht fluoreszenzmarkierten Antikörper gegeben und gemixt:

- Anti-human CD4 BV711
- Anti-human CD45RA PE-Cyanine7
- Anti-human CD45RO eFluor 450
- Anti-human CD197 (CCR7) PE
- Anti-human CD62L (L-Selectin) APC-eFluor 780
- Anti-human CD27 Alexa Fluor 700
- Anti-human CD95 (APO-1/Fas) APC
- Anti-human CD122 PerCP-eFluor 710

Vom Antikörper-Pool #1 wurden anschließend 5 µl in das erste Gefäß gegeben, welches Beads enthielt (B6). In die restlichen Beads-enhaltenden Gefäße (B7-14) wurden jeweils 5 µl der einzelnen Antikörper, welche auch in Pool #2 enthalten sind, gegeben.

Pool #1 und Pool #2 wurden dann zusammengeführt und der Mix (70 µl davon) in das erste Gefäß, welches einen Teil der CD4⁺ Zellen enthält, gegeben (C+). In das zweite Gefäß, welches die Zellen enthielt (C-), wurde anstatt der markierten Antikörper FACS-Puffer hinzugegeben (70 µl). Die 11 Gefäße, welche nun gefüllt waren, wurden dann zur Inkubation für 30 min in den Kühlschrank getan.

Nach der Inkubation wurde mithilfe einer Multichannel-Pipette jeweils 1 ml FACS-Puffer in jedes der 11 Gefäße gegeben und das Rack für 5 min bei 2000 rpm (863 g) zentrifugiert. Im Anschluss wurden mithilfe des Vacusafe 95 % der Inhalte der Gefäße abgesaugt und wiederum mit der Multichannel-Pipette 1 ml des FACS-Puffers hinzugegeben und zentrifugiert. Dieser Prozess (FACS-Puffer hinzugeben-Zentrifugieren-Absaugen) wurde insgesamt noch zwei Mal wiederholt. Nach dem letzten Absaugen wurden die Zellen bzw. Beads dann in

jeweils 300 µl Fixierungspuffer gelöst. Nun konnte die FACS Messung und Analyse erfolgen. In Tabelle 6 sind die zu messenden Proben zusammenfassend noch einmal dargestellt.

Tab. 6: Proben für die FACS-Messung

Probenname	Inhalt
C+	CD4 ⁺ Zellen, Antikörper-Mix (Pool #1 + Pool #2)
C-	CD4 ⁺ Zellen, FACS-Puffer
B6	Beads, Pool #1 (FITC-markierte Antikörper)
B7	Beads, Antikörper (AK):CD4, BV711 markiert
B8	Beads, AK: CD45RA, PE-Cyanine7 markiert
B9	Beads, AK: CD45RO, eFluor 450 markiert
B10	Beads, AK: CD197 (CCR7), PE markiert
B11	Beads, AK: CD62L (L-Selectin), APC-eFluor 780 markiert
B12	Beads, AK: CD27, Alexa Fluor 700 markiert
B13	Beads, AK: CD95, APC markiert
B14	Beads, AK: CD122, PerCP-eFluor 710 markiert

Die Messung erfolgte am „BD LSR II Flow Cytometer“ von *BD Biosciences*, wobei zu beachten war, dass ein Filterwechsel erfolgte (710-550 anstatt 685-40 (PerCP Kanal)). Die Analyse wurde mit dem Programm „FlowJo“ durchgeführt.

2.2.3.2 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Der ELISA ist eines der wichtigsten immunbiochemischen Verfahren zum Nachweis von Antikörpern. Der Nachweis ist dabei basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion der Enzymgekoppelten Antikörper.

P24 Capture ELISA

Der p24 Antigen Capture ELISA dient dem Nachweis des Gag-Antigens des HI-Virus.

Im ersten Schritt musste die 96-Well Platte mit dem monoklonalen Antikörper AG 3.0 beschichtet werden. Da die Produktion des Antikörpers intern erfolgt, wird jedes Mal die jeweils beste Konzentration zur Beschichtung mit einem Antigenstandard ausgetestet. Für die Beschichtung der Platte wurde der Antikörper in diesem Fall in 5 ml Karbonat/Bikarbonat-Puffer verdünnt und in jedes Well 50 µl davon gegeben. Die Platte wurde zur Inkubation über Nacht im Kühlschrank (4 °C) gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde die Platte mithilfe des „Skan Washer 300“ gewaschen. Anschließend wurden die verbliebenen Bindungsstellen auf der

Platte blockiert, indem auf jedes Well 100 µl Blockierungspuffer¹⁰ gegeben wurden und die Platte für ca. 30 min bei 37 °C inkubierte.

Nach der Inkubation wurde die Platte abermals gewaschen und die Proben (inaktiviertes Virus) aufgetragen. Dazu wurde auf der Platte eine Verdünnungsreihe mit Puffer hergestellt. Es folgte wieder die Inkubation der Platte bei 37 °C für 30-60 min. Während der Inkubationszeit wurden die sekundären Antikörper vorbereitet, welches bei HIV-1 ein HIV-1⁺ Plasma Pool war. Die sekundären Antikörper (5 ml) wurden 1:10000 in Assay-Puffer¹¹ verdünnt und das Ganze gut vermischt.

Im Anschluss an die Inkubation wurde die Platte erneut gewaschen. Dann wurden die sekundären Antikörper hinzugefügt (50 µl/Well) und die Platte wieder für 30 min bei 37 °C zur Inkubation gelagert. Inzwischen wurde das Konjugat vorbereitet, welches aus dem Assay-Puffer und anti-humanen IgG HRPO Konjugat (1:1000) hergestellt wurde. Nach der Inkubation wurde die Platte wieder gewaschen und anschließend das Konjugat hinzugefügt (50 µl/Well). Die Platte inkubierte dann wieder bei 37 °C für 30 min. Während der Inkubationszeit wurde die Substratlösung vorbereitet. Dazu wurde vorweg unter Rühren Citrat-Puffer hergestellt. Hinzugefügt zu der Lösung wurde dann eine OPD Tablette (60 mg). Nach dem Auflösen der Tablette wurden dann 40 µl H₂O₂ (30 %) hinzugefügt und das Ganze gemischt.

Nach der Inkubation der Platte wurde diese gewaschen und die Substratlösung hinzugegeben (50 µl/Well). Bei Raumtemperatur inkubierte die Platte für weitere 5-10 min, bevor die Färbereaktion mit 25 % H₂SO₄ gestoppt wurde (20 µl/well).

Anschließend wurden die Proben mittels „Tecan Sunrise“-Reader gemessen¹² und analysiert.

¹⁰ PBS + 2 % Milchpulver

¹¹ PBS + 2 % Milchpulver + 0,2 % Tween 20

¹² Wellenlänge: 492 nm, Referenz-Wellenlänge: 620 nm

3 Ergebnisse

3.1 Validierung einer real-time PCR zur Quantifizierung der zellulären HIV-1 Proviruslast

Im Rahmen einer vorhergehenden Arbeit wurde eine von Malnati et al. publizierte Methode (18) zur Detektion proviraler HIV-Genome getestet.¹³ Die Methode dient der Quantifizierung der Proviren aller Subtypen von HIV-1 und beruht auf zwei quantitativen real-time PCR Assays. Dabei diente eine CCR5-spezifische real-time PCR der Quantifizierung der gesamten Zellgenome anhand eines „single-copy“ Gens und eine HIV-1-spezifische real-time PCR der Quantifizierung der proviralen HIV-Genome in den Zellen.

Im Einzelnen wurde zu Beginn aus humanen PBMC ein Fragment aus dem CCR5-Gen amplifiziert, in einen Vektor kloniert und in kompetente Zellen transformiert. Über eine Sequenzierung und Restriktionsanalyse wurde der Erfolg dessen bestätigt. Anschließend wurde das gewünschte Plasmid herauspräpariert und eine Plasmid-Standardreihe für die real-time PCR angefertigt (=CCR5-Plasmidstandardreihe). In einer Test-PCR lief diese Standardreihe optimal, weshalb beschlossen wurde, sie für alle folgenden Experimente zu verwenden. Mithilfe einer gegebenen HIV-Plasmidstandardreihe (pNL4-3 in H₂O) wurde zum Abschluss dieser Arbeit die Proviruslast infizierter PBMC gemessen und zusammen mit der CCR5-spezifischen real-time PCR war es dann möglich, das Verhältnis der Gesamtzellzahl zu den infizierten Zellen zu messen und zu berechnen.

Da die Reproduzierbarkeit der publizierten Methode damit bestätigt wurde, wurde für alle folgenden Experimente (real-time PCRs) die Verwendung dieser beiden Standardreihen festgelegt.

3.2 Optimierung der HIV-spezifischen real-time PCR

Da zukünftig mithilfe von real-time PCR Proben HIV-positiver Patienten getestet werden, sollte zuvor geprüft werden, wie sich eine HIV-Standardreihe mit zellulärer DNA im Hintergrund bei der qPCR verhält und ob diese vergleichbar gut läuft wie die Standardreihe in H₂O. Dazu wurde, zusätzlich zur pNL4-3 Standardreihe in H₂O, eine Standardreihe in DNA-Background (genauer: C8166-DNA) hergestellt.

¹³ Die einzelnen Methoden dieses Prozesses wurden in dieser Arbeit nicht aufgeführt; der Abschnitt dient nur der Vollständigkeit.

Für den DNA-Background wurde zunächst die DNA aus C8166-Zellen, eine Zelllinie humaner Lymphocyten, aufgereinigt. Bei der Messung der DNA-Konzentration mittels NanoDrop® - Spektrophotometer wurde die isolierte DNA dreifach gemessen und der Mittelwert als Richtwert angenommen (Tab. 7).

Tab. 7: Ergebnisse der Messung der DNA-Konzentration

Probe	DNA-Konzentration (ng/μl)	260/280 (Reinheit)	Mittelwert der Konzentration (ng/μl)
C8166-DNA 1	139,31	1,98	129
C8166-DNA 2	122,43	1,94	
C8166-DNA 3	125,57	2,00	

Die DNA wurde anschließend auf 60 ng/μl eingestellt, um einen geringeren Background zu erreichen, denn es wird erwartet, dass die zukünftig zu messenden Proben geringe Zellzahlen aufweisen.

Die beiden vorhandenen Standardreihen (pNL4-3 in H₂O und pNL4-3 in 60 ng/μl C8166-DNA) wurden dann in einer real-time PCR untereinander verglichen. Pro Reaktion wurden dabei 5 μl jedes Templates eingesetzt und es ergab sich bei beiden Standardreihen eine Kopienanzahl von jeweils 5×10^6 bis 5×10^{-1} Kopien pro Reaktion. Als Negativkontrollen dienten H₂O und C8166-DNA.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der qPCR (Mittelwerte der C_T-Werte) aufgeführt.

Tab. 8: CT-Werte der qPCR mit den beiden pNL4-3-Standardreihen (=HIV-spezifisch)

Standardreihe	Probe	C _T -Wert	Standardabweichung
pNL4-3 in H ₂ O	pNL4-3 (5 x 10 ⁶ Kopien)	17,92	0,42
	pNL4-3 (5 x 10 ⁵ Kopien)	21,61	0,29
	pNL4-3 (5 x 10 ⁴ Kopien)	24,76	0,05
	pNL4-3 (5 x 10 ³ Kopien)	28,37	0,15
	pNL4-3 (500 Kopien)	31,72	0,15
	pNL4-3 (50 Kopien)	35,65	0,61
	pNL4-3 (5 Kopien)	40,61	-
	pNL4-3 (0,5 Kopien)	0	0
	NTC (H ₂ O)	0	0
pNL4-3 in C8166-DNA	pNL4-3 (5 x 10 ⁶ Kopien)	16,54	0,17
	pNL4-3 (5 x 10 ⁵ Kopien)	19,91	0,14

pNL4-3 (5 x 10 ⁴ Kopien)	23,2	0,25
pNL4-3 (5 x 10 ³ Kopien)	26,67	0,11
pNL4-3 (500 Kopien)	30,08	0,12
pNL4-3 (50 Kopien)	33,35	0,24
pNL4-3 (5 Kopien)	36,25	0,36
pNL4-3 (0,5 Kopien)	38,29	2,87
NTC (C8166-DNA)	0	0

Die Ergebnisse zeigen einen steigenden C_T-Wert mit abfallender Menge an pNL4-3-Kopien in der Template-DNA. Aus den Standardabweichungen ist ersichtlich, dass es innerhalb der drei Proben für die Dreifach-Bestimmung nur zu sehr geringen Abweichungen kam.

Die aus den oben dargestellten Werten erstellten Standardkurven sind in Abbildung 8 und 9 dargestellt.

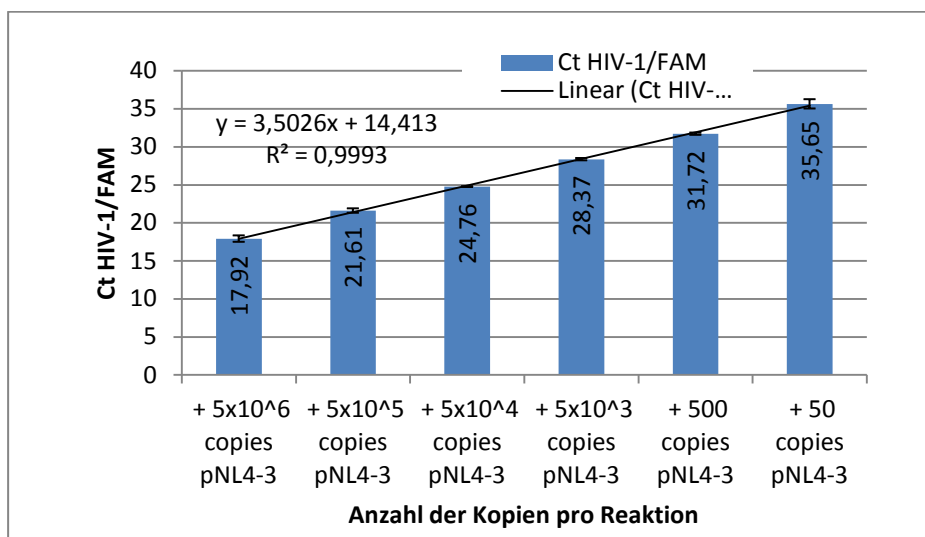


Abb. 8: C_T-Werte und Standardkurve der real-time PCR mit der pNL4-3-Standardreihe in H₂O

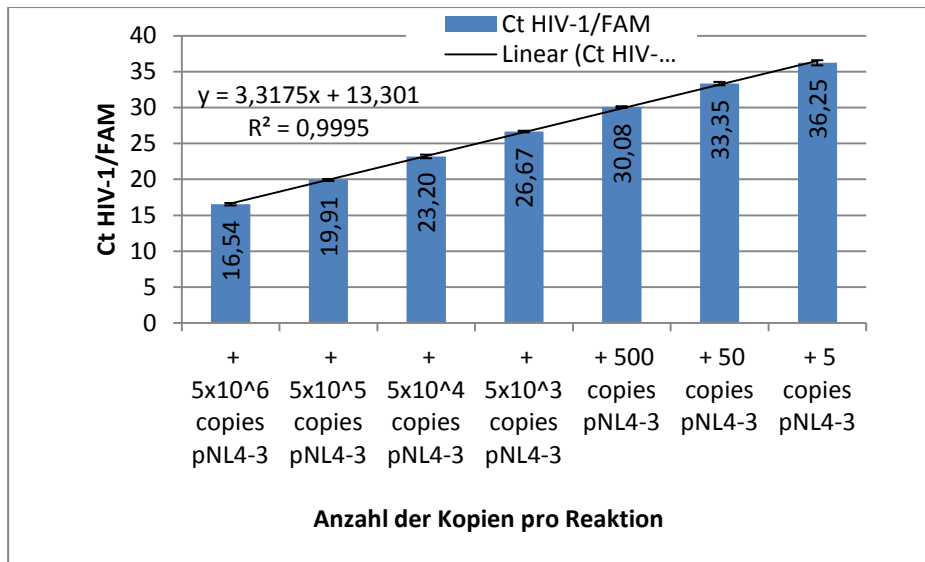


Abb. 9: C_T-Werte und Standardkurve der real-time PCR mit der pNL4-3 Standardreihe in C8166-DNA

Die Steigung der pNL4-3 Standardkurve in H₂O beträgt 3,5, die der Standardkurve in DNA-Background beträgt 3,2. Die Effizienz beträgt laut dem Programm *MxPro* bei der Standardkurve in H₂O 93,1 % mit einem R²-Wert von 0,998, bei der Standardkurve mit DNA-Background liegt die Effizienz bei 101,9 % mit einem R²-Wert von 0,996.

Bei der Standardreihe in H₂O Background wurde die letzte Stufe (5 Kopien) nicht mehr in die Standardkurve mit einbezogen, da keine verlässliche Amplifizierung dieser Werte erfolgte.

Es lässt sich nun sagen, dass die Standardreihe in DNA Background besser läuft als die Standardreihe in H₂O, weshalb erstere nun vorrangig in geeigneten real-time PCRs eingesetzt werden kann.

3.3 Testen der Sensitivität der HIV-spezifischen real-time PCR

Um die weitere Sensitivität der real-time PCR mit den gegebenen Standardreihen zu testen, wurden Zellen verwendet, die nachweislich nur eine integrierte HIV-Kopie pro Zellgenom besitzen; sogenannte ACH-2 Zellen. Aus diesen Zellen wurde zunächst die DNA isoliert und daraus eine geeignete Verdünnungsreihe in H₂O hergestellt, welche dann als Templates für die anschließende real-time PCR diente.

Die isolierte DNA hatte eine Konzentration von 218,7 ng/μl und wurde eingestellt auf 132 ng/μl (da 660 ng in 5 μl benötigt wurden), um daraus die Verdünnungsreihe von 10⁵ bis 10⁻² Kopien ACH-2/μl herzustellen.

Die ACH-2 Verdünnungsreihe wurde in der CCR5- und der HIV-1-spezifischen real-time PCR getestet. Als Standardreihe in der HIV-spezifischen real-time PCR diente die Standardreihe in

H₂O. Als Negativkontrolle wurde in beiden PCRs H₂O eingesetzt. In Tabelle 9 und 10 sind die Ergebnisse (Mittelwerte der C_T-Werte) der CCR5-spezifischen bzw. der HIV-spezifischen real-time PCR aufgeführt.

Tab. 9: C_T -Werte der HIV-spezifischen qPCR mit der ACH-2 Verdünnungsreihe als unbekannte Proben

Probe	C _T -Wert	Standardabweichung
pNL4-3/H ₂ O (5x10 ⁶)	17,83	0,14
pNL4-3/H ₂ O (5x10 ⁵)	21,59	0,06
pNL4-3/H ₂ O (5x10 ⁴)	24,9	0,02
pNL4-3/H ₂ O (5x10 ³)	28,45	0,09
pNL4-3/H ₂ O (5x10 ²)	32,04	0,18
pNL4-3/H ₂ O (5x10 ¹)	35,36	0,1
pNL4-3/H ₂ O (5x10 ⁰)	39,42	0,92
ACH-2/H ₂ O (5x10 ⁵)	23,94	0,09
ACH-2/H ₂ O (5x10 ⁴)	27,0	0,11
ACH-2/H ₂ O (5x10 ³)	30,59	0,13
ACH-2/H ₂ O (5x10 ²)	34,05	0,21
ACH-2/H ₂ O (5x10 ¹)	37,74	0,28
ACH-2/H ₂ O (5x10 ⁰)	42,21	-
NTC (H ₂ O)	0	0

Tab. 10: C_T-Werte der CCR5-spezifischen qPCR mit der ACH-2 Verdünnungsreihe als unbekannte Proben

Probe	C _T -Wert	Standardabweichung
pCCR5/H ₂ O (1,4x10 ⁷)	15,72	0,06
pCCR5/H ₂ O (1,4x10 ⁶)	19,23	0,16
pCCR5/H ₂ O (1,4x10 ⁵)	22,53	0,20
pCCR5/H ₂ O (1,4x10 ⁴)	25,83	0,13
pCCR5/H ₂ O (1,4x10 ³)	29,06	0,15
pCCR5/H ₂ O (1,4x10 ²)	32,89	0,20
pCCR5/H ₂ O (1,4x10 ¹)	36,44	0,61
pCCR5/H ₂ O (1,4x10 ⁰)	38,87	0,12
ACH-2/H ₂ O (5x10 ⁵)	22,48	0,04
ACH-2/H ₂ O (5x10 ⁴)	25,76	0,13
ACH-2/H ₂ O (5x10 ³)	29,36	0,29

ACH-2/H ₂ O (5x10 ²)	32,65	0,44
ACH-2/H ₂ O (5x10 ¹)	36,73	0,98
ACH-2/H ₂ O (5x10 ⁰)	39,45	1,73
NTC (H ₂ O)	0	0

Als Referenz für die unbekanntes Proben diene jeweils die dazugehörige Standardkurve. An den Daten ist wiederum zu sehen, dass der C_T-Wert mit sinkender Kopienanzahl steigt. Bei der HIV-spezifischen qPCR fällt auf, dass die Unbekannten nur bis zu einer Stufe von etwa 50 Kopien gut amplifiziert werden. Bei der CCR5-spezifischen qPCR werden die Unbekannten bis zur Stufe von 0,5 Kopien amplifiziert.

In Abbildung 10 und 11 sind die Standardkurven der beiden Standardreihen jeweils dargestellt. Abbildung 12 und 13 zeigen die unbekanntes Proben (ACH-2 Verdünnungsreihe) in der jeweiligen qPCR.

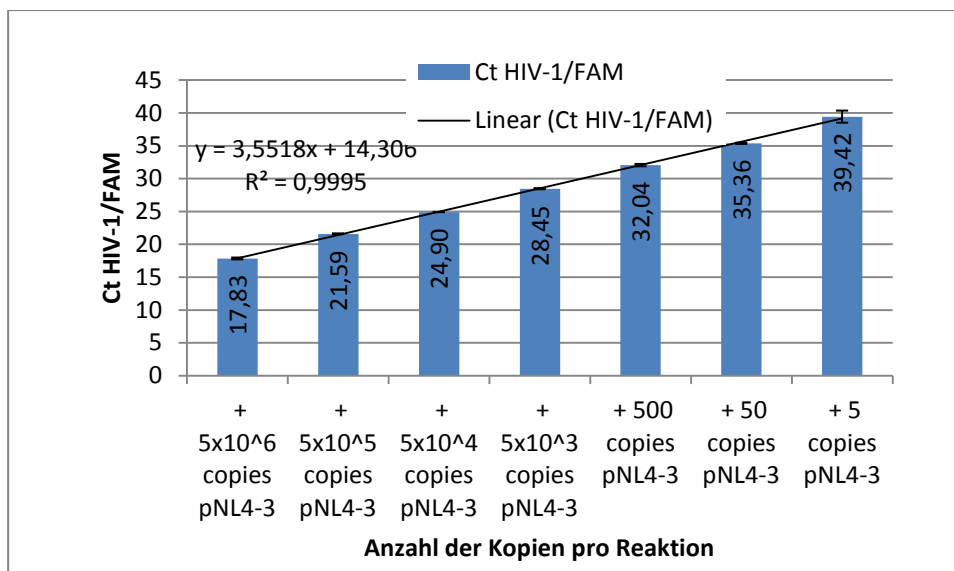


Abb. 10: CT-Werte und Standardkurve der HIV-1-spezifischen real-time PCR (pNL4-3 Standardreihe)

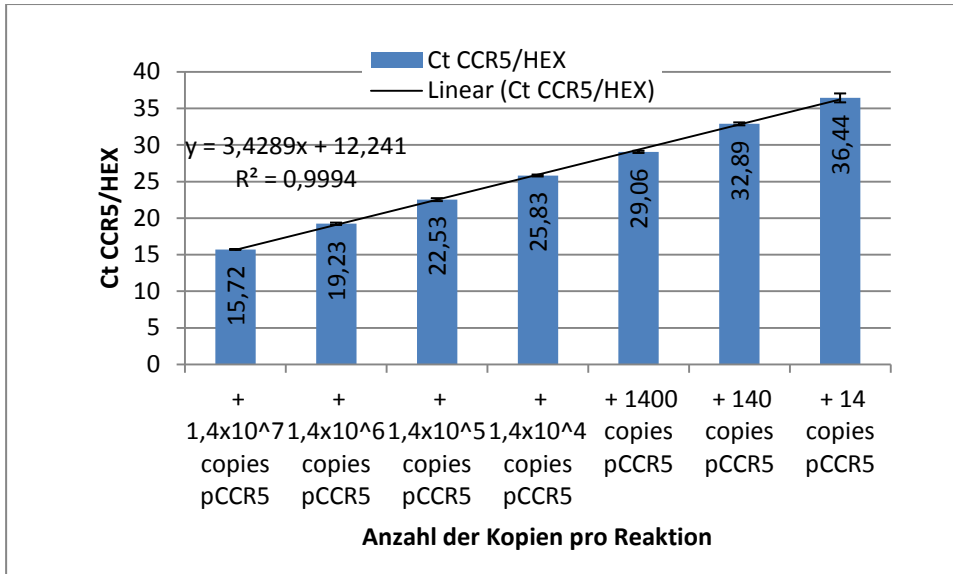


Abb. 11: C_T-Werte und Standardkurve der CCR5-spezifischen real-time PCR

Bei der pNL4-3 Standardkurve beträgt die Steigung 3,2 und die Effizienz beträgt laut dem Programm *MxPro* 105 % mit einem R²-Wert von 0,977. Die CCR5-Plasmidstandardkurve hat eine Steigung von 3,4 und eine Effizienz von 98,4 % mit einem R²-Wert von 0,999.

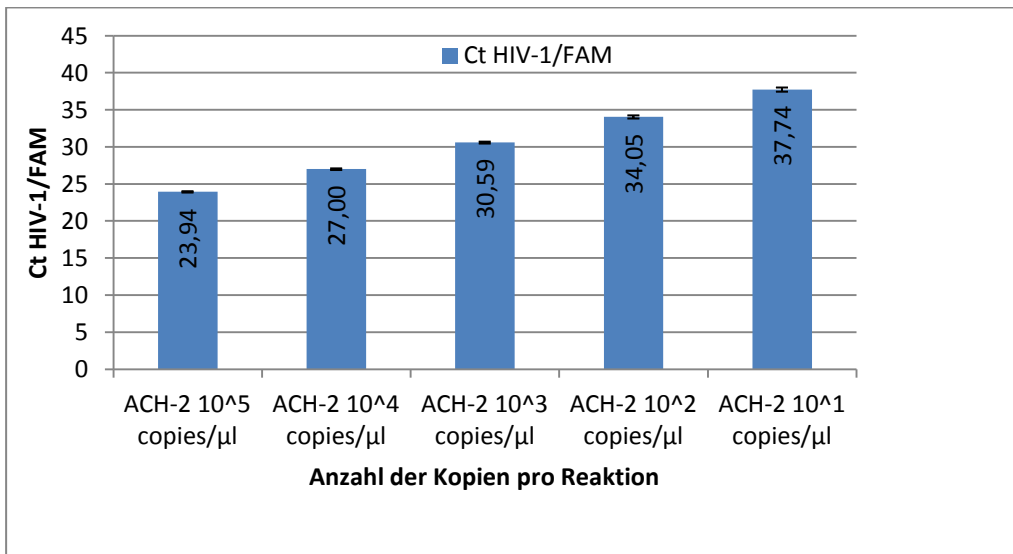


Abb. 12: C_T-Werte der Proben der ACH-2 Verdünnungsreihe in der HIV-spezifischen qPCR

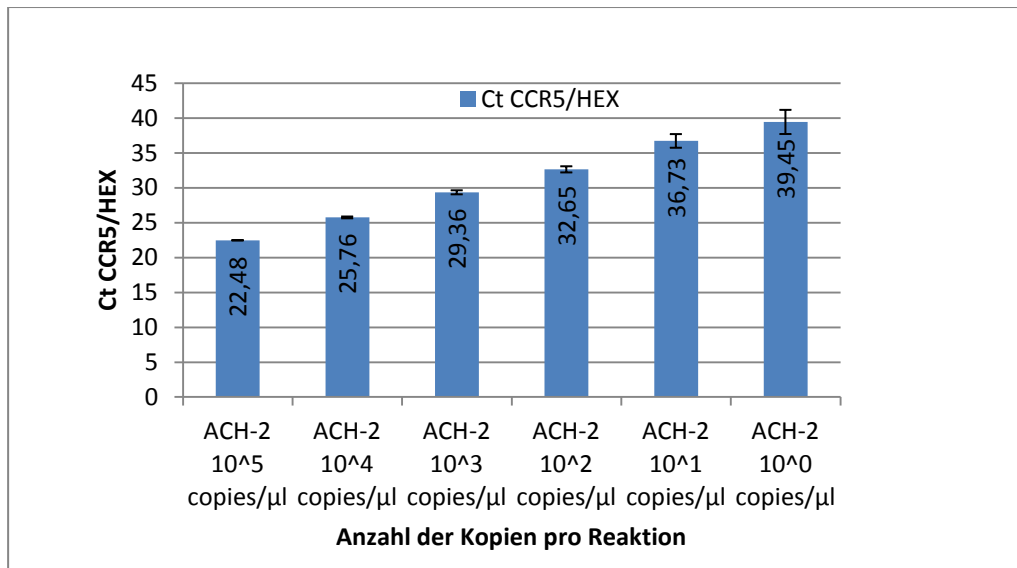


Abb. 13: C_T-Werte der Proben der ACH-2 Verdünnungsreihe in der CCR5-spezifischen qPCR

In Abbildung 12 wurden von den Proben der Verdünnungsreihe nur die Proben mit einbezogen bis zur Stufe von 10 Kopien/μl, da eine weitere Amplifizierung nicht möglich war. In der CCR5-spezifischen qPCR (Abb. 13) war die Amplifizierung bis zur Stufe von 1 Kopie/μl erreichbar.

Mithilfe des *MxPro*-Programms war es möglich, über die Werte der Standardreihe die anfängliche Menge der unbekanntes Templates zu berechnen. Diese Werte sind in Tabelle 11 zu sehen.

Tab. 11: eingesetzte Template-Menge der unbekanntes Proben der qPCR (dargestellt nur bis zur Probe mit theoretisch 5 Kopien ACH-2 DNA)

Probe	Berechnete Templatemenge der Zellgenome (/2)	Berechnete Templatemenge der proviralen HIV-Genome
ACH-2 (5x10 ⁵)	$1,45 \times 10^5 / 2 = 7,25 \times 10^4$	$1,04 \times 10^5$
ACH-2 (5x10 ⁴)	$1,53 \times 10^4 / 2 = 7,65 \times 10^3$	$1,16 \times 10^4$
ACH-2 (5x10 ³)	$1,3 \times 10^3 / 2 = 650$	878
ACH-2 (5x10 ²)	$1,37 \times 10^2 / 2 = 68,5$	73,3
ACH-2 (5x10 ¹)	$8,34 / 2 = 4,17$	5,21
ACH-2 (5x10 ⁰)	$1,29 / 2 = 0,645$	0,21

3.4 Durchflusszytometrie

Voraussetzung für das Sortieren der CD4⁺ Zellen in Subpopulationen ist zunächst einmal eine Analyse der Zellen und ein erfolgreiches *Gating* zur Identifizierung der Subpopulationen. Zu

diesem Zweck wurden die Proben, welche zuvor mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt wurden¹⁴, mit dem „LSR II Flow Cytometer“ gemessen und mit der „FlowJo“-Software analysiert.

Nach der Messung wurde von der BD-Software eine Kompensation durchgeführt, um die Emission eines Farbstoffs in andere Kanäle zu verhindern und zu korrigieren. Die Kompensationsrate lag dabei bei allen Farbstoffen unter 50 % (Abbildung der Kompensationskontrollen siehe Anhang 1).

Die Analyse der Daten erfolgte mithilfe einer Gating-Strategie, welche (u.a.) von Prof. Y. Taoufik¹⁵ entworfen wurde. Dieses Gating-Schema beruht auf der unterschiedlichen Expression von Oberflächenmarkern in den verschiedenen T-Zell-Subpopulationen, sodass diese in der Theorie voneinander unterschieden werden, was eine Voraussetzung für das Sortieren der Zellen ist. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der Zellanalyse nach dem Gating.

¹⁴ Siehe Abschnitt 2.2.3.1

¹⁵ Prof. Y. Taoufik, Service d'Immunologie Biologique, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Frankreich; Schema bereitgestellt als persönliche Mitteilung

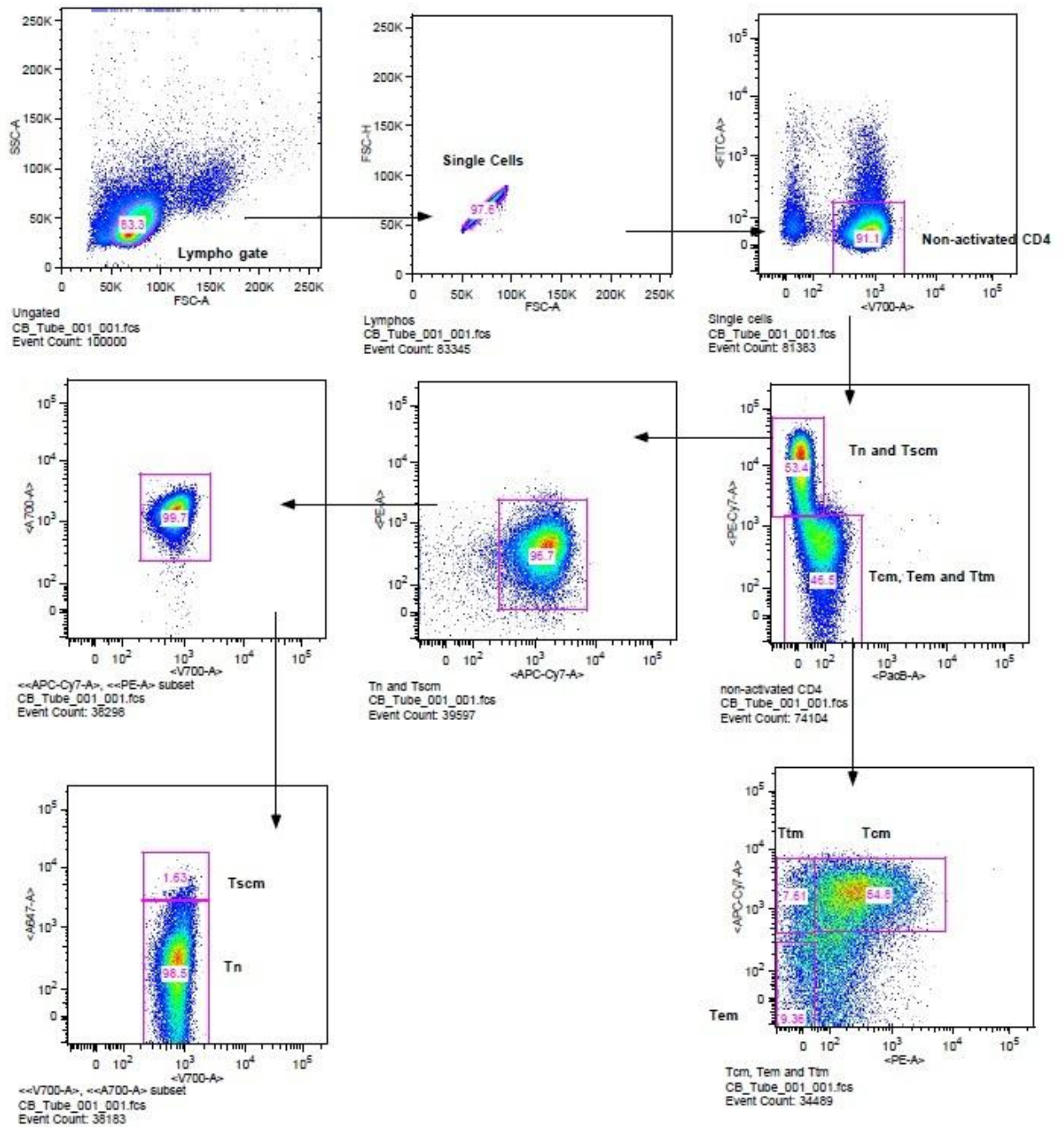


Abb. 14: Ergebnis der Analyse der Daten nach der Durchflusszytometrie. Die farbigen Zahlen innerhalb der einzelnen Populationen geben den Prozentsatz der jeweiligen Population zur Gesamtzellzahl an. Unter jeder Grafik steht an unterster Stelle jeweils die genaue gemessene Zellzahl der gesamten Population. In den beiden unteren Plots sieht man die Auftrennung der fünf verschiedenen T-Zell-Subpopulationen (T_{SCM} , T_N , T_{EM} , T_{CM} , T_{TM})

Für das Sortieren könnten anschließend dieselben Proben benutzt werden wie für die reine Zellanalyse.

3.5 Aufarbeitung der FACS-Proben für die real-time PCR

Damit sich die Proben der sortierten Zellsubpopulationen für die real-time PCR eignen, müssen gewisse Voraussetzungen erfüllt sein und bestimmte Eigenschaften getestet werden.

Zunächst einmal musste bedacht werden, dass sich fixierte Zellen sowohl in der DNA-Extraktion als auch in der PCR anders verhalten als nicht-fixierte Zellen. Da die Zellen bei der FACS-Färbung fixiert wurden, musste dieser Sachverhalt geprüft werden und eventuell eine Lösung gefunden werden.

Des Weiteren musste getestet werden, ob und inwiefern sich geringe Zellzahlen (wie die einer Zellsubpopulation nach dem Sortieren; z.B. T_{SCM}-Zellen: nur 1,6 % von 38.000 Zellen (siehe Abbildung 14 unten)) für die DNA-Extraktion und die PCR eignen. Es wurde weiterhin das Spiken (Versetzen) von Mauszellen mit diesen Zellen geprüft.

3.5.1 Umgang mit fixierten Zellen

Um im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausreichend DNA-Material aus fixierten Zellen erhalten zu können, musste zunächst einmal getestet werden, inwieweit sich die Zellfixierung auf die DNA-Isolierung und die real-time PCR auswirkt. Dazu wurden vorab Zellen (ACH-2 und C8166) fixiert und die DNA isoliert (mit dem DNA-Extraktions-Kit für nicht-fixierte Zellen¹⁶). Gleichzeitig wurde zum Vergleich aus nicht-fixierten Zellen DNA isoliert. Dabei wurde jeweils immer die gleiche Menge an Zellen und die gleiche Art für die DNA Isolation verwendet, um einen direkten Vergleich zu haben. Anschließend wurde die DNA-Konzentration beider Proben gemessen und miteinander verglichen. Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der Messung der DNA-Konzentration mittels Spektrophotometer.

Tab. 12: Ergebnisse der Messung der DNA-Konzentration (Dreifachbestimmung und Mittelwerte)¹⁷

Probe	DNA-Konzentration (ng/μl)	260/280 (Reinheit)	Mittelwert der Konzentration (ng/μl)
DNA (aus 90 % fixierten ACH-2 und 10 % C8166 Zellen)	16,69	1,76	16,7
	16,37	2,26	
	16,99	2,05	
DNA (aus 90 % nicht-fixierten ACH-2 und	199,89	1,99	193,8
	179,10	1,98	

¹⁶ QIAamp DNA Blood Mini Kit von QIAGEN

¹⁷ Dargestellt sind hier aus einer Verdünnungsreihe jeweils nur eine Probe, exemplarisch

10 % C8166 Zellen)	202,39	1,97
--------------------	--------	------

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich ein deutlicher Unterschied in der DNA Konzentration zwischen isolierter DNA aus fixierten und nicht-fixierten Zellen erkennen.

Aufgrund der Tatsache, dass die DNA Isolation fixierter Zellen mit dem DNA-Extraktionskit für nicht-fixierte Zellen¹⁸ mit einem sehr hohen Verlust an DNA-Menge einhergeht, sollte nun ein weiteres DNA-Extraktionskit, welches für formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe bestimmt ist¹⁹, getestet werden. Dazu wurden wieder verschiedene Zellarten (ACH-2 und C8166 Zellen) fixiert und die DNA isoliert mittels dieses neuen Kits. Zusätzlich dazu wurde aus den gleichen Zellen auch nicht-fixiert die DNA isoliert (mit dem Kit für nicht-fixierte Zellen²⁰). Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration der Proben gemessen. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse der Messung (dargestellt sind hier aus je 10 Proben jeweils nur 2 davon; die Ergebnisse der anderen Proben entsprechen diesen).

Tab. 13: Ergebnisse der Messung der DNA-Konzentration (Dreifachbestimmung und Mittelwerte)²¹

Probe	DNA-Konzentration (ng/μl)	260/280 (Reinheit)	Mittelwert der Konzentration (ng/μl)
DNA aus ACH-2 Zellen (fixiert)	158,01	2,06	157,2
	156,47	2,03	
DNA aus ACH-2 und C8166 Zellen (fixiert)	129,86	2,05	130,1
	130,43	2,07	
DNA aus ACH-2 Zellen (nicht-fixiert)	161,19	1,98	158,7
	156,30	1,98	
DNA aus ACH-2 und C8166 Zellen (nicht-fixiert)	156,11	1,97	158,4
	160,78	1,98	

Nach der DNA-Isolierung mit dem neuen Kit lässt sich anhand der DNA-Konzentrationen im Vergleich kein großer Unterschied mehr feststellen.

Nun sollten die DNA Proben aus den fixierten Zellen in einer real-time PCR getestet werden um zu überprüfen, ob es Komplikationen bei der Amplifikation hervorgerufen durch die DNA-

¹⁸ QIAamp DNA Blood Mini Kit von *QIAGEN*

¹⁹ QIAamp DNA FFPE Tissue Kit von *QIAGEN*

²⁰ QIAamp DNA Blood Mini Kit von *QIAGEN*

²¹ Dargestellt sind hier aus einer Verdünnungsreihe jeweils nur 2 exemplarische Proben; die Werte der anderen Proben sind hierbei nicht wichtig, da sie allesamt die gleiche Aussage bestätigen

Isolation gibt. Getestet wurden die Proben dabei nur in der CCR5-spezifischen real-time PCR, da eine Quantifizierung der Zellgenome ausreichte, um eine Aussage treffen zu können. Als Unbekannte dienten hierbei ACH-2 DNA-Proben, welche in verschiedenen Verhältnissen mit C8166-DNA versetzt waren und allesamt auf 85 ng/µl eingestellt wurden; als Negativkontrolle diente H₂O. In Tabelle 14 sind die Templatemengen der Samples, welche vom *MxPro*-Programm berechnet wurden, dargestellt.

Tab. 14: eingesetzte Template-Menge der unbekanntenen Proben der qPCR. (Die Proben wurden hier der Einfachheit halber von 1 bis 10 benannt, dabei wurden in Probe 1 ursprünglich 5×10^6 ACH-2 Zellen eingesetzt, in Probe 2 5×10^5 ACH-2 Zellen + $4,5 \times 10^6$ C8166-Zellen, Probe 3 5×10^4 ACH-2 Zellen + $4,95 \times 10^6$ C8166 Zellen usw.)

Probe	Berechnete Templatemenge der Zellgenome (/2)
ACH-2 1	$5,7 \times 10^4 / 2 = 2,85 \times 10^4$
ACH-2 2	$2,21 \times 10^4 / 2 = 1,1 \times 10^4$
ACH-2 3	$2,62 \times 10^4 / 2 = 1,31 \times 10^4$
ACH-2 4	$2,4 \times 10^4 / 2 = 1,2 \times 10^4$
ACH-2 5	$2,18 \times 10^4 / 2 = 1,09 \times 10^4$
ACH-2 6	$2,41 \times 10^4 / 2 = 1,2 \times 10^4$
ACH-2 7	$2,6 \times 10^4 / 2 = 1,3 \times 10^4$
ACH-2 8	$2,27 \times 10^4 / 2 = 1,135 \times 10^4$
ACH-2 9	$2,16 \times 10^4 / 2 = 1,08 \times 10^4$
ACH-2 10	$2 \times 10^4 / 2 = 1 \times 10^4$

Aus der vorher gemessenen DNA-Menge wurde ein theoretischer Soll-Wert für die Proben errechnet: $85 \frac{ng}{\mu l} \times 5 \mu l = 425 ng \rightarrow 425 ng \div 0,0066 ng = 64.394 \text{ Kopien} = 6,4 \times 10^4 \text{ Kopien}$.²²

Die real-time PCR wurde wiederholt mit den Proben der nicht-fixierten Zellen. Die einzelnen Werte sind hier nicht dargestellt; durchschnittlich betrug die berechnete Templatemenge $5,86 \times 10^4$ Kopien. Es besteht also ein Unterschied in der berechneten Templatemenge zwischen Proben aus fixierten und nicht-fixierten Zellen bzw. zwischen den beiden DNA-Isolationsmethoden. Im Gegensatz zur real-time PCR mit der DNA aus nicht-fixierten Zellen ergibt die real-time Messung der DNA aus fixierten Zellen nicht die theoretisch eingesetzte Menge an Zellgenomen.

Um nun herauszufinden, woran der Verlust der Templatemengen bei den Proben aus fixierter DNA liegt, wurde eine festgelegte Menge an pNL4-3 (10^4 Kopien) mit DNA versetzt (jeweils

²² Die 0,0066 ng stehen für das Gewicht eines humanen diploiden Genoms (6,6 pg)

einmal mit DNA aus fixierten und nicht-fixierten C8166-Zellen) und in einer real-time PCR mit pNL4-3 Standardreihe (in DNA-Background) getestet. Tabelle 15 zeigt die C_T -Werte und die berechneten Templatemengen der beiden Proben.

Tab. 15: C_T -Werte und berechnete Templatemenge der mit fixierter und nicht-fixierter DNA versetzten Proben in der real-time PCR (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)

Probe	C_T -Wert	Berechnete Templatemenge der HIV-1-Genome	Soll-Templatemenge
pNL4-3 in C8166 DNA (fixiert)	26,59	$3,9 \times 10^3$ Kopien	1×10^4 Kopien pNL4-3
pNL4-3 in C8166 DNA (nicht-fixiert)	25,21	$1,18 \times 10^4$ Kopien	

Vergleicht man den Wert der fixierten Probe mit dem Soll-Wert, so fällt auf, dass kein Unterschied besteht. Es sind also keine inhibitorischen Stoffe bei der DNA-Isolation mittels des Kits für fixierte Zellen entstanden.

3.5.2 DNA-Isolation aus geringen Zellzahlen und Versetzen der humanen Zellen mit murinen Zellen

Nachdem die Eigenschaften und der Umgang mit fixierten Zellen und deren DNA untersucht wurden, sollte nun getestet werden, inwiefern aus geringen Zellzahlen DNA isoliert und diese dann unter Umständen in einer real-time PCR getestet werden kann. Eingesetzt für diese Versuche wurden mit HIV *in vitro* infizierte PBMC.

Bevor dies untersucht werden konnte, sollte zuerst einmal die Infektionsrate der infizierten PBMC ermittelt werden. Dazu wurde aus 5×10^6 fixierten Zellen die DNA isoliert und in der real-time PCR (CCR5-spezifisch und HIV-1-spezifisch) getestet. Im Ergebnis zeigten sich bei der CCR5-spezifischen real-time PCR 5×10^4 Zellgenom-Kopien, die ermittelt wurden. Weiterhin wurden bei der HIV-spezifischen real-time PCR $9,7 \times 10^3$ HIV-Genome errechnet. Dies ergab einen Anteil von etwa 19 % infizierter Zellen zur Gesamtzellzahl, welcher theoretisch auch bei geringen Zellzahlen festzustellen sein sollte.

Parallel dazu wurde mittels ELISA die Qualität der Infektion der PBMC getestet. Abbildung 15 zeigt die Standardkurve des p24 ELISA.

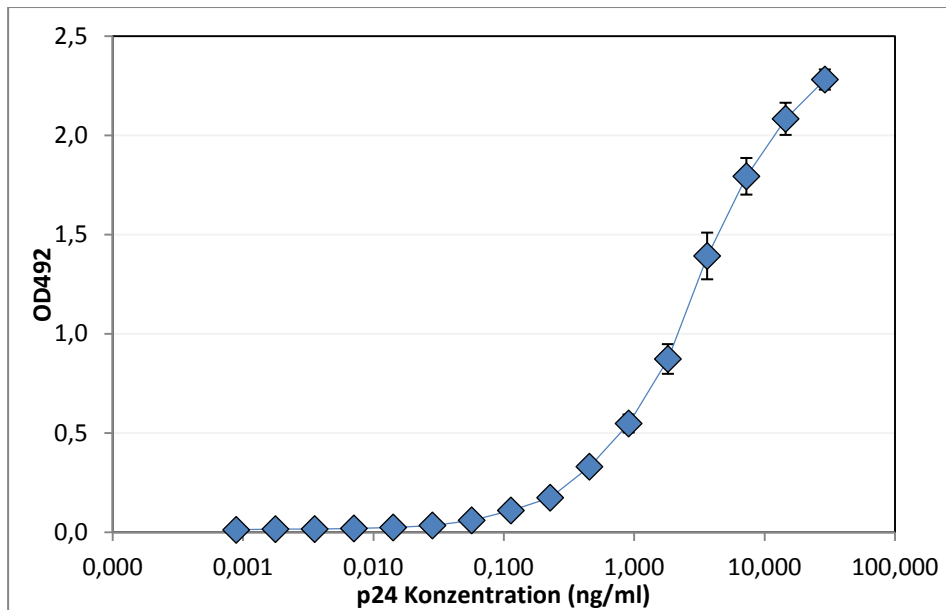


Abb. 15: Standardkurve des p24 ELISA. Auf der Y-Achse ist die Extinktion (bei 492 nm) dargestellt; auf der X-Achse ist die Konzentration von p24 dargestellt (berechnet aus der Anfangskonzentration des inaktivierten Virus (291 ng/ml) / Verdünnungsstufe)

Zusätzlich dazu wurden Überstände der infizierten PBMC nach 4 und nach 7 Tagen gemessen. In Abbildung 16 sind die Diagramme der beiden Messungen dargestellt.²³

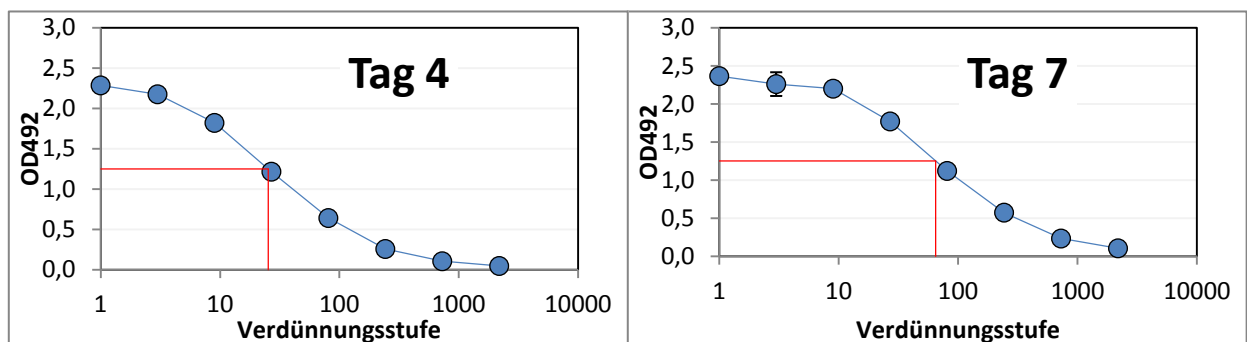


Abb. 16: p24 Konzentration der infizierten PBMC nach 4 und nach 7 Tagen. Die rote Linie zeigt den gewählten Cut Off bei OD 1,25 (Y-Achse) und die berechnete dazugehörige Verdünnungsstufe auf der X-Achse.

Mithilfe der aus dem Cut Off (OD 1,25) berechneten Verdünnungsstufen (bei Tag 4: 25,337; bei Tag 7: 65) konnte jeweils die p24 Konzentration an diesen Punkten berechnet werden. Daraus ergab sich an Tag 4 der Infektion eine p24 Konzentration im Überstand von ca. 80 ng/ml und an Tag 7 eine Konzentration von etwa 206 ng/ml.²⁴ Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Infektion der PBMC mit HIV-1 erfolgreich verlief.

²³ Der Cut Off wurde bei OD 1,25 gesetzt; mithilfe der Formel der logarithmischen Standardreihe (hier nicht aufgeführt) wurde die p24 Konzentration (ng/ml) für den Wert bei 1,25 mit 3,1661 ng/ml berechnet.

²⁴ Also $25,337 \times 3,1661 \text{ ng/ml} = 80,22 \text{ ng/ml}$ und $65 \times 3,1661 \text{ ng/ml} = 205,8 \text{ ng/ml}$

Im Anschluss an diese Versuche wurden von den fixierten PBMC 1000 Zellen abgenommen und daraus mittels Kit die DNA isoliert. Es folgte die Messung der DNA-Konzentration mittels NanoDrop Spektrophotometer, bei welcher sich negative Werte als Ergebnisse zeigten.

Da keine ausreichende Menge an DNA in der Probe gemessen wurde, wurde auf das Testen der Probe in einer real-time PCR verzichtet.

Stattdessen wurde nun versucht, die humanen Zellen mit murinen Zellen zu versetzen, um eine Erhöhung der Effizienz der DNA Isolierung zu erreichen. Damit in folgenden Experimenten bei der CCR5-spezifischen real-time PCR kein Signal von den Zellen, mit denen die Probe versetzt werden sollte, entsteht, wurden zunächst einmal zwei potentielle DNA-Proben (DNA aus Maus-Milzzellen und aus Schweine-PBMC) in der real-time PCR auf das CCR5 Gen getestet. Eingesetzt wurden die beiden Proben dreifach; als Negativkontrolle diente H₂O (bi-dist.). In Abbildung 17 sind die Fluoreszenzkurven der Amplifikationen der Proben zu sehen.

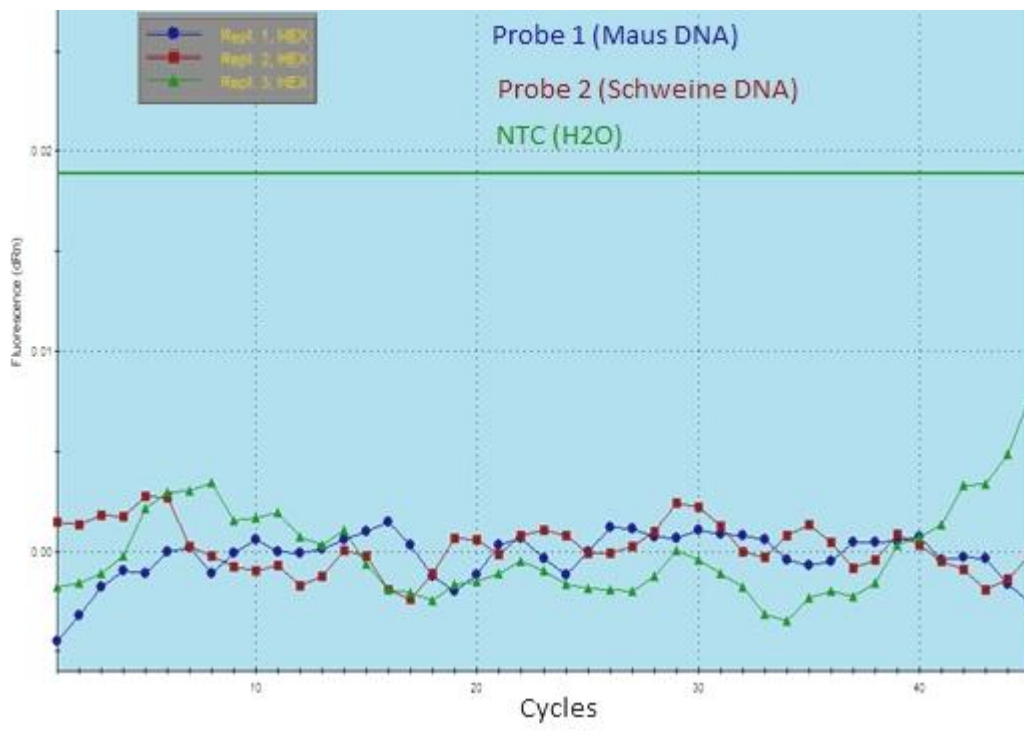


Abb. 17: Fluoreszenzkurven der Amplifikationen der qPCR mit der CCR5-Plasmid-Standardreihe

Zusätzlich zur real-time PCR wurde die Maus DNA erneut dreifach in einer konventionellen PCR getestet, um sicherzugehen, dass die CCR5 Primer nicht an die DNA binden. Eingesetzt wurden dabei 10 µl der DNA; als Negativkontrolle diente H₂O (bi-dist.). Die Auswertung erfolgte über ein Agarosegel, welches elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Abbildung 18 zeigt das Agarosegel.

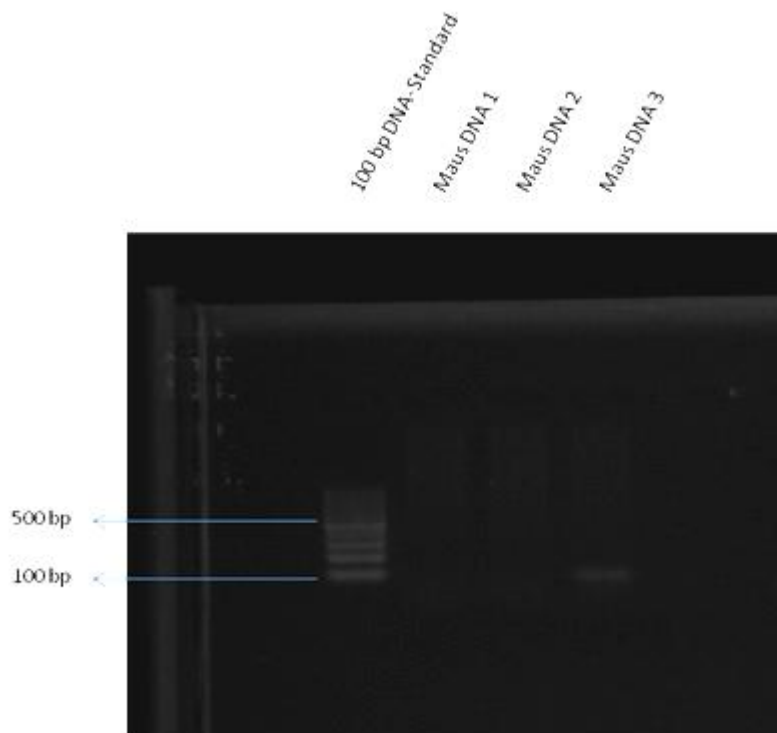


Abb. 18: Gelbild des Agarosegels zur Auswertung der PCR zum Test der Maus-DNA auf CCR5

Das Gel zeigt hierbei links den 100 bp DNA-Standard. An letzter Stelle ist eine schwache Bande bei ca. 100 bp erkennbar. Bei den beiden anderen Proben der murinen DNA ist keine Bande erkennbar.

Im Anschluss erfolgte das Spiken (Versetzen) der murinen Zellen mit den humanen Zellen. Dazu wurde aus den fixierten PBMC eine Verdünnungsreihe von 1×10^4 bis 1×10^2 Zellen pro Milliliter hergestellt. Diese drei Proben wurden dann mit jeweils 5×10^6 fixierten murinen Zellen versetzt. Es folgte die DNA Isolierung der Proben. In Tabelle 16 sind die DNA-Konzentrationen der Proben aufgeführt.

Tab. 16: Ergebnisse der Messung der DNA Konzentration der drei mit murinen Zellen versetzten Proben

Probe	DNA-Konzentration (ng/ μ l)	260/280 (Reinheit)	Mittelwert der Konzentration (ng/ μ l)
Inf. PBMC (10^4) + Maus-DNA	56,43	2,09	56,5
	56,27	2,06	
	56,98	2,05	
Inf. PBMC (10^3) + Maus-DNA	45,70	2,09	46,2
	46,21	2,04	
	46,78	2,05	

	36,72	1,95	
Inf. PBMC (10^2) + Maus-DNA	36,89	2,13	36,7
	36,66	2,07	

Die drei Proben wurden anschließend in die real-time PCR eingesetzt und auf HIV-1 und CCR5 getestet. Dabei wurden jeweils 10 µl des Templates eingesetzt (also 565 ng, 462 ng und 367 ng). Als Negativkontrolle diente H₂O (bi-dest.), als HIV-spezifische Standardreihe wurde wieder die pNL4-3 Standardreihe in DNA Background benutzt. In Tabelle 17 sind die C_T-Werte der Proben in den beiden qPCR-Assays aufgeführt.

Tab. 17: C_T-Werte der Proben der CCR5- und der HIV-1-spezifischen real-time PCR (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)

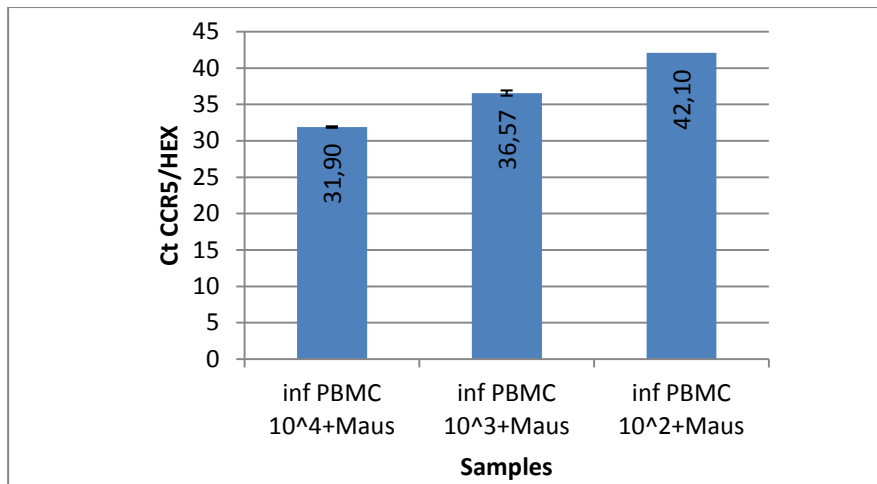
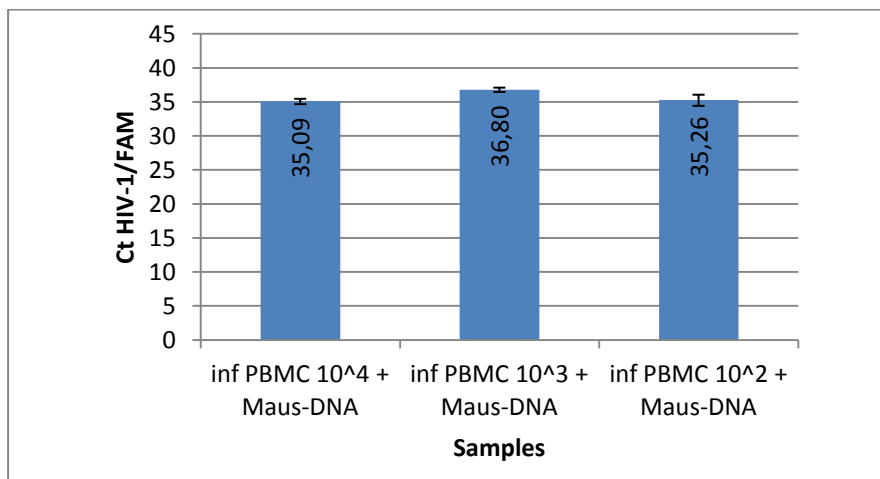
Probe	CCR5-spez. qPCR		HIV-1-spez. qPCR	
	C _T -Wert	Standardabweichung	C _T -Wert	Standardabweichung
Inf. PBMC (10^4) + Maus-DNA	31,9	0,1	35,09	0,39
Inf. PBMC (10^3) + Maus-DNA	36,57	0,36	36,8	0,32
Inf. PBMC (10^2) + Maus-DNA	42,1	-	35,26	0,82
NTC	0	0	0	0

Dazu wurden folgende Templatemengen von der *MxPro* Software berechnet:

Tab. 18: berechnete Templatemengen der drei Proben in beiden qPCR Assays

Probe	CCR5-spez. qPCR	HIV-1-spez. qPCR
	Templatemenge	Templatemenge
Inf. PBMC (10^4) + Maus-DNA	61,5 Kopien	25,4 Kopien
Inf. PBMC (10^3) + Maus-DNA	2,5 Kopien	7,63 Kopien
Inf. PBMC (10^2) + Maus-DNA	0,05 Kopien	22,6 Kopien

In den Abbildungen 19 und 20 sind noch einmal die C_T-Werte der Samples dargestellt.

Abb. 19: C_T-Werte und Standardabweichungen der Proben in der CCR5-spezifischen qPCRAbb. 20: C_T-Werte und Standardabweichungen der Proben in der HIV-1-spezifischen qPCR

Das ganze Experiment, also das Versetzen der infizierten fixierten PBMC mit murinen Zellen, die DNA Isolierung und die real-time PCR Assays, wurden anschließend mit einer anderen Zellsorte von Mäusen (P815 Zellen, Mastzellen der Maus, immortalisierte Zelllinie) wiederholt.

Bei der Messung der DNA-Konzentration ergaben sich folgende Werte:

Tab. 19: Ergebnisse der Messung der DNA Konzentration der drei mit murinen Zellen (P815) versetzten Proben

Probe	DNA-Konzentration (ng/μl)	260/280 (Reinheit)	Mittelwert der Konzentration (ng/μl)
Inf. PBMC (10 ⁴) + P815-DNA	174,81	2,14	177
	174,64	2,09	
Inf. PBMC (10 ³) + P815-DNA	181,57	2,12	276
	258,45	2,14	
	295,96	2,06	

	272,74	2,11	
	317,78	2,12	
Inf. PBMC (10 ²) + P815-DNA	325,22	2,11	326
	336,71	2,12	

Anschließend wurden wiederum jeweils 10 µl des Templates in die real-time PCR Assays (CCR5-spezifisch und HIV-1-spezifisch) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente H₂O (bi-dest.). In Tabelle 20 sind die C_T-Werte der Proben in den beiden qPCR-Assays aufgeführt.

Tab. 20: C_T-Werte der Proben der CCR5- und der HIV-1-spezifischen real-time PCR (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)

Probe	CCR5-spez. qPCR		HIV-1-spez. qPCR	
	C _T -Wert	Standardabweichung	C _T -Wert	Standardabweichung
Inf. PBMC (10 ⁴) + P815-DNA	37,81	0,73	36,47	0,71
Inf. PBMC (10 ³) + P815-DNA	40,71	0,47	38,62	-
Inf. PBMC (10 ²) + P815-DNA	44,57	-	0	-
NTC	0	0	0	0

Von der *MxPro* Software wurden dazu folgende Templatemengen berechnet:

Tab. 21: berechnete Templatemengen der drei Proben in beiden qPCR Assays

Probe	CCR5-spez. qPCR	HIV-1-spez. qPCR
	Templatemenge	Templatemenge
Inf. PBMC (10 ⁴) + P815-DNA	2,47 Kopien	4,45 Kopien
Inf. PBMC (10 ³) + P815-DNA	0,34 Kopien	0,93 Kopien
Inf. PBMC (10 ²) + P815-DNA	0,024 Kopien	0 Kopien

In den Abbildungen 21 und 22 sind die C_T-Werte der Proben dargestellt.

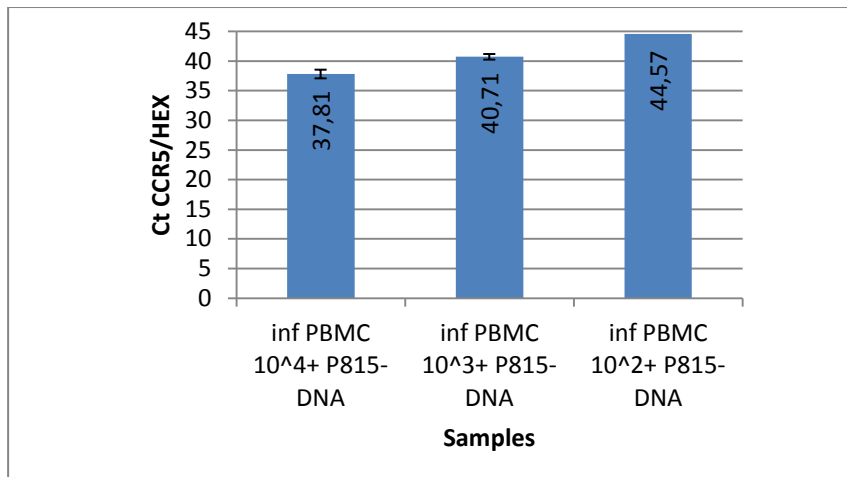


Abb. 21: C_T-Werte und Standardabweichungen der Proben in der CCR5-spezifischen qPCR

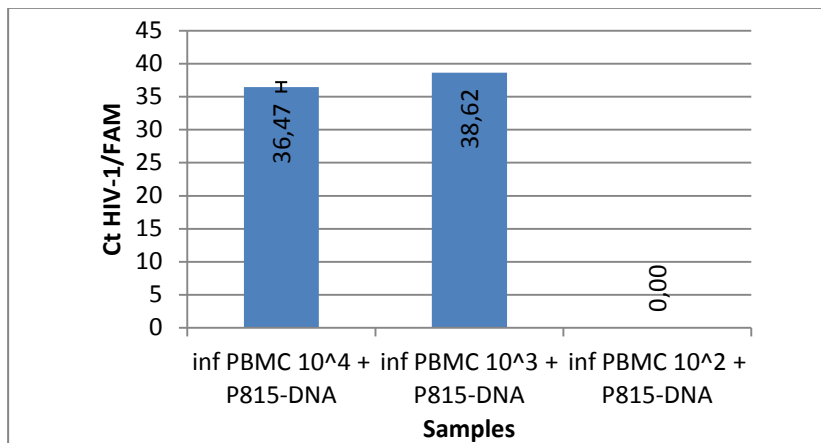


Abb. 22: C_T-Werte und Standardabweichungen der Proben in der HIV-1-spezifischen qPCR

3.6 Duplex PCR

Um den gesamten Prozess effizienter zu gestalten, d.h. an Zeit, Material und Templatemengen zu sparen, gibt es die Möglichkeit, die beiden real-time PCR Assays im Duplex-Format durchzuführen. Dazu wurden die beiden Plasmid-Standardreihen (die CCR5- und die pNL4-3 Standardreihe in H₂O) in eine real-time PCR eingesetzt, in deren Mastermix zuvor die Primer und Sonden für HIV-1 und CCR5 gegeben wurden. Als Negativkontrolle diente H₂O (bi-dist.). In Tabelle 22 sind die C_T-Werte der beiden Standardreihen angegeben.

Tab. 22: C_T-Werte der CCR5- und der pNL4-3 Standardreihe in der Duplex PCR

CCR5-Plasmid-Standardreihe			pNL4-3 Standardreihe (in H ₂ O)		
Probe	C _T -Wert	Standardabweichung	Probe	C _T -Wert	Standardabweichung
1,4x10 ⁷	13,31	0,12	5x10 ⁶	15,32	0,2
1,4x10 ⁶	16,97	0,10	5x10 ⁵	18,64	0,17
1,4x10 ⁵	19,12	0,21	5x10 ⁴	22,04	0,17
1,4x10 ⁴	23,43	0,19	5x10 ³	25,36	0,15
1,4x10 ³	26,66	0,21	5x10 ²	28,98	0,09
1,4x10 ²	30,38	0,17	5x10 ¹	32,64	0,35
1,4x10 ¹	33,09	0,21	5x10 ⁰	36,24	2,12
1,4x10 ⁰	36,96	1,79	5x10 ⁻¹	0	0
NTC (H ₂ O)	0	0	NTC (H ₂ O)	0	0

Erkennbar ist, dass in jeder Standardreihe der C_T-Wert mit abfallender Kopienzahl steigt. Die Negativkontrolle ist negativ. Laut dem *MxPro* Programm beträgt die Amplifikationseffizienz der HIV-1-spezifischen Standardkurve 93,6 % mit einem R² = 1,0; die Standardkurve hat dabei eine Steigung von 3,48. Die Effizienz der CCR5-spezifischen Standardreihe beträgt gleichzeitig 96,8 % mit einem R² = 1,0; dabei hat die Standardkurve eine Steigung von 3,4. In den Abbildungen 23 und 24 sind die C_T-Werte und Standardkurven der beiden Plasmid-Standardreihen dargestellt.

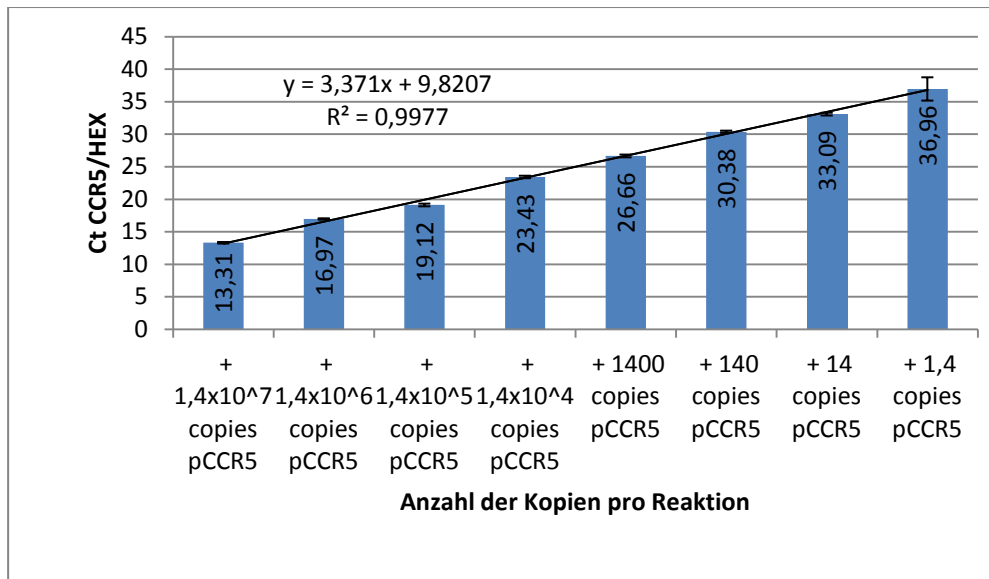


Abb. 23: C_T-Werte und Standardkurve der CCR5-Plasmid-Standardreihe in der Duplex PCR

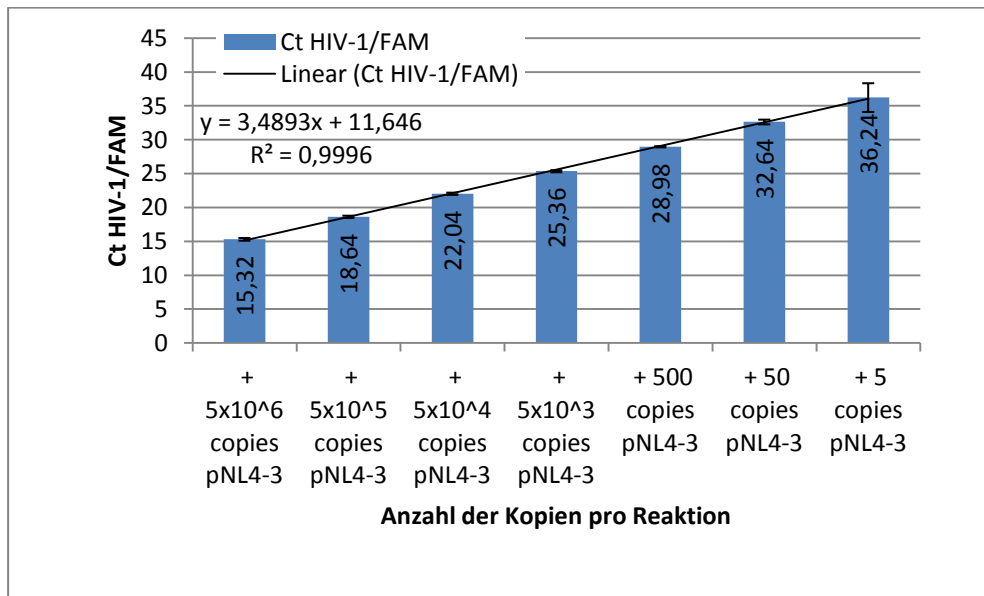


Abb. 24: CT-Werte und Standardkurve der pNL4-3-Standardreihe in der Duplex PCR

Vergleicht man nun die Werte der Standardkurven (Effizienz) der Duplex-PCR mit denen einer Single-PCR (CCR5-spez.: 98,4 %; HIV-1-spez.: 105 %²⁵), so lässt sich sagen, dass diese sich von der Effizienz her nicht groß unterscheiden.

²⁵ Vgl. S. 37

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie zu identifizieren, um diese im weiteren Verlauf sortieren zu können. Des Weiteren sollte eine geeignete Nachweis- und Quantifizierungsmethode für HIV-1 (zwei real-time PCR Assays) getestet und optimiert werden.

4.1 Optimierung der HIV-spezifischen real-time PCR

Um die HIV-spezifische real-time PCR zu optimieren wurde eine pNL4-3 Standardreihe in C8166-DNA Background hergestellt, welche im Anschluss mit der zuvor verwendeten Standardreihe (in H₂O Background) in einer qPCR verglichen wurde. Der Grund, humane zelluläre DNA als Background der Standardreihe zu benutzen liegt darin, dass in Zukunft zu testende Proben HIV positiver Patienten ebenso humane DNA mit HIV als Target wären. Es soll somit getestet werden, ob sich die Effizienz der Amplifikation in der real-time PCR zwischen HIV-1 (=pNL4-3) in H₂O und HIV-1 in zellulärer DNA unterscheiden. Denn theoretisch könnte der Fall eintreten, dass Primer durch die DNA im Background abgefangen werden (d.h. an die DNA binden), womit sich die Amplifikationseffizienz dieser qPCR verschlechtern würde. Ob dies tatsächlich so ist, sollte damit getestet werden.

Die zentrale Größe bei der real-time PCR ist der sogenannte C_T-Wert (*cycle threshold*), welcher angibt, bei welchem Zyklus sich das Fluoreszenzsignal deutlich von der zu definierenden Grenze über dem Hintergrund (*threshold*) abhebt. Er ist umgekehrt proportional zur anfänglichen Templatemenge (25).

Schaut man sich die C_T-Werte der beiden Standardreihen an (s. Tab. 8, S.32), so lässt sich auf den ersten Blick feststellen, dass beide vergleichbar gut amplifiziert wurden. Bei der Standardreihe in DNA Background ist, verglichen mit der Standardreihe in H₂O Background, die Amplifizierung geringerer Kopienzahlen besser gelungen, d.h. besser nachweisbar. Bei der Standardreihe in H₂O war eine verlässliche Amplifizierung nur bis zur Stufe von 50 Kopien nachweisbar; in der nächsten Stufe der Standardreihe (5 Kopien/5 µl) wurde lediglich eine von drei Proben amplifiziert, was bedeutet, dass in diesem Falle die Standardreihe in DNA Background eine bessere Sensitivität bezüglich proviraler HIV-Kopien bietet. Üblicherweise hängt die Sensitivität eines Setups nicht mit der Zusammensetzung des Backgrounds zusammen; in diesem Fall könnte es jedoch mit der besseren Verteilung der Plasmide im Reaktionsgefäß zusammenhängen, dass die Sensitivität bei der Standardreihe mit DNA-Background etwas besser ist als die der Standardreihe in H₂O.

Vergleicht man nun die beiden Standardreihen bezüglich ihrer Werte der Standardkurven, so lässt sich auch dort feststellen, dass die Standardreihe in DNA Background etwas bessere Werte zeigt. In Tabelle 23 sind zum Vergleich die Werte der beiden Standardkurven und die Werte einer optimalen Standardkurve dargestellt.

Tab. 23: Werte der beiden Standardkurven mit den Werten einer optimalen Standardkurve

	Standardkurve in H ₂ O	Standardkurve in C8166-DNA	Optimale Standardkurve
Steigung	3,5	3,2	3,32
Amplifikationseffizienz	93,1 %	101,9 %	100 %
R ² Wert	0,998	0,996	1,0

Die Effizienz der Standardkurve in DNA Background liegt im Rahmen einer optimalen Effizienz bei einer qPCR (95 – 105 %), die Effizienz der Standardkurve in H₂O weicht etwas davon ab. Auch die Steigungen der beiden Standardkurven liegen nahe am optimalen Wert (3,32), wobei jedoch die Steigung der Standardkurve in DNA näher daran liegt.

Theoretisch verdoppelt sich die Menge der PCR Produkte während jedes Zyklus der exponentiellen Amplifikation²⁶. Das bedeutet, dass im Idealfall mit jedem Zyklus die Anzahl der DNA-Kopien um das Zweifache ansteigt. Mithilfe dieses Faktors 2 als Amplifikationseffizienz (E) lässt sich über die Formel $E = 10^{-1/Steigung}$ die optimale Steigung berechnen.⁽¹⁸⁾ Die 10 steht dabei für den Verdünnungsfaktor der Verdünnungsreihe (bzw. Standardreihe). Setzt man für E den Faktor 2 ein, so ergibt sich durch umstellen der Formel eine optimale Steigung von 3,32 bzw. -3,32.

Die prozentuale Amplifikationseffizienz wird berechnet durch die folgende Formel: $\%Effizienz = (E - 1) \times 100\%$. Dieser Wert gibt an, wie viel Prozent der Templates pro Zyklus amplifiziert werden. Für eine ideale Reaktion setzt man hierbei wieder für E den Faktor 2 ein, dann ergibt sich folgende Formel: $\%Effizienz = (2 - 1) \times 100\% = 100\%$ (18).²⁷

Da die pNL4-3 Standardreihe in DNA Background zum Einen gute Ergebnisse in der Test-qPCR zeigt und zum Anderen realistischere Bedingungen im Bezug auf HIV-Infektionen und –Reservoirs bietet, wurde hiermit festgelegt, dass diese in geeigneten real-time PCRs eingesetzt werden kann.

Parallel zur Optimierung der Standardreihe wurde die Sensitivität der HIV-spezifischen real-time PCR getestet, indem eine Verdünnungsreihe von Zellen in die qPCR eingesetzt wurde, in

²⁶ „Real-Time PCR Applications Guide“ von *Bio-Rad*

²⁷ Siehe dazu auch: www.gene-quantification.de/efficiency.html

deren Genom laut Literatur genau ein provirales HIV-Genom integriert ist (ACH-2)²⁸. Mit der pNL4-3 Standardreihe (in H₂O) wurde diese Verdünnungsreihe auf HIV getestet, gleichzeitig wurde in einer weiteren CCR5-spezifischen qPCR die Anzahl der Zellgenome detektiert.

Die Ergebnisse (s. Tab.9+10, S.34-35) zeigen zuerst einmal, dass bei beiden Standardreihen eine gute Amplifizierung erfolgte. Dies ist die Voraussetzung für eine verlässliche Amplifizierung der unbekannt Proben (der ACH-2 Verdünnungsreihe). Auch die Amplifizierung der ACH-2 Verdünnungsreihe erfolgte in den beiden qPCR-Assays problemlos bis zum 40. Zyklus; dort wurde die Nachweisgrenze gesetzt.

Mit zunehmender Zyklenzahl kann bei der real-time PCR davon ausgegangen werden, dass sich unspezifische Amplifikationen oder Sonden-Hydrolyse bemerkbar machen. Erfahrungsgemäß sind somit Signale innerhalb der letzten fünf Zyklen nicht zu verwerten.

Mithilfe der Standardreihen konnten die Kopienzahlen der Templates durch die *MxPro*-Software berechnet werden (s. Tab. 11, S.37). So wurden in den Proben der ersten Verdünnungsstufe der ACH-2 Verdünnungsreihe in der CCR5-spezifischen qPCR 145.000 Kopien berechnet. Diese 145.000 Kopien gelten für ein diploides Genom. Da jedoch das Referenzgen CCR5 einmal pro haploidem Genom vorhanden ist, wird dieser Wert, um die korrekte Anzahl der Zellgenome zu erhalten, durch zwei geteilt. Damit ergibt sich eine Anzahl von 72.500 Zellgenomen in der ersten Verdünnungsstufe. Mithilfe der HIV-spezifischen Standardreihe wurde gleichfalls die Anzahl der proviralen HIV-Genome berechnet, diese lag bei 104.000 Kopien; das sind 1,4-mal so viele Kopien wie Zellgenom-Kopien (Faktor 1,4). Würde in den qPCR-Assays eine Sensitivität von 100 % vorhanden sein, so müssten theoretisch die Kopienzahlen der Zellgenome mit denen der proviralen HIV-Genome übereinstimmen, denn in der Theorie sollte in einem Zellgenom jeweils genau eine HIV-Kopie enthalten sein. In diesem Experiment korrelieren die Werte ebenso, sie schwanken jedoch zwischen Faktoren von 1,0 bis 1,5. Dies kann manuellen Ungenauigkeiten beim Pipettieren sowie beim Herstellen der Verdünnungsreihe zugeschrieben werden. Im Allgemeinen lässt sich jedoch sagen, dass die Sensitivität der HIV-1-spezifischen qPCR (diese liegt hier bei 5 Kopien/Reaktion) gut ist und für die Quantifizierung proviraler HIV-Genome ausreicht. Auch in der Literatur wird die Sensitivität als ausreichend beschrieben. Laut einer Publikation von Véronique et al. (26) wird von einer Detektionsgrenze bei 6 HIV-Kopien pro Reaktion gesprochen, was vergleichbar mit unseren Werten ist.

Wäre es erwünscht, eine höhere Sensitivität zu erreichen, so könnten bei Bedarf und ausreichendem Sample-Material auch mehrere Replikate (>3) in die real-time PCR eingesetzt werden. So ließen sich eventuell auch geringere Kopienzahlen pro Reaktion nachweisen.

²⁸ Laut www.aidsreagent.org

4.2 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich unterschiedlichste Zellen aufgrund der verschiedenen Kombinationen von Oberflächenproteinen identifizieren und charakterisieren, indem sie mit verschiedenen fluoreszenz-markierten Antikörpern angefärbt werden. Eine sehr spezifische Identifikation ist dabei möglich, da viele verschiedene Kombinationen von Antikörpern eingesetzt werden können (27). Das macht die Durchflusszytometrie (bzw. FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) zum Mittel der Wahl bei Analysen von Zellen. Nicht nur zur Analyse sondern auch zum Sortieren einzelner Zellpopulationen eignet sich diese Methode hervorragend. Denn spezielle Geräte (FACS-Sorter) besitzen die Fähigkeit, reine Zellpopulationen aus unterschiedlichen Gates herauszugeben und somit verschiedene Zellpopulationen anhand ihrer unterschiedlichen Eigenschaften zu sortieren.

Auch im Zuge dieser Arbeit konnten mithilfe der Durchflusszytometrie (mit dem LSR II) verschiedene T-Zell-Subpopulationen charakterisiert und identifiziert werden. Schaut man sich in Abbildung 14 (s. S.39) die beiden unteren Fluoreszenz-Plots an, so sieht man die fünf verschiedenen Subpopulationen der T-Zellen und jeweils deren Anteil an der Gesamtpopulation, die im Gate gemessen wurde. Die T_{SCM}-Zellen haben dabei den geringsten Anteil, es wurden nur etwa 600 Zellen (1,6 % von der Gesamtpopulation (38183 Zellen)) identifiziert. Mithilfe des von Prof. Y. Taoufik²⁹ entwickelten Gating-Schemas konnte demnach ein erfolgreiches Gating der Subpopulationen stattfinden.

Da die meisten Fluoreszenzfarbstoffe ein Spektrum von Farben und nicht nur eine Farbe ausstrahlen, kommt es vor, dass ein Fluoreszenzsignal eines Farbstoffs auch in die nicht für ihn vorgesehenen Kanäle ausstrahlt. Dies würde die Beurteilung der Ergebnisse beeinträchtigen.³⁰ Die Streuung in andere Kanäle lässt sich jedoch durch Berechnung korrigieren, was Kompensation genannt wird. Idealerweise sollte die Kompensation dabei unter 50 % liegen. In unserer Messung war dies der Fall, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Ergebnisse nicht durch das Ausstrahlen in falsche Kanäle beeinträchtigt wurden.

Nach der Identifizierung der Subpopulationen mittels Gating könnte im nächsten Schritt nun das Sortieren dieser erfolgen. Da der Sortierer (*FACSAria*³¹) exakt die gleichen Laser und Filter besitzt und die gleiche Software benutzt, kann davon ausgegangen werden, dass die vom LSR II (durchs Gating) identifizierten Zellpopulationen mit dem *FACSAria* sortiert werden können.

²⁹ Prof. Y. Taoufik, Service d'Immunologie Biologique, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Frankreich

³⁰

http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_durchflusszytometrie_kompensation.htm

³¹ BD FACSAria Cell Sorter von BD Biosciences

Zusammen mit der in dieser Arbeit erfolgreich etablierten und optimierten real-time PCR zur sensitiven Quantifizierung der HIV-Proviren ergibt das Identifizieren und das mögliche Sortieren der Subpopulationen mittels FACS eine vielversprechende Methode zur Lokalisation der HIV-Proviren bzw. der HIV-1-Reservoire. Im nächsten Schritt sollte daher der gesamte Prozess mit einer Blutprobe eines HIV-positiven Patienten (unter HAART) getestet werden.

4.3 Aufarbeitung der Proben für die real-time PCR

Um in Zukunft die sortierten T-Zell-Subpopulationen einer HIV⁺ Probe in den beiden real-time PCR Assays auf ihren Anteil an proviralen HIV-Genomen testen zu können, wurde zunächst die Eignung humaner Zellen dazu getestet. Nach der Anfärbung der CD4⁺-Zellen für die Durchflusszytometrie ist es in unserem Fall notwendig, die Zellen zu fixieren, damit einerseits keine Gefahr besteht, die zu nutzenden Geräte zu kontaminieren und andererseits die Zellstabilität für die Anfärbung erhöht wird. Das bedeutet, dass die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen, welche künftig aus den Gates des *FACSAria* herausgegeben werden nach der Sortierung und welche danach in der qPCR getestet werden sollen, im fixierten Zustand sind. Es wurde deshalb zunächst getestet, inwieweit es möglich ist, die DNA aus fixierten Zellen zu extrahieren. Bei der Zellfixierung mit PFA bzw. Formalin kommt es zur Vernetzung der Zellstrukturen miteinander. Die DNA lässt sich deshalb nur schwer und mit besonderen Methoden aus der stabilisierten Zelle herauslösen. (28)

Zum Testen wurde im Vergleich die DNA aus nicht-fixierten Zellen und aus fixierten Zellen mit dem „QIAamp DNA Blood Mini Kit“ (von *QIAGEN*) isoliert und die DNA Konzentration der Proben gemessen. Vergleicht man die Mittelwerte der Ergebnisse nun miteinander, so ist ein enormer Unterschied in der DNA Konzentration der DNA aus fixierten Zellen zur DNA aus nicht-fixierten Zellen ersichtlich. Dabei hat die DNA aus nicht-fixierten Zellen eine Konzentration von etwa 194 ng/μl, die DNA aus den fixierten Zellen hat eine Konzentration von ca. 17 ng/μl, also nur etwa 8 % der DNA Konzentration der nicht-fixierten Zellen. Des Weiteren zeigt der 260/280-Wert sehr schwankende Werte für die Reinheit bei den dreifach getesteten Proben aus fixierten Zellen, was im Normalfall nicht vorkommen sollte und bei den DNA-Proben aus nicht-fixierten Zellen auch nicht der Fall ist. Es lässt sich demnach sagen, dass die Extraktion von DNA aus fixierten Zellen mit dem gegebenen DNA-Isolationskit³² nicht geeignet ist, da sich ein großer Verlust der DNA ergibt. Es musste deshalb eine geeignetere Methode gefunden werden.

³² QIAamp DNA Blood Mini Kit von *QIAGEN*

Nachfolgend wurden daher erneut fixierte und nicht-fixierte Zellen im Vergleich getestet, indem die DNA isoliert und die DNA Konzentration gemessen wurde. Dabei wurde für die Isolierung aus fixierten Zellen ein DNA-Extraktionskit, welches für formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe bestimmt ist, verwendet³³. In der Literatur ließ sich keine alternative Methode zur Aufreinigung von DNA aus fixierten Zellen finden. Da in unserem Fall jedoch kein Gewebe, welches in Paraffin eingebettet ist, das Ausgangsmaterial ist, sondern PFA-fixierte Zellen, wurde festgelegt, dass zur Isolierung der DNA aus fixierten Zellen das Protokoll des Herstellers erst ab dem Punkt 10^{34} begonnen werden sollte. Die Isolierung der DNA aus den nicht-fixierten Zellen erfolgte mittels des QIAamp DNA Blood Mini Kit, wie zuvor.

Die Ergebnisse der Messung der DNA Konzentration zeigten dieses Mal keinen Unterschied zwischen DNA aus fixierten und aus nicht-fixierten Zellen; auch die Reinheit der einzelnen Proben war einheitlich, was auf gute und zuverlässige Messergebnisse hinweist.

Demzufolge wurde die Verwendung des QIAamp DNA FFPE Tissue Kit's für die Isolierung von DNA aus fixierten Zellen festgelegt.

Weiterhin war unklar, wie sich die DNA Proben aus fixierten Zellen, welche mittels des besagten Extraktionskit produziert wurden, bei einer real-time PCR verhalten. Theoretisch wäre denkbar, dass die Proben durch die gewählte Extraktionsmethode inhibitorische Stoffe enthalten könnten oder dass sich durch die Extraktion eventuell kürzere DNA-Fragmente, welche sich nicht mehr amplifizieren ließen, bildeten. Es wurden demnach 10 Proben (aus fixiertem Zellmaterial extrahiert) in einer real-time PCR auf CCR5 getestet (siehe S.42). Zum Vergleich wurde dasselbe mit Proben aus nicht-fixierten Zellen wiederholt. Mithilfe der CCR5-spezifischen real-time PCR konnte die Anzahl der Zellgenome festgestellt werden und mit der Anzahl der Zellgenome aus DNA von nicht-fixierten Zellen verglichen werden.

Bei den DNA-Proben aus fixierten Zellen zeigte sich im Mittel eine Anzahl von ca. 1×10^4 Zellgenomen, während bei der real-time PCR mit DNA aus nicht-fixierten Zellen eine gemittelte Anzahl von ca. 6×10^4 Zellgenomen festgestellt wurde. Auch der theoretisch errechnete Soll-Wert für die Templatemenge betrug $6,4 \times 10^4$ Kopien, was dem Wert der Zellgenome aus nicht-fixierten Zellen gleicht. Es besteht jedoch ein Unterschied zwischen der ermittelten Templatemenge der Proben aus fixierten und der aus nicht-fixierten Zellen, und zwar sind 6-mal weniger Kopien bei den Proben aus fixiertem Zellmaterial gemessen worden als bei den Proben aus nicht-fixierten Zellen.

³³ QIAamp DNA FFPE Tissue Kit von QIAGEN

³⁴ Siehe dazu das Protokoll „Isolation of Genomic DNA from FFPE Tissue Sections“ vom QIAamp DNA FFPE Tissue Kit von QIAGEN

Um nun herauszufinden, woran genau der Verlust der DNA bei den Proben aus fixierten Zellen liegt, wurde ein weiterer Test durchgeführt, in dem jeweils fixierte und nicht-fixierte DNA-Proben mit einer festgelegten Anzahl an pNL4-3-Kopien (HIV-Plasmiden; 10^4 Kopien) versetzt wurden und in einer real-time PCR (HIV-1-spezifisch) getestet wurden (siehe S.43). Würde genau die Kopienanzahl von pNL4-3 gemessen werden, wie hineingegeben wurde, so bedeutete dies, dass sich keine inhibitorischen Stoffe in der Probe der DNA aus fixierten Zellen befänden. Wäre jedoch die gemessene Kopienanzahl stark verringert, so würde dies bedeuten, dass sich in der Probe inhibitorische Stoffe befänden, welche die qPCR negativ beeinflussen könnten.

Es stellte sich jedoch heraus, dass die berechnete Templatemenge (=die Kopienzahl) der pNL4-5 Proben in DNA aus fixierten Zellen mit dem Soll-Wert übereinstimmten. Somit konnte aufgezeigt werden, dass sich keine inhibitorischen Stoffe in der Probe aus fixierten Zellen, welche sich womöglich bei der DNA-Isolierung hätten bilden können, befanden. Der gemessene Verlust an DNA-Menge lag höchstwahrscheinlich daran, dass sich Fragmente bildeten, welche nicht mehr amplifizierbar waren, was für die real-time PCR und für die PCR-Reagenzien jedoch nicht schädlich ist. Die Integrität der DNA aus fixierten Zellen ist also nicht vergleichbar mit der aus nicht-fixierten Zellen, was die unterschiedlichen Ergebnisse in der qPCR trotz Einsatz der gleichen Menge an DNA in die qPCR erklären würde. Es muss dennoch in Zukunft davon ausgegangen werden, dass die Isolierung von DNA aus fixierten Zellen mit einem Verlust von DNA einhergeht, welcher auch in der real-time PCR gemessen werden kann.

Weiterhin musste noch ein letztes Problem gelöst werden, und zwar die DNA-Aufreinigung aus sehr geringen Zellmengen. Es ist zu erwarten, dass nach dem Sortieren der Zell-Subpopulationen einige Populationen in sehr geringen Mengen vorliegen werden (z.B. T_{SCM}-Zellen, s.o.). Da die Populationen aber in der real-time PCR getestet werden sollen, muss die DNA aus den einzelnen Subpopulationen isoliert werden. Getestet wurde dies mit infizierten humanen PBMC.

Dazu wurden aus den fixierten infizierten PBMC 1000 Zellen abgezählt (mittels *Coulter Counter*) und mit dem DNA-Isolationskit für fixiertes Zellmaterial³⁵ wurde die DNA aus diesen Zellen isoliert. In der anschließenden Messung der DNA Konzentration zeigten sich negative Ergebnisse (siehe S.45), was bedeutet, dass sich keine DNA mehr in den Proben befand. Es ist also nicht gelungen, aus geringen Mengen an fixiertem Zellmaterial DNA zu isolieren.

Anschließend sollte versucht werden, die infizierten PBMC zum Spiken von anderen Zellen zu benutzen, um für die DNA-Isolation mehr Zellmaterial zur Verfügung zu haben und diese effi-

³⁵ QIAamp DNA FFPE Tissue Kit von QIAGEN

zienter zu gestalten, d.h. die Menge an Zellmaterial zu erhöhen und gleichzeitig die Zahl humaner Zellen zur Bestimmung von CCR5 gleich zu halten. Je mehr Zellen in die Extraktion eingesetzt werden, desto weniger Verlust wird entstehen.

Dazu wurde eine Probe mit Maus-DNA und eine Probe mit Schweine-DNA in der real-time PCR auf CCR5 getestet. Es war dabei erwünschenswert, CCR5-negative Zellen zum Versetzen der Proben zu benutzen, da diese die Ergebnisse der nachfolgenden real-time PCRs nicht beeinflussen würden.

In der real-time PCR zeigten sich sowohl die Maus- als auch die Schweine-DNA CCR5-negativ (siehe S.45). Für weitere Tests wurde sich für die Maus-DNA bzw. für Mauszellen entschieden, da diese in ausreichender Menge im Labor vorhanden waren. Die Maus-DNA wurde zusätzlich in einer konventionellen PCR auf CCR5 getestet, um sicher zu gehen, dass diese kein positives Signal ergibt (siehe S.46). Auch dabei wurde auf dem Agarosegel sichtbar, dass die DNA CCR5-negativ war, es zeigten sich keine Banden bei 81 bp (das CCR5-Fragment zwischen den Primer hätte diese Basenlänge). Eine Probe der dreifach getesteten Proben zeigte jedoch eine Bande bei ca. 100 bp, was als falsch positives Ergebnis bewertet wurde und die Folge einer Kontamination beim Pipettieren der Proben sein könnte. Da jedoch die anderen beiden Proben negativ sind und keine Banden zeigen, ändert dies nichts an dem Ergebnis dieser PCR.

Es konnte nun also sichergestellt werden, dass eine Amplifikation des murinen CCR5 mit den von mir benutzten Primern bzw. der Sonde nicht möglich ist. Somit konnten Mauszellen bzw. murine DNA mit den infizierten PBMC-Proben versetzt werden.

Nach dem Spiken der murinen Zellen bzw. der P815 Zellen mit den infizierten PBMC stellte sich bei der Messung der DNA Konzentration der Proben heraus, dass die Werte der DNA Konzentration extrem schwanken (siehe S.46 und 48). Theoretisch wurde erwartet, dass die DNA Konzentration der drei getesteten Proben keinen Unterschied zeigt, da die Anzahl der Mauszellen, welche für die DNA Isolation eingesetzt wurde, immer die gleiche war und sich die Proben nur in der Anzahl der versetzten PBMC unterschieden.³⁶ In Tabelle 16 (S.46) sieht man jedoch, dass sich die DNA-Konzentrationen um 10 ng/µl pro Probe unterscheiden, was den Erwartungen widerspricht. Auch beim Messen der DNA Konzentration der P815 DNA versetzt mit den infizierten PBMC (S.48) widersprachen die Werte den Erwartungen. Dort wurden sogar Unterschiede von bis zu 100 ng/µl zwischen den einzelnen Proben gemessen. Diese großen Unterschiede in der DNA Konzentration ließen sich durch einen Fehler bei der Herstellung der Proben, der allerdings nicht gefunden werden konnte, erklären. Es wäre auch mög-

³⁶ Die Gesamtzellzahl setzt sich zusammen aus jeweils 5×10^6 Mauszellen (P815 bzw. Milzzellen) + 10^4 bzw. 10^3 bzw. 10^2 Zellen der HIV-infizierten PBMC

lich, dass die unerwarteten Messergebnisse durch ein Problem mit dem NanoDrop Spektrophotometer verursacht wurden; wobei aber vor und nach diesen Experimenten damit keine Probleme auftraten.

Ungeachtet der unerwarteten Ergebnisse der Messung der DNA Konzentration wurden die Proben in real-time PCRs auf HIV-1 bzw. CCR5 getestet.

Da durch eine vorhergehende real-time PCR mit HIV-1-infizierten PBMC eine Infektionsrate von ca. 19 % festgestellt wurde (siehe S.43), wurde auch in den folgenden real-time PCRs³⁷ ein Anteil von ca. 19 % an HIV-1 Kopien erwartet.

Weiterhin wurden die Soll-Werte der erwarteten Templatemengen der Zellgenome berechnet (über die Inputmenge an DNA). Dabei wurden für das erste Experiment (mit muriner DNA aus Milzzellen versetzt mit DNA aus infizierten PBMC) für Probe 1 ca. 10^3 Kopien, für Probe 2 10^2 und für Probe 3 10 Kopien errechnet³⁸. In Tabelle 24 sind zum Vergleich die Soll-Werte und die tatsächlich errechneten Templatemengen der Zellgenome ersichtlich.

Tab. 24: Vergleich des Soll-Werts der Templatemenge der Zellgenome mit den tatsächlich errechneten Werten; aus der CCR5-spezifischen real-time PCR mit den drei Maus-DNA (aus Milzzellen)-Proben, welche mit DNA aus infizierten PBMC gespiked wurden

Probe	Soll-Wert	Errechnete Templatemenge (der CCR5-spezifischen qPCR)
Inf. PBMC (10^4) + Maus-DNA	10^3 Kopien	61,5 Kopien
Inf. PBMC (10^3) + Maus-DNA	10^2 Kopien	2,5 Kopien
Inf. PBMC (10^2) + Maus-DNA	10 Kopien	0,05 Kopien

Die mit der *MxPro*-Software errechneten Werte für die Templatemengen der Zellgenome entsprechen nicht ansatzweise den theoretisch erwarteten Werten; sie fallen um ein Vielfaches geringer aus. Auch die gemessene Anzahl der HIV-1 Kopien von 25 Kopien (Probe 1), 7 Kopien (Probe 2) und 22 Kopien (Probe 3) entspricht nicht dem erwarteten Anteil von ca. 19 %; in den letzten beiden Proben wurden sogar mehr HIV-1 Kopien als Zellgenom-Kopien gemessen.

Auch im zweiten Experiment, in dem DNA aus P815-Zellen mit DNA aus infizierten PBMC versetzt wurde und in beiden real-time PCR Assays auf ihren Anteil an HIV-1 in den Zellge-

³⁷ 2 Experimente á zwei real-time PCRs (HIV-1 spezifische und CCR5 spezifische qPCR); einmal mit muriner DNA aus Milzzellen gespiked mit inf. PBMC und einmal mit P815-DNA gespiked mit inf. PBMC (jeweils 3 Proben)

³⁸ Probe 1: 10^4 inf. PBMC + 5×10^6 Maus-DNA; Probe 2: 10^3 inf. PBMC + 5×10^6 Maus-DNA; Probe 3: 10^2 inf. PBMC + 5×10^6 Maus-DNA

nomen getestet wurde, entsprachen die gemessenen Werte nicht den erwarteten; sie lagen wieder weit darunter (siehe S.49).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die eingesetzte Templatemenge zu gering und am Rande der Nachweisgrenze der real-time PCR Assays ist; es lassen sich keine zuverlässigen Werte messen. Des Weiteren scheint die DNA, welche in die real-time PCRs eingesetzt wurde, nach der Extraktion nicht mehr intakt genug zu sein, um eine ordentliche Amplifizierung zu erlauben. Der Grund des Verlustes in der Templatemenge und in der DNA-Qualität liegt höchstwahrscheinlich in der Methode der DNA-Isolierung. Im Voraus wurde dazu schon festgestellt, dass durch die Methode der Extraktion von DNA aus fixierten Zellen ein Verlust an DNA Menge im Produkt entsteht. Auch in der Literatur lassen sich Probleme im Zuge der DNA Extraktion aus fixiertem Zellmaterial und deren Weiterverarbeitung finden (z.B. Gilbert et al., 2007 (28)).

Zusammenfassend lässt sich demnach sagen, dass das Spiken von murinen Zellen mit infizierten PBMC bzw. später den T-Zell-Subpopulationen nicht sinnvoll ist, da dabei die Effizienz der DNA-Isolierung nicht erhöht werden konnte und demzufolge nicht genügend DNA-Material in die darauffolgende real-time PCR eingesetzt werden konnte, um brauchbare Ergebnisse zu erlangen. Es sollte daher in Zukunft getestet werden, inwiefern sich das Spiken von naiven PBMC mit infizierten PBMC eignet (bzw. dann mit T-Zell-Subpopulationen) oder ob eine andere Methode der DNA-Isolation aus fixierten Zellen gefunden werden muss, um den Verlust des DNA-Materials einzudämmen.

4.4 Duplex PCR

Das Testen der beiden Plasmidstandardreihen (CCR5-spezifische und HIV-1 spezifische) im Duplex-Ansatz sollte Aufschluss darüber geben, ob in Zukunft effizienter gearbeitet werden kann durch das standardgemäße Verwenden einer Duplex-PCR. Anstatt Proben in zwei verschiedenen real-time PCR Messungen zu testen ist es mit einer Duplex-PCR möglich mit einem Mastermix, der alle notwendigen Primer und Sonden enthält, die Proben auf zwei Parameter gleichzeitig zu testen. Dadurch wird nicht nur die Arbeitszeit effizienter gestaltet, sondern auch Material- und Templatemenge gespart. In der Literatur lässt sich unter anderem eine Studie von Behrendt et al. (2009) (29) finden, in welcher der Nachweis von HIV-2 über eine Duplex real-time PCR getestet wird. Da in der Publikation von Malnati et al. (18) nicht von einer Duplex-PCR gesprochen wird, sollte diese getestet werden. Eingesetzt dafür wurde, neben der CCR5-Plasmidstandardreihe, die pNL4-3 Standardreihe in H₂O; denn ein DNA Background (wie die pNL4-3 Standardreihe in C8166 DNA) hätte CCR5-spezifische Signale hervorgerufen.

Bei einer Duplex-PCR kann es dazu kommen, dass sich die Amplifikation der zwei PCR-Reaktionen gegenseitig inhibiert; so können beispielsweise die Sonden und die Primer in geringeren Kopienzahlen nicht mehr richtig arbeiten. In den Ergebnissen ist dann zu sehen, dass die C_T -Werte einer Standardreihe geringer werden mit abfallenden Kopienzahlen, was normalerweise so nicht vorkommen sollte.

Schaut man sich nun die C_T -Werte der einzelnen Proben der beiden Standardreihen in unserem Fall an, so lässt sich feststellen, dass die C_T -Werte bei beiden Standardreihe gleichmäßig ansteigen (mit abnehmender Kopienzahl); bei einigen Proben entsprechen die Steigungen zum nächsten C_T sogar der optimalen Steigung von 3,32 (z.B. bei der HIV-1 Standardreihe, von $C_T=15,32$ bis $C_T=18,64$ ist die Steigung 3,32). Auch die Ergebnisse der Effizienz der beiden Standardkurven zeigen zufriedenstellende Werte. Die CCR5-spezifische Standardkurve hat eine Amplifikationseffizienz von 96,8 %, während die HIV-1 spezifische Standardkurve eine Effizienz von 93,6 % zeigt.

Die Befürchtungen, dass sich die beiden Standardreihen eventuell gegenseitig inhibieren könnten, haben sich demnach nicht bestätigt; die Duplex-PCR verlief erfolgreich. Um die Effizienz noch zu verbessern, könnte man in Zukunft verschiedene Konzentrationen der Primer und Sonden austesten, denn die Effizienz sollte später so nah wie möglich an 100 % liegen. Des Weiteren sollte die Duplex real-time PCR auch noch mit verschiedenen unbekannt Proben getestet werden, um zu sehen, wie die PCR-Reaktionen sich verhalten, wenn beispielsweise ein höherer Wert für HIV-1 gemessen wird o.Ä.

Nur so kann sichergestellt werden, dass die real-time PCR im Duplex-Ansatz auch hundertprozentig zuverlässig ist.

5 Zusammenfassung

Auch im Jahr 2013 sind noch ca. 1,5 Millionen Menschen durch HIV/AIDS gestorben. Seit Jahrzehnten wird nun schon an der Bekämpfung der HI-Viren geforscht und gearbeitet. Derzeit klinisch angewandte Antiretrovirale Therapien sind dazu imstande, die Produktion infektiöser Viruspartikel zu unterdrücken und damit die Verbreitung von HIV zu mindern sowie die Lebenserwartung des Patienten zu steigern. Die vollständige Eliminierung des Virus durch die Therapien ist jedoch aufgrund der Proviren, welche im Zellgenom integriert sind, nicht möglich. Die zelluläre HIV-Proviruslast ist neben der Viruslast im Blut und der CD4⁺-Zellzahl ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der AIDS-Progression. Dabei ist gerade bei Patienten unter antiretroviraler Therapie die HIV-Proviruslast ein verlässlicherer Parameter als die dann schwer zu bestimmende Viruslast im Blut.

Die Lokalisation der sogenannten HIV-1 Reservoirs ist hierbei eine wichtige Fragestellung. Es ist bekannt, dass innerhalb der CD4⁺-T-Zellen unterschiedliche Subpopulationen existieren. Von verschiedenen Arbeitsgruppen gibt es Hinweise auf bestimmte Subpopulationen, die vorrangig als HIV-Reservoirs dienen. Mithilfe dieser Bachelorarbeit sollte nun eine Methode zur Identifizierung dieser T-Zell-Subpopulationen, welche als HIV-Reservoirs dienen, etabliert werden und die mögliche quantitative Messung von HIV-Proviren und Zellzahlen demonstriert werden.

Dazu wurde zunächst eine bereits etablierte real-time PCR zur Quantifizierung der HIV-Proviren optimiert und eine den zu messenden Proben angepasste Standardreihe von HIV-1 Plasmiden in einer definierten Menge von humaner DNA erstellt. Weiterhin wurde mit ACH-2 Zellen, die eine bekannte Anzahl an HIV-Kopien pro Genom tragen, die Sensitivität der real-time PCR für die Messung von HIV-Kopien sowie für die Messung eines „single copy“ Gens, CCR5, zur Quantifizierung von humanen Zellgenomen bestätigt.

Erstmals wurden im Rahmen dieser Arbeit die HIV-1- und die CCR5-qPCR zu einer Duplex-PCR, bei der beide Reaktionen im selben Reaktionsgefäß ablaufen, vereint.

Weiterhin wurde der Prozess der Zellanalyse mittels FACS (Durchflusszytometrie) erfolgreich optimiert, sodass es nun möglich ist, die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen voneinander zu trennen und zu sortieren.

Dazu wurden PBMC aus einer Blutprobe isoliert; mittels MACS gegen CD4 selektiert und im Anschluss mit ausgetesteten fluoreszenz-markierten Antikörpern eingefärbt.

Da für die FACS-Analyse nur fixierte Zellen verwendet werden können, wurde eine Methode zur DNA-Isolation aus formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben für die Anwendung auf die FACS-Proben getestet.

Dabei wurde festgestellt, dass mit dieser Methode, gegenüber der DNA-Isolation aus nicht-fixierten Zellen, kein DNA-Verlust auftritt, jedoch ein geringer Verlust bei der Quantifizierung der isolierten DNA-Proben in der real-time PCR zu verzeichnen ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Methode nicht geeignet ist, DNA aus geringen Mengen von Zellen zu extrahieren.

Da jedoch in Zukunft aus den sortierten Zell-Subpopulationen, die dann nur wenig Zellen enthalten, DNA isoliert und in der real-time PCR getestet werden sollen, wurde versucht, die Effizienz der DNA Isolierung dahingehend zu optimieren. Nachdem gezeigt wurde, dass die CCR5-spezifische Primer/Sonden-Kombination nicht das murine CCR5 detektiert, wurden in zwei Versuchen humane PBMC mit zwei unterschiedlichen Zelllinien von Mäusen versetzt. In der aus diesen fixierten Proben isolierten DNA konnte jedoch nicht wie erwartet die eingesetzte Menge an humanen Zellen mittels CCR5-spezifischer real-time PCR detektiert werden.

Auf Basis dieser Arbeit sollte die Identifizierung der T-Zell-Subpopulationen, die die Reservoirs für HIV-1 darstellen, sowie die Sortierung im geeigneten FACS-Gerät möglich sein, worauf weiterhin mittels der hier etablierten bzw. optimierten Methoden DNA gewonnen und in der real-time PCR die Anzahl der HIV-1 Proviren innerhalb einer Population bestimmt werden kann.

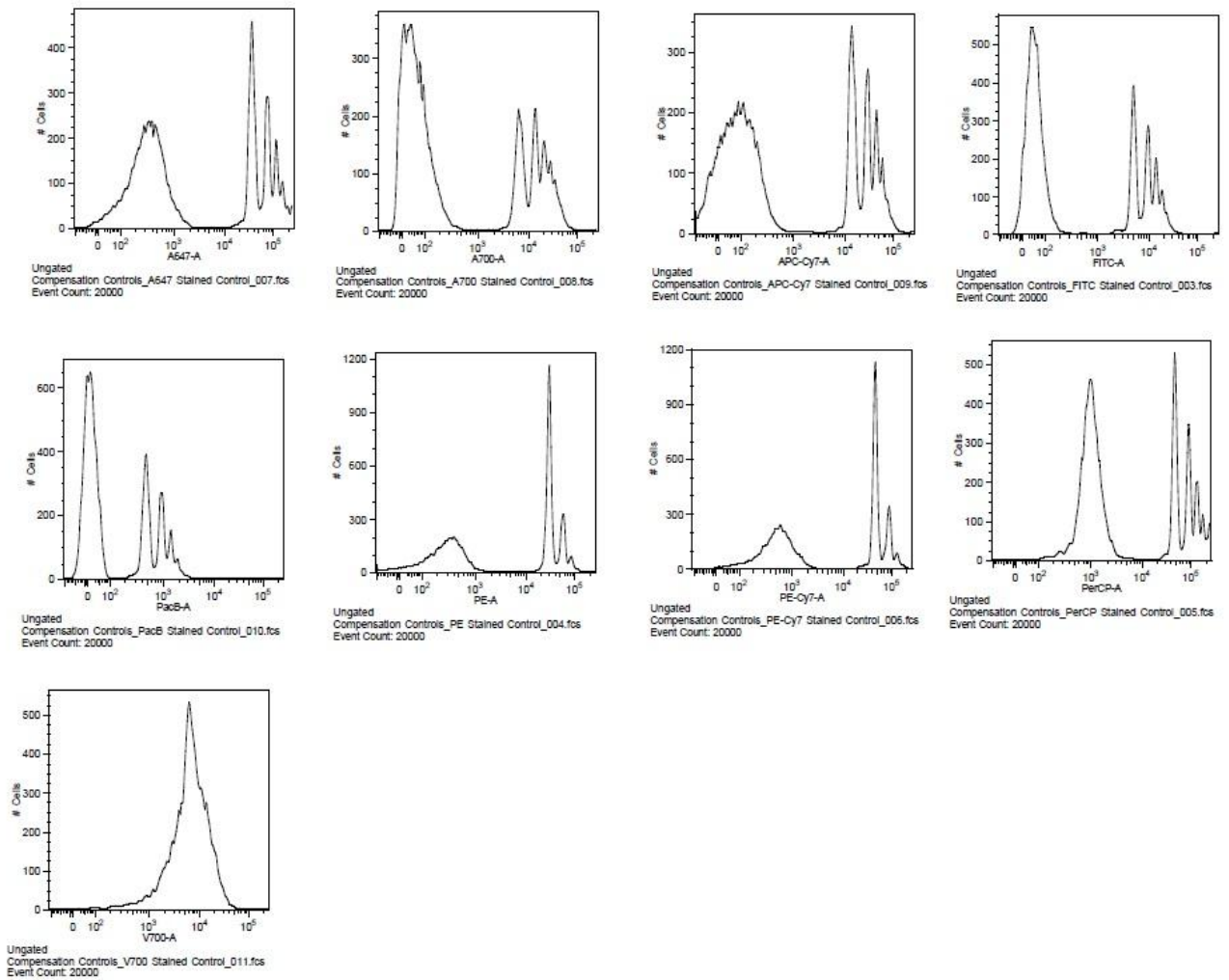
6 Ausblick

Zukünftig sollen Proben von HIV-infizierten Patienten, die frisch infiziert sind oder unter antiretroviraler Therapie stehen, auf die Anzahl der HIV-Proviren in den potentiellen zellulären Reservoiren untersucht werden. Da sich ein Versetzen der humanen Zellen mit Mauszellen zur Maximierung der DNA Ausbeute als nicht durchführbar erwiesen hat, sollte getestet werden, ob die sortierten T-Zell-Subpopulationen anschließend mit naiven PBMC versetzt werden können. Dabei wäre jedoch zu beachten, dass die direkte Quantifizierung der Zellgenome mittels CCR5-spezifischer qPCR nicht mehr gegeben ist, sondern der Wert der FACS-Analyse angenommen werden sollte. Es können jedoch auch Zellen anderer Spezies getestet werden, solange diese nicht positiv mit dem verwendeten CCR5-Setup getestet werden. Weiterhin könnte versucht werden, die Methode der DNA-Isolierung anhand des Protokolls für Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebe zu modifizieren, um eine minimale Zerstörung der DNA zu erreichen.

Um die Duplex PCR zukünftig einzusetzen, sollte hier der Einfluss von unterschiedlichen bzw. asymmetrischen Konzentrationen der jeweiligen Templates getestet werden, damit ausgeschlossen werden kann, dass eine hohe Anzahl von CCR5-Kopien die Detektion von geringen Mengen an HIV-Kopien inhibiert.

Wenn es in Zukunft möglich sein sollte, die HIV-Reservoirs genau zu lokalisieren und zu quantifizieren, könnte gezielt gegen sie vorgegangen werden, beispielsweise mit immunologischen Mitteln. Die inaktiven Proviren könnten reaktiviert und so eliminiert werden. Das würde wiederum bedeuten, dass HIV-1 infizierte Patienten „funktionell geheilt“ wären von der HIV-1 Infektion. Sie könnten ein normales Leben ohne teure Medikamente und ohne unvorhersehbare Nebenwirkungen führen.

7 Anhang



Anhang 1: Kompensationskontrollen der 9 Farbstoffe für die FACS-Färbung

Literaturverzeichnis

1. **Palmer S, Josefsson L, Coffin JM.** 2011. HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection. *J. Intern. Med.* **270**:550-560.
2. **Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H.** 2010. Molekulare Virologie.
3. **Madigan MT, Martinko JM.** 2006. Biology of Microorganisms.
4. **Hoffmann C, Rockstroh JK.** 2013. HIV 2013/14.
5. **Schütt C, Bröker B.** 2009. Grundwissen Immunologie.
6. **Koegl C, Wolf E, Hanhoff N, Jessen H, Schewe K, Rausch M, Goelz J, Goetzenich A, Knechten H, Jaeger H, Prime DAGSG, Ac DAGSG.** 2009. Treatment during primary HIV infection does not lower viral set point but improves CD4 lymphocytes in an observational cohort. *Eur. J. Med. Res.* **14**:277-283.
7. **Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debre P, Leibowitch J.** 1997. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4(+) T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* **277**:112-116.
8. **Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Jacquot S, Prazuck T, Legac E, Melard A, Niang M, Mille C, Le Moal G, Viard JP, Rouzioux C, Agence Natl Rech Sida Hepatitis V.** 2013. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**:1169-1178.
9. **Buzon MJ, Martin-Gayo E, Pereyra F, Ouyang ZY, Sun H, Li JZ, Piovoso M, Shaw A, Dalmau J, Zangger N, Martinez-Picado J, Zurakowski R, Yu XG, Telenti A, Walker BD, Rosenberg ES, Lichtenfeld M.** 2014. Long-Term Antiretroviral Treatment Initiated at Primary HIV-1 Infection Affects the Size, Composition, and Decay Kinetics of the Reservoir of HIV-1-Infected CD4 T Cells. *Journal of Virology* **88**:10056-10065.
10. **Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kucherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E.** 2009. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **360**:692-698.
11. **Monforte AD, Svicher V, Nozza S, Lazzarin A, Marchetti G, Perno CF.** 2014. Highlights on HIV eradication in 2013. *Aids* **28**:1-7.
12. **Lafeuillade A.** 2012. Eliminating the HIV reservoir. *Current HIV/AIDS Reports* **9**:121-131.
13. **Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel MR, Ghattas G, Brechley JM, Schacker TW, Hill BJ, Douek DC, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP.** 2009. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature Medicine* **15**:893-U892.
14. **Chun TW, Fauci AS.** 2012. HIV reservoirs: pathogenesis and obstacles to viral eradication and cure. *Aids* **26**:1261-1268.
15. **Trono D, Van Lint C, Rouzioux C, Verdin E, Barre-Sinoussi F, Chun TW, Chomont N.** 2010. HIV Persistence and the Prospect of Long-Term Drug-Free Remissions for HIV-Infected Individuals. *Science* **329**:174-180.
16. **Yang HC.** 2011. Primary cell models of HIV latency. *Current Opinion in HIV and Aids* **6**:62-67.

17. **Lafeuillade A, Stevenson M.** 2011. The Search for a Cure for Persistent HIV Reservoirs. *Aids Reviews* **13**:63-66.
18. **Malnati MS, Scarlatti G, Gatto F, Salvatori F, Cassina G, Rutigliano T, Volpi R, Lusso P.** 2008. A universal real-time PCR assay for the quantification of group-M HIV-1 proviral load. *Nat. Protoc.* **3**:1240-1248.
19. **Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E.** 2013. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *European Journal of Immunology* **43**:2797-2809.
20. **Buzon M, Sun H, Li C, Martin-Gayo E, Seiss K, Shaw A.** 2012, p 17-21. Proceedings of the ID Week 2012 Meeting, San Diego, CA, USA.
21. **Buzon MJ, Sun H, Li C, Shaw A, Seiss K, Ouyang ZY, Martin-Gayo E, Leng J, Henrich TJ, Li JZ, Pereyra F, Zurakowski R, Walker BD, Rosenberg ES, Yu XG, Lichterfeld M.** 2014. HIV-1 persistence in CD4(+) T cells with stem cell like properties. *Nature Medicine* **20**:139-142.
22. **Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu ZY, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M, Restifo NP.** 2011. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine* **17**:1290-U1325.
23. **Sanders-Beer BE, Eschricht M, Seifried J, Hirsch VM, Allan JS, Norley S.** 2012. Characterization of a monoclonal anti-capsid antibody that cross-reacts with three major primate lentivirus lineages. *Virology* **422**:402-412.
24. **Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA.** 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *Journal of virology* **59**:284-291.
25. **Mackay IM, Arden KE, Nitsche A.** 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* **30**:1292-1305.
26. **Véronique AF, Marie-Laure C, Stéphane B, Marianne B, Corinne F, Kadidia T, Marie-Christine A, Josiane W, Christine R.** 2009. LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *Journal of medical virology* **81**:217-223.
27. **Russell JN, Clements JE, Gama L.** 2013. Quantitation of gene expression in formaldehyde-fixed and fluorescence-activated sorted cells. *PLoS one* **8**:e73849.
28. **Gilbert MTP, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, Van Marck E, Worobey M.** 2007. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues—which methods are useful when? *PLoS One* **2**:e537.
29. **Behrendt R, Fiebig U, Norley S, Gürtler L, Kurth R, Denner J.** 2009. A neutralization assay for HIV-2 based on measurement of provirus integration by duplex real-time PCR. *Journal of virological methods* **159**:40-46.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau eines Retroviruspartikels (HIV-1) (2)	2
Abb. 2: provirale Genomstruktur von HIV-1	3
Abb. 3: Replikationszyklus der HI-Viren [Aus: http://www.vsbassociates.com/images/powerpoint/2HIV-replication-cycle.jpg]	4
Abb. 4: natürlicher Verlauf der HIV-Infektion (2)	6
Abb. 5: zellassozierte HIV-1 DNA in CD4+ T-Zellen, Vergleich der Patienten, welche die ART frühzeitig begonnen haben (ET) mit Patienten, welche die ART während der chronischen Infektion begonnen haben (CT) und mit Elite controller (EC) (9).....	7
Abb. 6: CD4+ T-Gedächtniszellen als HIV-Reservoir: eine aktivierte CD4+ T-Zelle wird durch HIV infiziert und geht anschließend in eine Gedächtniszelle über, welche durch Antigene reaktiviert werden kann. (1)	7
Abb. 7: Subtypen der T-Zellen mit Darstellung der Funktionen und der spezifischen Kombinationen ihrer Oberflächenproteine (19) } (T_N = naive T cells, T_{SCM} = stem cell memory T cells, T_{CM} = central memory T cells, T_{TM} = transitional memory T cells, T_{EM} = effector memory T cells).....	10
Abb. 8: C_T -Werte und Standardkurve der real-time PCR mit der pNL4-3-Standardreihe in H ₂ O	32
Abb. 9: C_T -Werte und Standardkurve der real-time PCR mit der pNL4-3 Standardreihe in C8166-DNA.....	33
Abb. 10: C_T -Werte und Standardkurve der HIV-1-spezifischen real-time PCR (pNL4-3 Standardreihe)	35
Abb. 11: C_T -Werte und Standardkurve der CCR5-spezifischen real-time PCR	36
Abb. 12: C_T -Werte der Proben der ACH-2 Verdünnungsreihe in der HIV-spezifischen qPCR. 36	
Abb. 13: C_T -Werte der Proben der ACH-2 Verdünnungsreihe in der CCR5-spezifischen qPCR	37
Abb. 14: Ergebnis der Analyse der Daten nach der Durchflusszytometrie. Die farbigen Zahlen innerhalb der einzelnen Populationen geben den Prozentsatz der jeweiligen Population zur Gesamtzellzahl an. Unter jeder Grafik steht an unterster Stelle jeweils die genaue gemessene Zellzahl der gesamten Population. In den beiden unteren Plots sieht man die Auftrennung der fünf verschiedenen T-Zell-Subpopulationen (T_{SCM} , T_N , T_{EM} , T_{CM} , T_{TM}).....	39

Abb. 15: Standardkurve des p24 ELISA. Auf der Y-Achse ist die Extinktion (bei 492 nm) dargestellt; auf der X-Achse ist die Konzentration von p24 dargestellt (berechnet aus der Anfangskonzentration des inaktivierten Virus (291 ng/ml) / Verdünnungsstufe).....	44
Abb. 16: p24 Konzentration der infizierten PBMC nach 4 und nach 7 Tagen. Die rote Linie zeigt den gewählten Cut Off bei OD 1,25 (Y-Achse) und die berechnete dazugehörige Verdünnungsstufe auf der X-Achse.....	44
Abb. 17: Fluoreszenzkurven der Amplifikationen der qPCR mit der CCR5-Plasmid-Standardreihe.....	45
Abb. 18: Gelbild des Agarosegels zur Auswertung der PCR zum Test der Maus-DNA auf CCR5	46
Abb. 19: C _T -Werte und Standardabweichungen der Proben in der CCR5-spezifischen qPCR	48
Abb. 20: C _T -Werte und Standardabweichungen der Proben in der HIV-1-spezifischen qPCR	48
Abb. 21: C _T -Werte und Standardabweichungen der Proben in der CCR5-spezifischen qPCR	50
Abb. 22: C _T -Werte und Standardabweichungen der Proben in der HIV-1-spezifischen qPCR	50
Abb. 23: C _T -Werte und Standardkurve der CCR5-Plasmid-Standardreihe in der Duplex PCR	52
Abb. 24: CT-Werte und Standardkurve der pNL4-3-Standardreihe in der Duplex PCR.....	52

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Schema eines Mastermix für die PCR mit CCR5.....	18
Tab. 2: Thermocycler-Programm für die CCR5-spezifische PCR	19
Tab. 3: Schema eines Mastermix für die CCR5-spezifische real-time PCR nach <i>Malnati et al.</i>	19
Tab. 4: Thermocycler-Programm für die CCR5- und HIV-1-spezifische real-time PCR nach <i>Malnati et al.</i>	20
Tab. 5: Ansatz des Mastermix für die Duplex real-time PCR	20
Tab. 6: Proben für die FACS-Messung.....	28
Tab. 7: Ergebnisse der Messung der DNA-Konzentration	31
Tab. 8: CT-Werte der qPCR mit den beiden pNL4-3-Standardreihen (=HIV-spezifisch)	31
Tab. 9: C _T -Werte der HIV-spezifischen qPCR mit der ACH-2 Verdünnungsreihe als unbekannte Proben	34
Tab. 10: C _T -Werte der CCR5-spezifischen qPCR mit der ACH-2 Verdünnungsreihe als unbekannte Proben	34
Tab. 11: eingesetzte Template-Menge der unbekanntenen Proben der qPCR (dargestellt nur bis zur Probe mit theoretisch 5 Kopien ACH-2 DNA).....	37
Tab. 12: Ergebnisse der Messung der DNA-Konzentration (Dreichfachbestimmung und Mittelwerte).....	40
Tab. 13: Ergebnisse der Messung der DNA-Konzentration (Dreichfachbestimmung und Mittelwerte).....	41
Tab. 14: eingesetzte Template-Menge der unbekanntenen Proben der qPCR. (Die Proben wurden hier der Einfachheit halber von 1 bis 10 benannt, dabei wurden in Probe 1 ursprünglich 5x10 ⁶ ACH-2 Zellen eingesetzt, in Probe 2 5x10 ⁵ ACH-2 Zellen + 4,5x10 ⁶ C8166-Zellen, Probe 3 5x10 ⁴ ACH-2 Zellen + 4,95x10 ⁶ C8166 Zellen usw.).....	42
Tab. 15: CT-Werte und berechnete Templatmenge der mit fixierter und nicht-fixierter DNA versetzten Proben in der real-time PCR (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)	43
Tab. 16: Ergebnisse der Messung der DNA Konzentration der drei mit murinen Zellen versetzten Proben	46
Tab. 17: C _T -Werte der Proben der CCR5- und der HIV-1-spezifischen real-time PCR (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)	47

Tab. 18: berechnete Templatemengen der drei Proben in beiden qPCR Assays.....	47
Tab. 19: Ergebnisse der Messung der DNA Konzentration der drei mit murinen Zellen (P815) versetzten Proben	48
Tab. 20: C _T -Werte der Proben der CCR5- und der HIV-1-spezifischen real-time PCR (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)	49
Tab. 21: berechnete Templatemengen der drei Proben in beiden qPCR Assays.....	49
Tab. 22: C _T -Werte der CCR5- und der pNL4-3 Standardreihe in der Duplex PCR.....	51
Tab. 23: Werte der beiden Standardkurven mit den Werten einer optimalen Standardkurve ..	54
Tab. 24: Vergleich des Soll-Werts der Templatemenge der Zellgenome mit den tatsächlich errechneten Werten; aus der CCR5-spezifischen real-time PCR mit den drei Maus-DNA (aus Milzzellen)-Proben, welche mit DNA aus infizierten PBMC gespiked wurden	61

Danksagung

Danken möchte ich zu allererst Herrn PD Dr. Norbert Bannert für die Ermöglichung der Durchführung meiner Bachelorarbeit am RKI im FG 18 „HIV und andere Retroviren“ und für die Begutachtung meiner Arbeit.

Prof. Dr. Mutzel danke ich für die Begutachtung meiner Bachelorarbeit von Seiten der FU Berlin.

Für die Unterstützung, Planung und Hilfestellung jeglicher Art danke ich ganz herzlich Dr. Stephen Norley und Dr. Oliver Hohn, die mir während des Projektes stets zur Seite standen.

Schließlich möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe FG 18 meinen Dank aussprechen, welche mir bei Fragen und Problemen jederzeit behilflich war und mir den Einstieg in den Laboralltag erleichterte. Dabei sei vor Allem Nicole Norley genannt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich,

Luise

Krüger

4516018

Vorname

Name

Matrikelnummer

14.08.1990

Berlin (Staaken)

geboren am

geboren in

an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde bisher nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift