

AUS DEM ZENTRUM FÜR INNERE MEDIZIN
KLINIK FÜR KARDIOLOGIE, ANGIOLOGIE UND PNEUMOLOGIE
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT MAGDEBURG

**Empfänglichkeit hämatopoetischer Zelllinien mesenchymaler CD34⁺ und CD14⁺
Stammzellen des Fettgewebes für eine Infektion mit dem humanen
Immunschwächevirus Typ 1 und deren potentieller Nutzen in Prävention und
Therapie der HIV-Infektion**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Mir Timo Zadeh Nazari-Shafti

aus Lübeck

Magdeburg, 2013

Ich widme diese Arbeit
meinem Ur-Großvater Mir Zadeh Kouchakpour

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Nazari-Shafti, Mir Timo Zadegh:

Empfänglichkeit hämatopoetischer Zelllinien mesenchymaler CD34- und CD14-Stammzellen des Fettgewebes für eine Infektion mit dem humanen Immunschwächevirus Typ 1 und deren potentieller Nutzen in Prävention und Therapie der HIV-Infektion. (2. Auflage mit Korrekturen)

- Dezember 2013 – 72 Bl.: 22 Abb., 11 Tab., 4 Anl.

Kurzreferat:

Mesenchymale Stammzellen des Fettgewebes (ASC) könnten aufgrund ihres hämatopoetischen Potentials und ihres Vorkommens in leicht zugänglichen Geweben eine wichtige Rolle in zukünftigen Therapien der HIV-Infektion spielen.

ASCs wurden im Rahmen dieser Untersuchungen zur Hämatopoese stimuliert und mit X4- sowie R5-Stämmen des HIV inkubiert. Es folgten Transkriptomanalysen mittels PCR-Arrays, Untersuchungen der Oberflächenproteine durch Flusszytometrie und Immunhistochemie sowie die Durchführung eines ELISA und einer nested PCR zum Nachweis der Integration des Provirus und der produktiven Infektion durch HIV-1.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass hämatopoetisch differenzierte ASCs (HD-Zellen) für einen Befall mit dem HIV-1 empfänglich sind. Die Integration und Reproduktion des Virus wird durch die Expression der HIV-Korezeptoren *CCR5*, *CXCR4* und *CD4* sowie den zellulären Kofaktoren, wie *CDK9*, *NFκB*, Exoprtin-1 und *TAT-SF* ermöglicht. In ihren zellulären Wechselwirkungen mit dem HIV-1 stimmen die HD-Zellen mit Zellen der myeloischen Reihe überein. Sie sind jedoch im Gegensatz zu Makrophagen und Monozyten empfindlich gegenüber den zytopathischen Effekten des HIV-1 und reagieren bei Exposition mit Expression von Apoptose-Genen, wie *BAX*, *Bcl-2* und *CASP3*. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse auf die Aufrechterhaltung eines Infektion fördernden Mikroumfeldes durch HD-Zellen hin.

Schlüsselwörter:

HIV-1, CCR5, Hämatopoese, mesenchymale Stammzellen, myeloische Zellen, CXCR4, HIV-Korezeptoren und –kofaktoren, Mikroumfeld, Stammzelltherapie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen	1
1.2	Mesenchymale Stammzellen des Fettgewebes (ASCs)	2
1.3	Das Humane Immunschwächevirus (HIV)	3
1.4	Zelluläre Reservoirire des HIV-1	7
1.5	Zelllinien mesenchymalen Ursprungs als Wirtszelle des HIV-1	9
1.6	Angeborene Immunität gegenüber dem HI-Virus.....	10
1.7	Aufgabenstellung dieser Studie	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Studiendesign	13
2.2	Methodik	14
2.2.1	Allgemeines.....	14
2.2.2	Kultivierung und Gewinnung der Zellen	14
2.2.3	Differenzierung	16
2.2.4	Infektion der Zelllinien mit HIV-1	19
2.2.5	Gewinnung von RNA, DNA und cDNA.....	20
2.2.6	Transkriptom- und DNA-Analyse.....	22
2.2.7	Immunhistochemie	26
2.2.8	Flusszytometrie	28
2.2.9	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	28
2.3	Eingesetzte Materialien	30
2.4	Zelllinien	33
2.4.1	ASCs.....	33
2.4.2	HUT78.....	34
2.4.3	H9/HTLV _{IIIB}	34
2.4.4	U1	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Charakterisierung der ASCs als multipotente Stammzellen	36
3.2	Expression von für eine HIV-Infektion relevanten Genen	37
3.3	HIV-Infektion in exponierten HD-Zellen	39
3.4	Effekt der HIV-1-Exposition auf undifferenzierte ASCs.....	42
3.5	Gen-Profilanalyse in infizierten HD- und HUT78-Zellen	44
4	Diskussion	48
4.1	Charakterisierung der HD-Zellen.....	48
4.1.1	Hämatopoetische Differenzierung CD34 ⁻ ASCs.....	48

4.1.2	Korezeptorexpression.....	49
4.2	Infektionsgeschehen in den HD-Zellen.....	50
4.2.1	Chemokinsekretion in HD-Zellen	50
4.2.2	Korezeptorexpression nach HIV-Exposition	51
4.2.3	Mikroumfeld der HD-Zellen	52
4.2.4	Verlauf der HIV-Infektion in HD-Zellen.....	53
4.2.5	Expressionskontrolle in HD-Zellen.....	54
4.2.6	Aktivierung der antiretroviralen Immunabwehr in HD-Zellen ...	55
4.3	HD-Zellen und HIV im Gesamtkontext.....	56
4.4	Ausblick und mögliche Therapeutische Anwendungsgebiete der ASCs	58
4.5	Limitationen der Studie.....	60
5	Zusammenfassung.....	61
6	Referenzen	63
7	Epilog.....	i
8	Acknowledgements.....	ii
9	Eidesstattliche Erklärung.....	iv
10	Lebenslauf.....	v
11	Publikationen.....	vii
12	Anhang	viii
12.1	Ergebnisse des PCR-Arrays	viii
12.2	Liste der Gene des PCR-Arrays	x
12.3	Patientenaufklärungsbogen (Englisch).....	xii
12.4	Publikation.....	xvi

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DIFFERENZIERUNGSPOTENTIALE VON STAMMZELLEN	3
ABBILDUNG 2: HIV-PARTIKEL	4
ABBILDUNG 3: HIV-TRANSKRIPTIONSKOMPLEX	6
ABBILDUNG 4: KONZENTRATION VON VIRUS MRNA UND PARTIKELN IM ZUGE DER HIV-INFESTION	7
ABBILDUNG 5: MÖGLICHE RESERVOIRS IM MENSCHLICHEN ORGANISMUS	8
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU	13
ABBILDUNG 7: MESENCHYMALE DIFFERENZIERUNG	17
ABBILDUNG 8: HÄMATOPOETISCHE DIFFERENZIERUNG	18
ABBILDUNG 9: FLUSSZYTOMETRISCHER NACHWEIS VON TYPISCHEN OBERFLÄCHENPROTEINEN	36
ABBILDUNG 10: RELATIVER ANSTIEG DER EXPRESSION VON HIV-KOREZEPTOREN IN HD-ZELLEN	37
ABBILDUNG 11: EXPRESSION VON CHEMOKINEN UND REZEPTOREN IN HD-ZELLEN	38
ABBILDUNG 12: EXPRESSION VON GENEN DES ZELLZYKLUS IN HD-ZELLEN	39
ABBILDUNG 13: PRODUKTIVE HIV-INFESTION IN HD-ZELLEN	40
ABBILDUNG 14: EXPOSITION VON ASCS UND HD-ZELLEN MIT HIV	41
ABBILDUNG 15: EFFEKT DER HIV-EXPOSITION AUF ASCS	43
ABBILDUNG 16: NESTED PCR	44
ABBILDUNG 17: EXPRESSIONSPROFILE AUSGEWÄHLTER GENE DER HIV-EXPONierten ZELLEN	45
ABBILDUNG 18: EXPRESSION DER GENE ANGEBORENER IMMUNANTWORT	46
ABBILDUNG 19: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON ZELLREZEPTOREN	47
ABBILDUNG 20: REZEPTOREN UND CHEMOKINE DER HD-ZELLEN	50
ABBILDUNG 21: MÖGLICHES MIKROUMFELD DER HD-ZELLEN	52
ABBILDUNG 22: STUDIENDESIGN FOLGESTUDIE	59

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 : PROTEINE DES HIV	5
TABELLE 2: DIFFERENZIERUNGSMEDIEN	16
TABELLE 3: CHONDROGENISCHES DIFFERENZIERUNGSMEDIUM.....	16
TABELLE 4: PCR-REAGENZIEREN	30
TABELLE 5: PRIMER.....	30
TABELLE 6: ANTIKÖRPER	31
TABELLE 7: ZELLKULTUR-MATERIALIEN.....	32
TABELLE 8: GERÄTE UND SOFTWARE	32
TABELLE 9: PATIENTENCHARAKTERISTIKA.....	34
TABELLE 10 : ERGEBNISSE DER PCR-ARRAYS TEIL 1	VIII
TABELLE 11 : ERGEBNISSE DER PCR-ARRAYS TEIL 2	IX
TABELLE 12 : IM PCR-ARRAY GETESTETE GENE.....	XI

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<u>A</u> cquired <u>I</u> mmune System <u>D</u> eficiency <u>S</u> yndrome
ARG	<u>A</u> IDS <u>R</u> estricting <u>G</u> enes
ART	<u>A</u> nti <u>R</u> etroviral <u>T</u> herapy
ASC	<u>A</u> dipose tissue derived mesenchymal <u>S</u> tem <u>C</u> ells
BMSC	<u>B</u> one <u>M</u> arrow derived <u>S</u> tem <u>C</u> ells
CASP	<u>C</u> ASPase
CCL	<u>CC</u> -chemokine <u>L</u> igand
CCR	<u>CC</u> -chemokine <u>R</u> eceptor
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
CDK	<u>C</u> ycline <u>D</u> ependent <u>K</u> inase
cDNA	<u>c</u> omplementary <u>D</u> N <u>A</u>
CT	<u>C</u> ycle <u>T</u> hreshold
CXCR	<u>CXC</u> -chemokine <u>R</u> eceptor
DNA	<u>D</u> esoxyribo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
env	<u>e</u> nvelope protein of HIV
FBS	<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum
gag	<u>g</u> roup specific <u>a</u> ntigen of HIV
GAPDH	<u>G</u> lycer <u>A</u> ldehyd 3- <u>P</u> hosphate <u>D</u> e <u>H</u> ydrogenase
gp	<u>g</u> lycoprotein
HD	<u>H</u> ematopoietic <u>D</u> ifferentiated ASCs
HIV	<u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus
HLA	<u>H</u> uman <u>L</u> euocyte <u>A</u> ntigen
HPC	<u>H</u> ematopoietic <u>P</u> rogenitor <u>C</u> ell
HTLVIIIb	<u>H</u> uman <u>T</u> - <u>L</u> ymphotropic <u>V</u> irus <u>IIIB</u>
IL	<u>I</u> nter <u>L</u> eukine
iNOS	<u>N</u> itric <u>O</u> xide <u>S</u> ynthase
IRF	<u>I</u> nterferone <u>R</u> egulatory <u>F</u> actor
LTR	<u>L</u> ong <u>T</u> erminal <u>R</u> epeat of HIV-provirus
MIP	<u>M</u> acrophage <u>I</u> nflammatory <u>P</u> rotein
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> N <u>A</u>
MSC	<u>M</u> esenchymal <u>S</u> tem <u>C</u> ell
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline solution
PP1A	<u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase <u>1A</u>
PPIA	<u>P</u> eptidyl <u>P</u> ropyl <u>I</u> somerase <u>A</u> (cyclophilin A)
RANTES	<u>R</u> egulated <u>A</u> nd <u>N</u> ormal <u>T</u> cell <u>E</u> xpressed and <u>S</u> ecreted
RNA	<u>R</u> ibo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
RPMI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute cell culture media
RT-PCR	<u>R</u> eal <u>T</u> ime <u>R</u> everse <u>T</u> ranscription <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
SDF	CXCL12, <u>S</u> tromal cell <u>D</u> erived <u>F</u> actor
SELL	<u>S</u> E <u>L</u> ektin <u>L</u> , <u>L</u> - <u>S</u> E <u>L</u> ektin
STAT	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransducer and <u>A</u> ctivator of <u>T</u> ranscription
TAE	buffer solution with <u>T</u> ris base, <u>A</u> cedic acid, <u>E</u> DTA
TAR	<u>T</u> rans <u>A</u> ctivating <u>R</u> egion of HIV

1 Einleitung

1.1 Grundlagen

Die Infektion mit dem humanen Immunschwächevirus (HIV) ist von einem globalen Standpunkt betrachtet eine der größten Herausforderungen in der Humanmedizin und insbesondere in der Infektiologie. Sie ist durch die neue antiretrovirale Therapie (ART) gut steuerbar geworden. Dabei wird neben einer Herauszögerung des AIDS-Stadiums bei rechtzeitigem Therapiebeginn eine Suppression der Viruslast unter die Nachweisgrenze labortechnischer Verfahren erreicht [1]. Heute ist die Lebenserwartung in westlichen Industrienationen bei frühzeitiger Diagnosestellung kaum reduziert und mit der von chronischen Volkskrankheiten, wie Diabetes oder chronisch obstruktive Bronchitis vergleichbar [2]. Unterschätzt wird jedoch oft die seelische Belastung, welche mit dieser Infektionskrankheit einhergeht. Auch in unserer Gesellschaft findet bis heute, trotz zum Teil erfolgreicher Aufklärungskampagnen der Bundesregierung und diverser Stiftungen, eine Stigmatisierung und Ausgrenzung der Betroffenen statt. Die allgemeine Angst vieler Menschen, sich bei einem HIV-infizierten Patienten anzustecken und die Angst des Infizierten seine Erkrankung sowohl Fremden als auch nahestehenden Menschen weiterzugeben, führt häufig zu einer starken Isolation der Betroffenen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit die ART in ihrer heutigen Form nur als Übergangslösung zu akzeptieren. 2012 trugen laut UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) weltweit schätzungsweise 34,0 Millionen Erwachsene und Kinder das HI-Virus in sich, wovon alleine der Anteil an neuinfizierten Menschen 2,5 Millionen betrug [3]. Während 78.000 Betroffene in Deutschland aufgrund der guten medizinischen Versorgung von den Vorteilen der ART profitieren, ist es vielen Erkrankten in den HIV-Schwerpunktländern Afrikas oder Südamerikas nicht möglich, sich über Jahrzehnte hinweg Zugang zu den zum Teil teuren Medikamenten zu verschaffen [4]. So mag die ART besonders in den Industrieländern dank eines guten Versorgungsnetzwerkes sogar zu einer Eindämmung der Pandemie geführt haben. Letztendlich profitieren davon jedoch nicht die Menschen in den Schwellen- und Entwicklungsländern, welche den größten Anteil an HIV-Infizierten ausmachen. Diese Herausforderung kann nur durch die definitive Eliminierung des HI-Virus ohne anschließende Dauermedikation erreicht werden. Diesem Ziel am nächsten kam eine

Gruppe von Ärzten und Wissenschaftlern an der *Charité* in Berlin. Ihnen gelang es bereits im Jahr 2007 durch die Auswahl eines CCR5 Δ 32/ Δ 32 positiven Knochenmarkspenders, eine komplette Remission der Infektion zu erreichen [1.6, Seite 10]. Mehrere Folgeuntersuchungen des Patienten wiesen außerdem die Elimination des HI-Virus aus den bis heute bekannten Reservoirs nach. Die Erkenntnis, dass die Stammzelltherapie eine mögliche Heilungschance von HIV-infizierten Menschen bietet, bildete die Grundlage dieser Untersuchung. Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob dem Fettgewebe entnommene und in Blutgefäßen aller Organe vorkommende mesenchymale Stammzellen bei der HIV-Infektion eine wesentliche Rolle spielen, ob sie ein Reservoir der Viruspersistenz sind und welche Rolle sie bei der Bekämpfung und möglichen Eradikation der HIV-Infektion spielen könnten.

1.2 Mesenchymale Stammzellen des Fettgewebes (ASCs)

Stammzellen sind im menschlichen Körper ubiquitär vertreten und dienen der kontinuierlichen Erneuerung und Stabilisierung des Gewebes. Während sie in labilen Geweben, wie der Darmschleimhaut oder dem Knochenmark, den kontinuierlichen Zellverlust kompensieren, ermöglichen sie in endständig differenzierten Organen, wie Herz, Gehirn und Nerven, die Kompensation des durch Apoptose entstehenden Parenchymverlustes. In all diesen Fällen sind es die aus diesen Stammzellen hervorgehenden Progenitorzellen, welche durch Proliferation und Differenzierung die Struktur und Funktionsfähigkeit der Organe aufrechterhalten.

Durch die asymmetrische Zellteilung produzieren die Stammzellen diese Progenitorzellen, während sie durch die symmetrische Teilung ihre eigene Population aufrechterhalten [Abbildung 1, Seite 3]. Diese Eigenschaft der Stammzellen eröffnet viele neue Therapiemöglichkeiten in der Humanmedizin. Stammzellen werden in embryonische omnipotente sowie adulte multipotente und pluripotente Stammzellen eingeteilt. Während die embryonischen Stammzellen nur schwer und mithilfe ethisch umstrittener Methoden isoliert werden können, bieten adulte Stammzellen den Vorteil, dass sie ohne größeren Aufwand von Spendern gewonnen werden können. Lange galt, dass adulte Stammzellen nur aus dem Knochenmark isoliert werden können. Neuere Erkenntnisse ergaben jedoch, dass die Isolation von Stammzellen, basierend auf ihrer Adhäsionsfähigkeit auf Kunststoffoberflächen, auch aus Fett- und Muskelgewebe sowie der Haut gelingt [5, 6]. Während in der Vergangenheit die Terminologie der auf

diese Weise isolierten Zellen in Publikationen nicht einheitlich gewesen ist, beschreiben sie alle eine Zellpopulation mit einer Fibroblasten-ähnlichen Morphologie, Zelloberflächenmarker von Stammzellen und einem multipotenten Differenzierungspotential [7]. Zahlreiche Studien demonstrierten bereits die *in vitro* Differenzierung in Chondrozyten, Osteozyten, (Kardio-) Myozyten oder Neuronen [6, 8]. Diese und nicht zuletzt die Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe zum hämatopoetischen Potential der MSCs (mesenchymale Stammzellen) des Fettgewebes (adipose tissue derived stem cells, ASCs) bilden die Grundvoraussetzung für die Durchführung der vorliegenden Untersuchung [9].

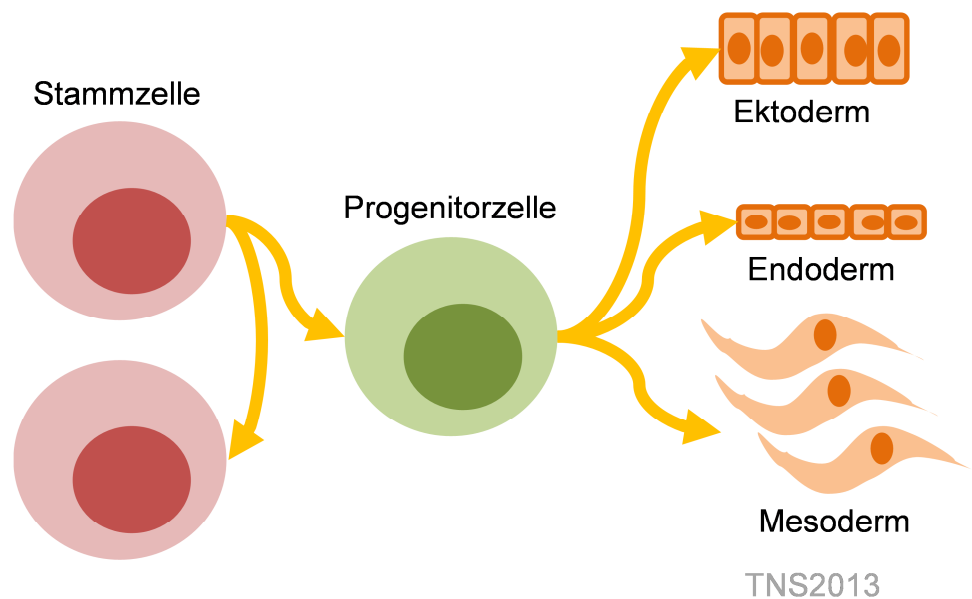


Abbildung 1: Differenzierungspotentiale von Stammzellen

Stammzellen sind in der Lage sich asymmetrisch und symmetrisch zu teilen, während die symmetrische Teilung dem Aufrechterhalten der eigenen Population und die asymmetrische Teilung der Produktion von Progenitorzellen dient.

1.3 Das Humane Immunschwächevirus (HIV)

Auf der Suche nach den Ursprüngen des HIV gelang 1998 der früheste Nachweis einer Infektion aus der Serumprobe eines im Jahre 1959 in Kinshasa in der Demokratischen Republik Kongo lebenden Menschen [10]. Seitdem wurden neben den beiden sehr nah verwandten Virus-Typen HIV-1 und dem weniger virulenten HIV-2 zahlreiche Haupt- und Untergruppen des Virus identifiziert und untersucht [11, 12]. Das an sich sehr empfindliche Virus breitete sich, aufgrund einer großen genetischen Variabilität, des Befalls wichtiger Zellen des Immunsystems und der große Latenz zwischen der Infektion und dem Auftreten der Symptome, rasant auf dem Globus aus.

Das Virus gehört zur Familie der *Retroviridae* und der Untergruppe der *Lentiviren*. Während den Retroviren gemein ist, dass sie durch das Enzym Reverse Transkriptase ihre Virus-RNA in DNA umschreiben und diese cDNA (*complementary DNA*) mit Hilfe einer viralen Integrase in das Wirtsgenom einschleusen, zeichnet sich die Gruppe der Lentiviren (*lentus* lt. : langsam) durch ein langsames Fortschreiten der Erkrankung im Wirtsorganismus aus [13]. Durch seine Oberflächenproteine bedingt, weist das Virus einen zellulären Tropismus zu wichtigen Zellen des menschlichen Immunsystems auf. Während CD4-tragende T-Lymphozyten als Reservoir für die Virusreplikation dienen, wurde nachgewiesen, dass auch Epithelien und monozytäre Zellen, wie Makrophagen oder dendritische Zellen das Virus beherbergen können [14, 15].

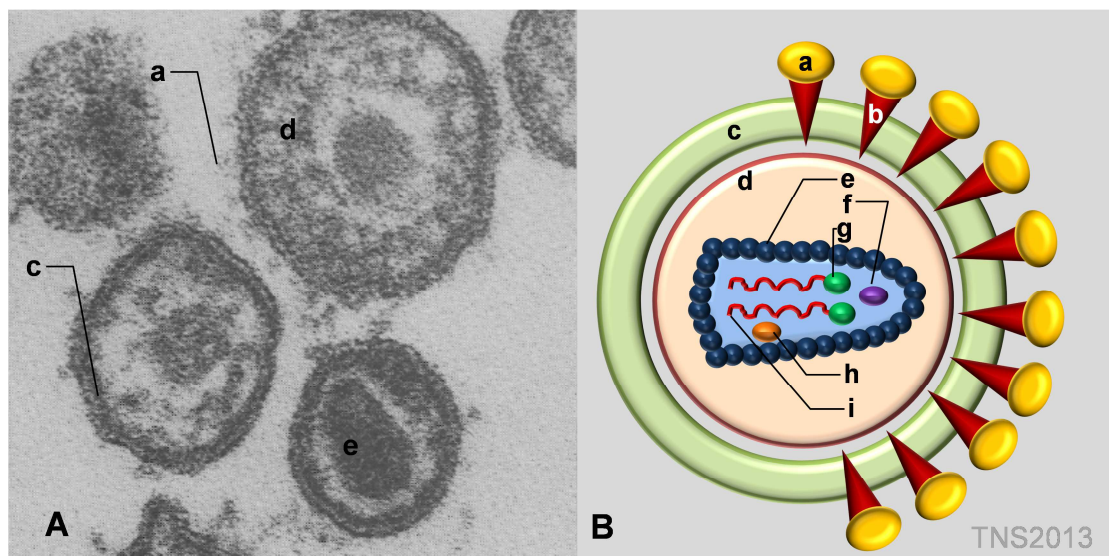


Abbildung 2: HIV-Partikel

Abbildung **A** wurde von D.J. Hockley 1988 mit einem Transmissionselektronenmikroskop aufgenommen. Es stellt das HI-Virion aus einer CEM und HTLVIII B Co-Kultur dar [18]. Abbildung **B** zeigt eine schematische Darstellung eines HIV-Partikels. **a**: gp120; **b**: gp41; **c**: Doppellipidmembran; **d**: virusspezifische Matrixproteine; **e**: Nukleokapsid p24; **f**: Integrase; **g**: reverse Transkriptase; **i**: Virus-RNA; **h**: Protease

Das Virion besteht aus einer Doppellipidmembran, welche zwei RNA-Moleküle sowie die für die Integration in das Wirtsgenom wichtigen Enzyme umschließt [Abbildung 2]. Die Doppellipidmembran, welche vom Aufbau her derjenigen der zuvor befallener Wirtszellen entspricht, enthält neben den MHC-Proteinen (major histocompatibility complex) des Wirtes das sogenannten Envelope Protein (*env*). Dieses Glykoprotein besteht aus dem extramembranösen Anteil *gp120* und einem intramembranösen Anker, dem *gp41* [16]. Der extramembranöse Anteil interagiert mit

dem 7-Transmembran-Rezeptor *CD4* der Wirtszelle und den Korezeptoren *CXCR4*, *CCR5*. Kommt es zum Andocken des Virions an diese Rezeptoren, so vermittelt das *gp41* die Fusion von Partikel und Wirtsmembran und ermöglicht somit das Einschleusen des Virusinhalt in das Zytoplasma [14, 15].

Gen		Genprodukt/ Funktion
gag	Gruppenspezifisches Antigen	Protein für Virusmatrix
pol	Polymerase	Reverse Transkriptase, Protease und Integrase
env	Virushülle, (engl. <i>envelope</i>)	Transmembranmoleküle mit Subeinheiten gp120 und gp41
tat	Transaktivator	Transkriptionsverstärker
rev	Regulator der viralen Expression	ermöglicht Export ungespleißter RNA
vif	Infektiösität des Virus	beeinflusst Infektiösität des Virions
vpr	virales R-Protein	DNA-Transport in den Zellkern
vpu	virales U-Protein	stimuliert intrazellulären Abbau von CD4
nef	negativer Kontrollfaktor	verstärkt virale Replikation des Virus

Tabelle 1 : Proteine des HIV

Hier aufgelistet sind die auf der HIV-RNA sequenzierten Gene mit ihren entsprechenden Proteinen und Funktionen (Los Alamos HIV Database 2013) [17].

Jedes Virion enthält zwei von jeweils einer LTR-Region (long terminal repeat) flankiertes RNA-Moleküle, welche in Tabelle 1 aufgelistete Gene sequenzieren [18]. Die virale RNA ist neben der Integrase (p32), Protease (p10) und der reversen Transkriptase (p64) von einem Nukleokapsid (p24) umschlossen. Darüber hinaus gibt es noch weitere virusspezifische Matrixproteine, wie das *gag* (p17).

Entsprechend der derzeitigen Lehrmeinung wird die Infektion von myeloischen und lymphatischen Zelllinien durch das HIV über die Wechselwirkung des Virushüllenproteins (*env*) mit dem T-Zell-Rezeptor *CD4* und den Chemokinrezeptoren *CXCR4* und *CCR5* ermöglicht. X4-Stämme der Viren benötigen zur Fusion mit der Zellmembran den Korezeptor *CXCR4*, der auf aktivierten und ruhenden T-Zellen zu finden ist. R5-Stämme interagieren dagegen mit dem Korezeptor *CCR5*, welcher hauptsächlich auf HPCs aber auch T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird [19, 20]. Die reverse Transkriptase beginnt nach der Fusion die virale RNA in cDNA umzuschreiben, welche mit Hilfe einer Integrase in das Wirtsgenom als Provirus integriert wird. Von hier an ist entscheidend, in welchem Aktivitätsgrad sich die Zelle zum Zeitpunkt der Integration befindet. In ruhenden T-Zellen, Makrophagen oder dendritischen Zellen hat die Integration keine direkten Folgen für die Zelle (latente Infektion). In aktivierten T-Lymphozyten wird durch das *tat*-vermittelte Einschleusen der Proteinphosphatase 1A (*PPIA*) in den Nukleus die Zyklin-abhängige Kinase 9

(CDK9) aktiviert. Am 5'-Ende der Transkriptionsaktivierungsregion (TAR) des *LTR* vermittelt das phosphorylierte CDK9 die Bindung und Aktivierung des Transkriptions-Komplexes, bestehend aus den zellulären Transkriptionsfaktoren *NFκB* (nuclear factor kappa B), *NFAT* (nuclear factor of activated T-cells) sowie der RNA-Polymerase II [Abbildung 3] [21].

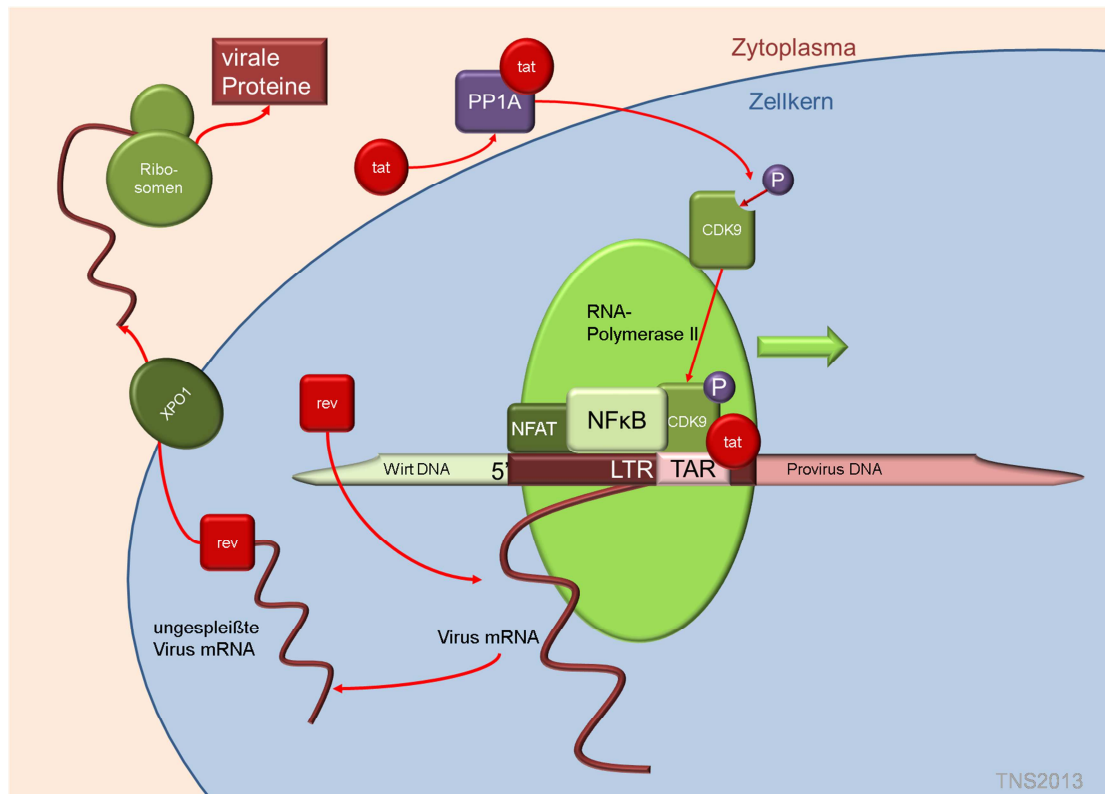


Abbildung 3: HIV-Transkriptionskomplex

Schematische Darstellung des Transkriptionskomplexes im Nucleus (blau) einer mit HIV-infizierten Zelle. Das *tat*-Protein vermittelt den Transport der im Zytoplasma (rosa) befindlichen PP1A in den Nucleus, wo diese die CDK9 durch Phosphorylierung aktiviert. Die aktivierte CDK9 kann so den Transkriptionskomplex und damit die Produktion viraler mRNA aktivieren. Ungespleißte virale mRNA gelangt durch den *rev*-vermittelten Transport über das Exportin-1 (XPO1) in das Zytoplasma. Dort wird diese RNA in virale Proteine translatiert. PP1A= Proteinphosphorylase 1A; P= Phosphatgruppe; CDK9= Cyclin-abhängige Kinase 9, NFAT= Nuklearer Faktor der aktivierten Transkription, LTR= lange terminale repetitive Sequenz

Da in eukaryoten Zellen keine ungespleißte mRNA den Zellkern verlassen kann, bestimmte Proteine, wie das *gag* oder *pol*, jedoch nur von ungespleißter mRNA translatiert werden, wird das Ausschleusen dieser RNA aus dem Zellkern über das zelluläre Exportin-1 (*XPO1*) durch das *rev*-Protein vermittelt [22]. *Rev* reguliert außerdem den Zeitpunkt der Virusfreisetzung aus der Zelle. Während zu Beginn nur niedrige Konzentrationen des *rev*-Proteins vorhanden sind, wird hauptsächlich

gespleißte mRNA translatiert, welche unter anderem *rev* und *tat* codieren. Die Expression von *rev* führt dadurch letztendlich zu einem starken Anstieg dieser beiden Proteine, welche ihrerseits die Bildung der übrigen Proteine im späten Infektionszyklus ermöglichen, an dessen Ende die erneute Freisetzung frischer Virionen steht [Abbildung 4][23].

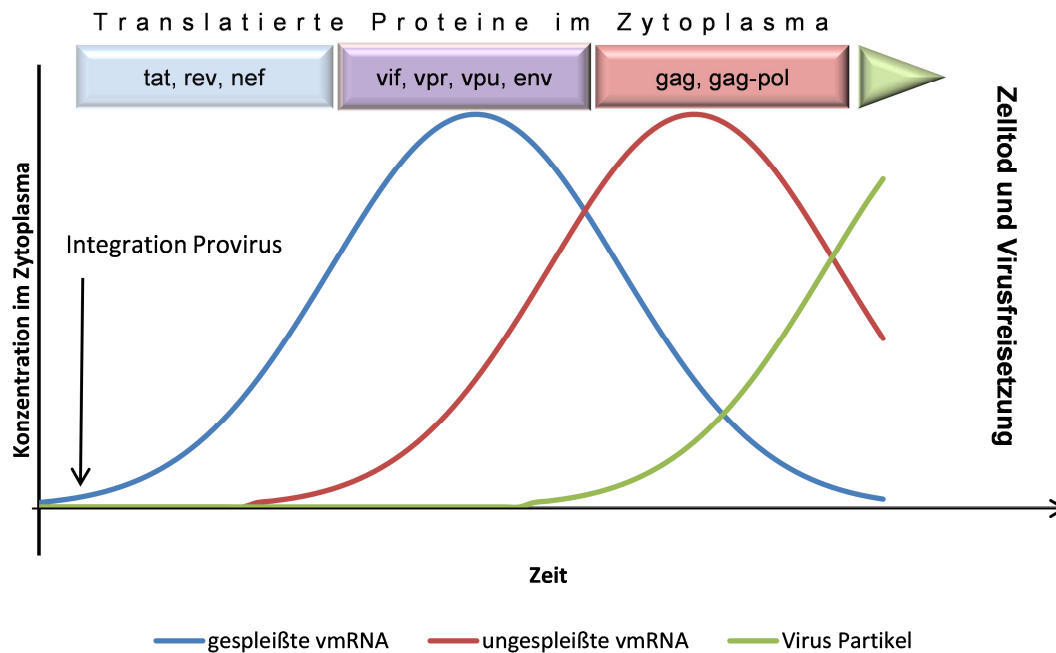


Abbildung 4: Konzentration von Virus mRNA und Partikeln im Zuge der HIV-Infektion

Schematische Darstellung der mRNA Konzentrationsänderungen von gespleißter und ungespleißter viraler mRNA (vmRNA) im Zytoplasma im Verlauf einer HIV-Infektion beginnend von der Integration des Provirus im Wirtsgenom. Über den Kurven stehen jeweils die viralen Proteine, die in der jeweiligen Phase hauptsächlich an den Ribosomen synthetisiert werden. Dabei werden *tat*, *rev* und *nef* aus mehrfach gespleißter und *vif*, *vpr*, *vpu* und *env* aus einfach gespleißter vmRNA synthetisiert.

1.4 Zelluläre Reservoirs des HIV-1

Das humane Immunschwäche-Virus Typ 1 (HIV-1) infiziert als Verursacher des erworbenen Immunschwäche-Syndroms (Acquired Immune Deficiency Syndrom, AIDS) hauptsächlich Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Hierzu zählen unter anderem T-Lymphozyten vom Helfertyp, Monozyten und Makrophagen. Trotz der Entwicklung vieler neuer Medikamente zur hochwirksamen anti-retroviralen Therapie (highly active anti-retroviral therapy, HAART), stellt die Fähigkeit des Virus zur Immunevasion und Persistenz in zum Teil noch unbekanntem Reservoir eine große Herausforderung in der Eradikation aus dem Organismus dar. Obwohl die Analyse des Serums von Patienten, welche sich einer HAART unterziehen, vielversprechende

Ergebnisse bezüglich der Anzahl der Lymphozyten und Viruspartikel ergaben [24], lassen Langzeitstudien vermuten, dass monozytäre Zelllinien, wie dendritische Zellen oder Makrophagen, ein mögliches Langzeitreservoir für das Virus darstellen [25]. Es gibt außerdem fundierte Hinweise darauf, dass der Zellzyklus, in welchem sich T-Lymphozyten befinden, beeinflusst, ob diese der Vermehrung des Virus oder als dessen Reservoir dienen. So wird zwischen aktivierten, ruhenden (G_1) und stillen (G_0) T-Lymphozyten differenziert [26]. Während dem Virus der Eintritt auch in ruhende T-Lymphozyten gelingt, ist sowohl die Integration in das Wirtsgenom als auch die aktive Produktion und Freisetzung der Viruspartikel den aktiven T-Lymphozyten vorbehalten [27] [Abbildung 5].

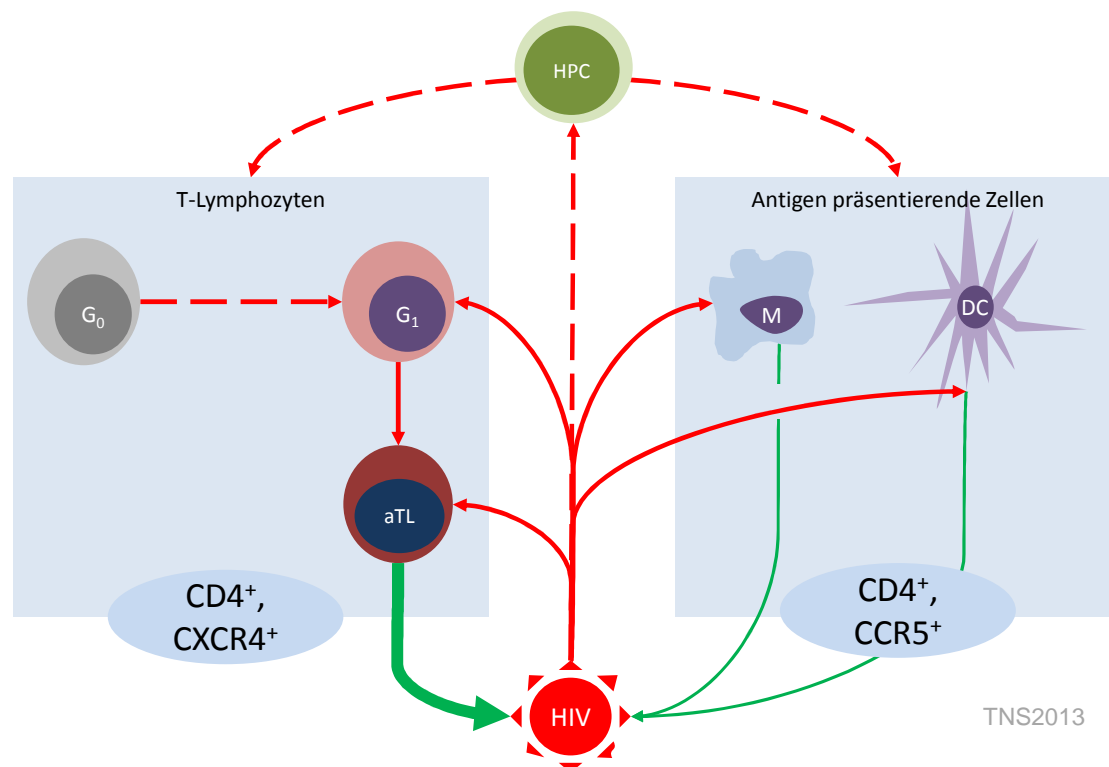


Abbildung 5: Mögliche Reservoirs im menschlichen Organismus

Es gilt als nachgewiesen, dass es HI-Virenstämme gibt, die neben den T-Lymphozyten (TL) auch Antigen-präsentierende Zellen (APC), wie Makrophagen (M) und dendritische Zellen (DC) befallen. Letztere sind in der Lage durch Migration zu den Lymphknoten das Virus an T-Lymphozyten weiterzugeben (durchgezogene rote Linie). Während in den aktivierten TL (aTL) die Virusproduktion und damit der daraus folgende Zelltod im Vordergrund steht (dicker grüner Pfeil), stellen die APCs, die inaktiven TL (im Stadium G_0 und G_1) und die hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPC) mögliche Reservoirs zur Unterhaltung der Infektion dar. Die Virusproduktion spielt bei ihnen eine untergeordnete Rolle (dünne grüne Pfeile). Die gestrichelten Linien stellen noch nicht endgültig gesicherte Transmissionswege dar.

Ein weiterer Einflussfaktor für die Integrationsfähigkeit und Vermehrung des Virus ist der Differenzierungsgrad der Zellen. Betrachtet man die Empfänglichkeit für HIV-1

der im Blutkreislauf zirkulierender hämatopoetischer Vorläuferzellen (HPC), bei denen die Oberflächenrezeptoren *CD4*, *CCR5* und *CXCR4* exprimiert sind [28], kann man keine Integration oder produktive Infektion nachweisen, obwohl in HIV-Infizierten ein früher Verlust dieser CD34-positiven HPCs durch reduziertes Teilungsvermögen und erhöhte Apoptoseraten nachgewiesen wurde [29, 30]. Bis heute ist nicht zweifelsfrei geklärt, ob die HPC-Zellen eine produktive HIV-Infektion unterhalten [31, 32]. Erst in frühen Differenzierungsprodukten der HPCs wurden bisher produktive Infektionen mit dem Virus nachgewiesen [33].

1.5 Zelllinien mesenchymalen Ursprungs als Wirtszelle des HIV-1

Mesenchymale Stammzellen besitzen neben ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung das Potential, sich in unterschiedlichste Zelllinien zu differenzieren. Sie könnten daher die Grundlage für Stammzelltransplantationen und Gentherapien bilden. Diese Stammzellen werden in den meisten Geweben des menschlichen Körpers gefunden, unter anderen im Knochenmark, in den Muskeln, in der Haut aber auch im Fettgewebe. Die MSCs des Fettgewebes, auch adipose derived stem cells (ASC) genannt, besitzen das Potential sich ähnlich wie mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarkes (bone marrow derived stem cells, BMSC) zu Neuronen, Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren [5, 8, 34-37].

Da es dem HIV gelingt, trotz intensiver medikamentöser Suppression der Viruslast im Serum, sich erneut zu vermehren und dadurch die Infektion aufrechtzuerhalten, haben sich Studien bereits früh mit möglichen Reservoirs des Virus beschäftigt [38]. Hierbei wurden unter anderen Makrophagen und naive CD4-positiven T-Zellen als mögliche Rückzugsorte für HIV identifiziert [39]. Auch die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarkes (BMSC), welche wichtige Funktionen in der Hämatopoese übernehmen, rückten schnell in den Fokus von wissenschaftlichen Studien. Diese ergaben unter anderem, dass eine Infektion mit R5-Stämmen des HIV in BMSC und anderen Zellen mesenchymalen Ursprungs (z.B. Fibroblasten, Endothelzellen) in peripheren Organen möglich sei [6, 40-42]. Dennoch wurde in keinem dieser Fälle *in vivo* die Integration des Pro-Virus in die Wirts-DNA dokumentiert. Nur bei *in vitro* Infektionen von Langzeitkulturen des Knochenmarkes gelang der Nachweis einer produktiven Infektion, wobei sich hier die Frage stellt, ob in den Kulturen ansässige Makrophagen und nicht die mesenchymalen Zelllinien die Grundlage für die

Virusreplikation darstellten [43-45]. Eine Studie von Wang et al. zeigt zwar, dass reine Kulturen von BMSCs keine produktive Infektion aufrechterhalten, es jedoch nach Zugabe von T-Lymphozyten zu HIV-exponierten BMSCs in kürzester Zeit wieder zu einer Zunahme der Viruslast in der Kultur kommt. Die anschließende Analyse der Stammzellen mittels PCR und FISH (Fluoreszierende In Situ Hybridisierung) belegte die Integration der Provirus-DNA. Des Weiteren fiel eine deutliche Abnahme der Differenzierungs- und Expansionspotentiale der Kulturen auf, was nahelegt, dass eine Interaktion der Stammzellen mit dem Virus stattfand [46]. Dasselbe stellte die Arbeitsgruppe um Lawrence in humanen multipotenten Progenitorzellen fetaler Gehirne fest [47].

Bei mesenchymalen Stammzellen anderer Gewebe, wie zum Beispiel des Fettes, wurde bisher jedoch nicht untersucht, ob das Virus in die Zelle oder ihre Differenzierungsprodukte eindringt und eventuell sogar ähnlich produktive Infektionen wie in myeloischen oder lymphatischen Zellen unterhalten kann. Es ist daher wichtig, ASCs, welche ubiquitär in den Blutgefäßen aller Organe gefunden werden, dahingehend zu untersuchen. Erst vor kurzem zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass diese Zellen das Potential besitzen, sich in Makrophagen-ähnliche Zellen zu differenzieren [9]. Wie bereits angeführt, spielen Makrophagen und Monozyten besonders in der Aufrechterhaltung der HIV-Infektion eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zu T-Lymphozyten wurde bei Makrophagen eine Resistenz gegenüber den zytopathischen Effekten der Virusinfektion beobachtet. Damit einhergehend wurde ferner die Möglichkeit, das Virus für längere Zeit zu beherbergen, festgestellt [48-50].

1.6 Angeborene Immunität gegenüber dem HI-Virus

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln erwähnt, ist die Immunevasion des Virus eine seiner herausragenden Eigenschaften, die es dem menschlichen Immunsystem fast unmöglich macht, diesen zu bekämpfen [Kap. 1.3, Seite 3, Kap. 1.4, Seite 7]. Dennoch gibt es Individuen, deren Immunsystem die Infektion besser zu kontrollieren vermag oder sogar unterbinden kann. Gene, die Proteine kodieren, welche dies vermögen, werden als ARGs (*AIDS restricting genes*) bezeichnet. Bis heute sind eine Vielzahl solcher Faktoren bekannt geworden, wie z.B. das *KIR3DS1* (killer cell immunoglobulin-like receptor, 3 domains, short cytoplasmic tail 1), bestimmte HLA-Typen (human leucocyte antigen) oder Varianten der HIV-Korezeptoren *CCR5*,

CXCR4 und deren Liganden [51]. Nach bisheriger Lehrmeinung benötigt das Virus zum Eindringen in die Zellen nicht nur den CD4-Rezeptor, sondern auch einen Korezeptor, wie den CCR5- oder den CXCR4-Rezeptor. Während das Virus am CCR5-Rezeptor mit den natürlichen Liganden *RANTES*, *MIP-1 α* bzw. *MIP-1 β* konkurrieren muss, kann am CXCR4-Rezeptor der Ligand *SDF-1 (CXCL12)* die Bindung verhindern [52]. Außerdem zeigte eine Studie aus dem Jahr 1998, dass eine Mutante des *SDF-1* die Konversion der X4-Viren zu R5-Viren am Beginn der Erkrankung behindern kann [53].

Den effektivsten Schutz gegen eine HIV-Infektion bietet jedoch eine Mutation des CCR5-Rezeptors (*CCR5 Δ 32*), welche in Mitteleuropa für dieses Allel eine Frequenz von ca. 10% der Gesamtbevölkerung ausmacht [54]. Während heterozygote Menschen einen verzögerten Beginn und eine verlangsamte Progression des AIDS aufweisen, sind homozygote Menschen immun gegen das R5-Virus [55]. Der Wildtyp von *CCR5* ist ein 7-Transmembran-Rezeptor, der im Falle der Deletion des 32. Basenpaares nur vier Transmembransegmente aufweist und damit intrazellulär verbleibt. Dies bedeutet für Menschen, welche diese Mutation auf beiden Allelen aufweisen, dass sie keinen funktionsfähigen CCR5-Rezeptor an ihren Zelloberflächen exprimieren [55, 56]. Diese Eigenschaft des Rezeptors hat bis heute vielen Studien zu neuen Therapieansätzen gegen das HI-Virus als Vorlage gedient. Als Beispiel seien hier die Arbeiten von Perez et al. und Holt et al. genannt, denen es gelang durch eine Zinkfinger Nuklease *CCR5*-negative T-Helferzellen bzw. *CD34*-positive hämatopoetische Progenitorzellen *in vivo* zu generieren [57, 58]. Die einzige erfolgreiche klinische Anwendung dieses Prinzips bleibt bisher der eingangs erwähnte Therapieversuch der Ärzte an der Charité Berlin, in welchem die Transplantation von peripheren Stammzellen eines homozygoten *CCR5 Δ 32*-positiven Spenders zur Serokonversion des zuvor HIV-positiven Empfängers führte [59, 60].

1.7 Aufgabenstellung dieser Studie

Das hämatopoetische Differenzierungspotential der ASCs bewegte uns dazu, eine Studie zu entwerfen, welche die Auswirkungen einer HIV-Exposition in den undifferenzierten Zellen sowie den hämatopoetisch differenzierten ASCs (HD-Zellen) untersucht. Besonders sollte die Frage beantwortet werden, ob das Provirus sich nach Exposition in der genomischen DNA von ASCs, welche weder einen CCR4- noch

CCR5-Rezeptor aufweisen, nachweisen lässt. Nachdem sich bereits eine vorhergehende Studie unserer Arbeitsgruppe [9] mit der Charakterisierung der HD-Zellen beschäftigt hat, ist es das Ziel der hier vorgelegten Untersuchung, die HIV-Korezeptoren und -faktoren sowie mögliche native Abwehrmechanismen der HD-Zellen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die Studie unterteilt sich in drei Abschnitte, in denen die *adipose derived mesenchymal stem cells* (ASCs) im manipulierten beziehungsweise nativen Zustand und im Hinblick auf ihre Wechselwirkungen mit dem Virus untersucht werden [Abbildung 6]. Die im ersten Abschnitt beschriebenen Untersuchungen beziehen sich hauptsächlich auf die Charakterisierung der ASCs im Hinblick auf ihre Eignung als mögliche hämatopoetische Stammzellen.

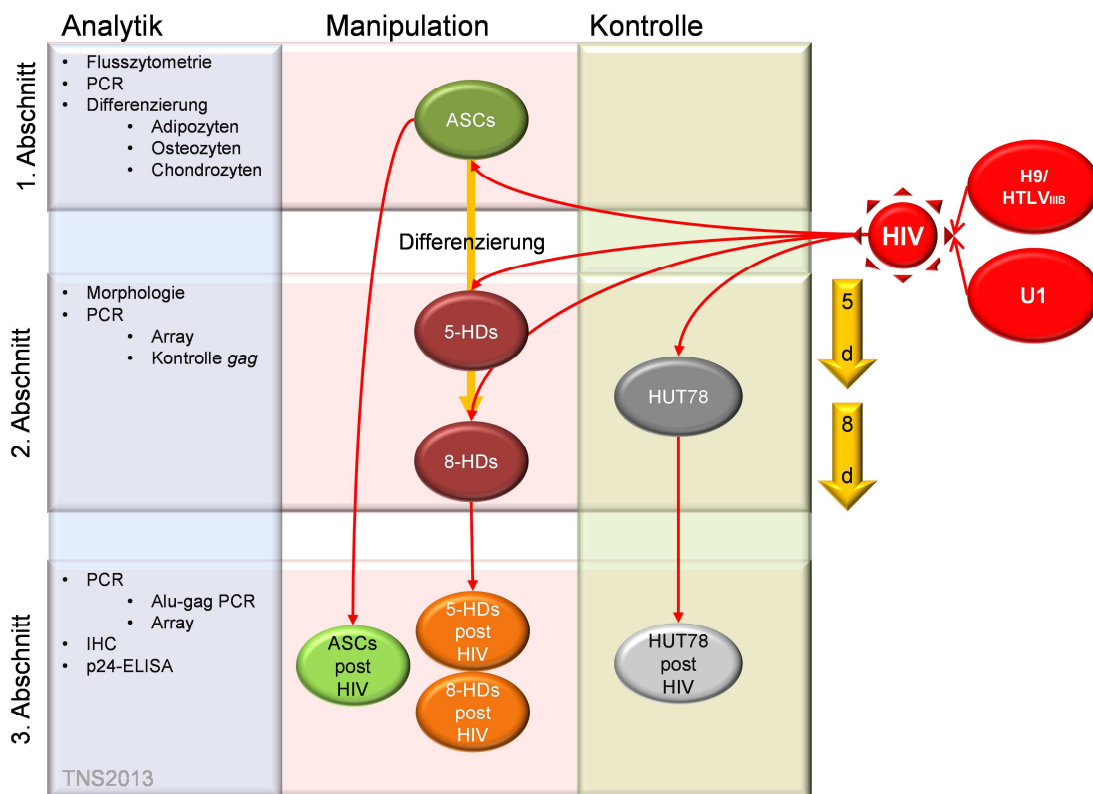


Abbildung 6: Schematischer Versuchsaufbau

Die Studie besteht aus drei Abschnitten (rosa). 5-HDs= 5 Tage Stimulation zur hämatopoetischen Differenzierung, 8-HDs= 8 Tage Stimulation zur hämatopoetischen Differenzierung, IHC= Immunhistochemie, d= Tag

Es wurde das transkriptionale Profil der ASCs mit Schwerpunkt auf die in der HIV-Infektion involvierte Proteine erstellt. Ferner wurden ihre Eigenschaften als mesenchymale Stammzellen durch Differenzierung in eine Auswahl der wichtigsten mesenchymalen Zelllinien (Osteozyten, Adipozyten und Chondrozyten) untersucht. Im Übergang zum zweiten Abschnitt wurden die ASCs durch die bereits von

Freisinger et al. [9] beschriebene Stimulation für jeweils fünf bzw. acht Tage hämatopoetisch differenziert (HD-Zellen, HDs).

Im zweiten Abschnitt wurde das Transkriptom der HD-Zellen im Bezug auf Proteine mit möglichen HIV-Wechselwirkungen mittels PCR-Arrays und im direkten Vergleich mit den ASCs untersucht. HD-Zellen, ASCs und als Kontrolle die immortalisierte T-Zelllinie HUT78 wurden mit einem zellfreien Zellkulturüberstand der HIV-1 produzierenden Zelllinie H9/HTLVIIIB sowie U1 inkubiert. HTLVIIIB-Zellen produzieren den X4-Stamm des HIV-1 Virus und U1-Zellen produzieren den R5-Stamm.

Im dritten Abschnitt wurden die Zellen nach der Exposition mittels ELISA und PCR auf eine aktive Virusproduktion hin untersucht. Zusätzlich wurden die ASCs, HD- und HTLVIIIB-Zellen auf eine mögliche Intergration des Provirus mittels nested PCR getestet.

2.2 Methodik

2.2.1 Allgemeines

Zur Gewinnung der ASCs für eine Stammzellbank wurden im Applied Stem Cell Laboratory der Tulane University in New Orleans, USA, über die vergangen fünf Jahre Fettgewebeproben von Patienten gesammelt, welche im Rahmen eines kurativen oder kosmetischen operativen Eingriffes in der plastischen Chirurgie am Tulane University Hospital gewonnen wurden. Patientendaten, wie Alter, Rasse, Entnahmeort, Grunderkrankung sowie Indikation für den Eingriff, wurden anonymisiert mit einer Stammzellliniennummer in einer Datenbank registriert. Ein Auszug dieses Datensatzes für die in dieser Studie verwendeten Zelllinien ist in Tabelle 9 [Seite 34] hinterlegt. Die Entnahme der Gewebeproben und deren anonymisierte Registrierung in unserer Datenbank wurde mit Genehmigung des Institutional Review Board der Tulane University durchgeführt und geschah mit Einwilligung der Patienten.

2.2.2 Kultivierung und Gewinnung der Zellen

Direkt nach Erhalt der Gewebeproben wurden etwa 50g des Fettgewebes mit einer zweiprozentigen Penicillin/Streptomycin PBS-Lösung (phosphate buffered saline)

[Tabelle 7, Seite 32] gewaschen. Das Gewebe wurde manuell mit sterilem, chirurgischem Instrumentarium zerkleinert und in einer 20 ml Kollagenase-Lösung [Tabelle 7] für 45 Minuten, bei 37 Grad Celsius und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das so fragmentierte Gewebe bei 1800 rpm (Rotationen pro Minute) für vier Minuten zentrifugiert und die Zellsuspension von den Geweberesten getrennt. Zur weiteren Reinigung der Zellsuspension wurde diese mit einem Zellfilter (Porengröße 0,22 µm) von kleineren Geweberesten befreit und ein weiteres Mal bei 1800 rpm für vier Minuten zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde zur Entfernung der Erythrozyten für eine Minute mit einem Red Cell Lysis Buffer [Tabelle 7] der Firma Sigma Aldrich behandelt. Es folgten das zweimalige Zentrifugieren bei 1800 rpm, wobei die Zellpellets jedes Mal mit PBS-Lösung gewaschen wurden. Die so gewonnenen Zellen wurden daraufhin mit einem Kulturmedium (alphaMEM, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 20% Hitzeinaktiviertes FBS) [Tabelle 7] resuspendiert und für 24 Stunden bei 37 Grad Celsius und 5% CO₂ inkubiert. Die mesenchymalen Stammzellen hatten so die Gelegenheit sich an der Oberfläche der Kulturflaschen [Tabelle 7] festzusetzen. Die Stammzellen wurden durch regelmäßige Wechsel des Kulturmediums alle zwei Tage in T25-Zellkulturflaschen expandiert und beim Erreichen einer Zelldichte von 60-70% des Kulturflaschenbodens gesplittet. Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung [Tabelle 7] von der Plastikoberfläche gelöst, gewaschen und im Hämocytometer gezählt. Anschließend wurden die Zellen entweder direkt den Experimenten zugeführt oder mit einem Gefriermedium (50% FBS, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), 40% αMEM) versetzt in flüssigem Stickstoff bei -180 Grad Celsius konserviert. Als interne Qualitätskontrolle wurde regelmäßig eine Flusszytometrie der Trypsin-dissoziierten Zellen durchgeführt und auf die Zelloberflächenproteine CD105, CD90, CD44, CD34, CD45, CD4, CD11b und CD68 untersucht. Hierzu kam ein Beckmann-Coulter Epics FC500 Flusszytometer zum Einsatz [Tabelle 8, Seite 32].

Die Zellkulturen wurden nach dem ersten Splitten (Passage 0) mit einer Zelldichte von 1000 Zellen/cm² in T75-Zellkulturflaschen [Tabelle 7] ausgesät und mit dem Kulturmedium (alphaMEM) bei 37 Grad Celsius und 5% CO₂ inkubiert. Für die folgenden Experimente wurden die Zellen in der dritten Passage (vierte Teilung der Zellkulturen seit Isolierung aus dem Gewebe) den Experimenten zugeführt. Alle

Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Zellkulturbedingungen in Zellkulturkabinen mit LaminarFlow (Firma GIBCO, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

2.2.3 Differenzierung

2.2.3.1 Mesenchymale Differenzierung der ACSs

Die in der Studie verwendeten mesenchymalen Zelllinien wurden vor der Verwendung in den unten genannten Experimenten auf ihre Differenzierungsfähigkeit in Osteo-, Adipo- und Chondrozyten untersucht. Für die Differenzierungen wurden die im Applied Stem Cell Laboratory etablierten Protokolle verwendet. Die Differenzierungsmedien werden in Tabelle 2 und Tabelle 3 näher beschrieben.

Chemikalie	Konzentration	Firma	Katalognr.
Adipozytisches Differenzierungsmedium			
Dexamethason	0,5 µM	Sigma	D4902
Isobutylmethylxanthin	0,5 µM	Sigma	I5879
Indomethacin	50 µM	Sigma	I7378
Osteozytische Differenzierung			
Dexamethason	1 nM	Sigma	D4902
Ascorbat-2-Phosphat	50 µM	Sigma	A8960
β-Glyzerophosphat	2 mM	Sigma	G6376

Tabelle 2: Differenzierungsmedien

Die angegebenen Reagenzien wurden in den beschriebenen Konzentrationen dem Basismedium (α -MEM mit 20% hitzeinaktiviertem FBS, 1% Penicillin und 1% Streptomycin versetzt) zugefügt.

Für die Differenzierung zu Adipozyten wurden 50.000 ASCs in einer 6-well-Kulturschale unter Standardbedingungen [2.2.2, Seite 14] und dem Differenzierungsmedium [Tabelle 2] für 14 Tage inkubiert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Anschließend wurden die Zellen mit 10% Formalin fixiert und mit Oil Red gefärbt [Abbildung 7 D].

Chemikalie	Konzentration	Firma	Katalognr.
Bone Morphogenic Protein 6 (BMP-6)	33 nM	R&D Systems	507-BP-020
Transforming growth factor β -3 (TGF- β 3)	1 nM	R&D Systems	243-B3-002
Dexamethason	100 nM	Sigma	D4902
Ascorbat-2-Phosphat	50 mg/ml	Sigma	A8960
DL-Prolin	40 mg/ml	Sigma	171824
Pyruvat	100 mg/ml	Sigma	P2256
ITS premix Zellkultur Supplement (Insulin, humanes Transferrin, Selensäure)	50 mg/ml	BD Biosciences	354351

Tabelle 3: Chondrogenisches Differenzierungsmedium.

Die angegebenen Substanzen wurden DMEM mit 4,5 mg/ml Glukose zugegeben.

Die Differenzierung zu Osteozyten gelang durch die Aussaat von 30.000 Zellen in 6-well-Kulturschalen und Inkubation unter Standardbedingungen mit dem beschriebenen Differenzierungsmedium [Tabelle 2] für ebenfalls 14 Tage. Da im Gegensatz zu den Adipozyten die Osteozyten zur Zellteilung fähig sind, wurde die Aussaat mit einer geringeren Zelldichte notwendig. Das Differenzierungsprodukt wurde ebenfalls mit 10% Formalin fixiert und mit 40 millimolaren Alizarinrot-Lösung [Tabelle 7] gefärbt [Abbildung 7 C].

Bei der Differenzierung zu Chondrozyten kam das Protokoll der Gruppe um Sekiya [61] zum Einsatz. Hierfür wurden 200.000 ASCs als Pellet in einem 25 ml Falcon Zentrifugationsröhrchen [Tabelle 7] für 21 Tage in einem Differenzierungsmedium unter Standardkulturbedingungen [2.2.2, Seite 14] inkubiert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen vom Center for Gene Therapy der Tulane University mit 10% Formalin fixiert und in Paraffin gebettet. Nach Sektionierung (Schichtdicke 10 μm) und Färbung mit Toluidin Blau wurden die Knorpelscheiben auf Objektträger fixiert [Abbildung 7 B].

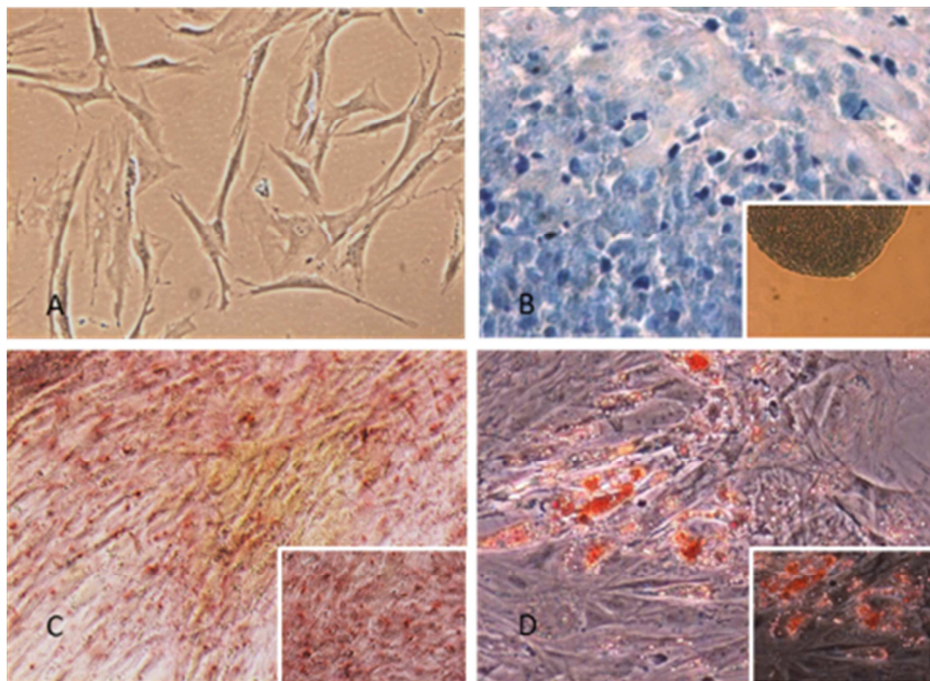


Abbildung 7: Mesenchymale Differenzierung

A: Native ASCs in PBS-Lösung (200-fache Vergrößerung); **B:** Knorpel, Formalin-fixiert und mit Toluidin Blau angefärbt (kleines Bild 40-fache Vergrößerung, großes Bild 400-fache Vergrößerung); **C:** osteogenetisches Differenzierungsprodukt, Formalin-fixiert und mit Alizarinrot gefärbt (kleines Bild 200-fache Vergrößerung, großes Bild 100-fache Vergrößerung); **D:** adipogenetisches Differenzierungsprodukt mit OilRed gefärbt (kleines Bild 200-fache Vergrößerung, großes Bild 100-fache Vergrößerung)

2.2.3.2 Hämatopoetische Differenzierung

Für die hämatopoetische Differenzierung wurden die Zellen junger, gesunder Patienten ausgewählt, welche nicht mehr als vier Passagen durchlaufen haben [Kapitel 2.4.1, Seite 33]. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $5000/\text{cm}^2$ in 6-well Kulturschalen ausgesät und mit einem Differenzierungsmedium versetzt, welches bereits zuvor im Applied Stem Cell Laboratory durch Eva Freisinger etabliert wurde [9]. Im Detail enthält dieses Medium neben alpha-MEM, 10% FBS und 2% Penicillin/Streptomycin $0,1 \mu\text{l/ml}$ 1-Monothioglycerol (MTG) als stimulierende Substanzen $100 \text{ U/ml IL-1}\beta$, 500 U/ml IL-3 und 20 U/ml M-CSF .

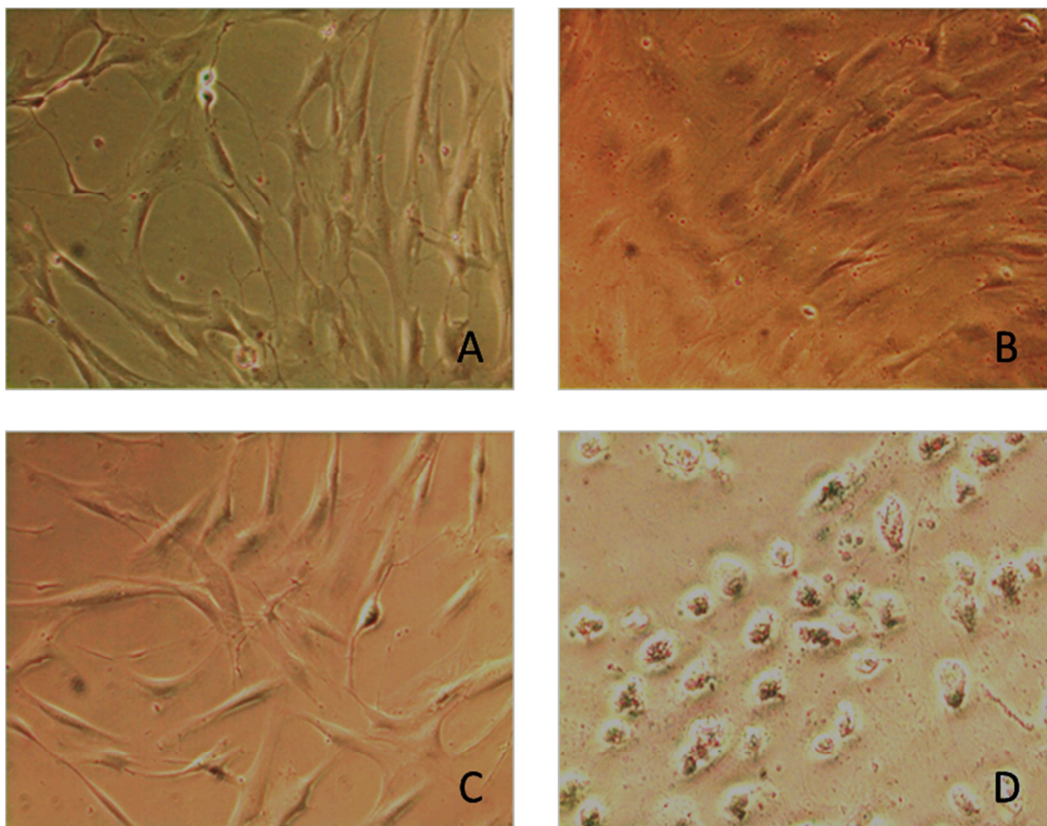


Abbildung 8: Hämatopoetische Differenzierung

Den ASCs (**A** und **C**) wurden bei einer Wachstumsdichte von 60 bis 70% das Differenzierungsmedium (untere Reihe) bzw. das Kontrollmedium (obere Reihe) zugefügt. **B** und **D** zeigen die Zellen nach neun Tagen. Man kann deutlich erkennen, dass die stimulierten Zellen ihre für Fibroblasten typische Spindelform und die Adhäsion zur Zellkulturflasche verloren haben (**D**). Alle Bilder wurden mit 200-facher Vergrößerung aufgenommen.

Aufgrund des konsekutiven Verlustes der Zelladhäsion zur Zellkulturflasche, wurde alle zwei Tage nur die Hälfte des Mediums ausgetauscht. [Abbildung 8 B und D]. Parallel wurden zur Kontrolle ASCs mit einem Medium versetzt, welches keine der

stimulierenden Substanzen enthielt [Abbildung 8 A und C]. Die differenzierten Zellen werden in der Folge als HD-Zellen (hämatopoetisch differenzierte Zellen) tituiert.

2.2.4 Infektion der Zelllinien mit HIV-1

Sämtliche Versuche, welche die Handhabung mit aktiven HI-Viren beinhalteten, wurden in den Räumen des BSL-2-Laboratoriums (biosafety level 2) des Institute of Pharmacology der Tulane University durchgeführt. Hier wurde, zusätzlich zu den ASCs und den HD-Zellen, die maligne T-Lymphozytenzelllinie HUT78 [Kap 2.4.2, Seite 34] mit Zellkulturüberständen der chronisch mit HIV-1 infizierten Zelllinien HTLV-III_B und U1 inkubiert. Diese Zellen wurden uns vom AIDS Research & Reference Reagent Program (Bethesda, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt [Kap. 2.4]. Die HUT78-Zellen wurden als Kontrolle gewählt, da ihre Suszeptibilität für das HIV-1 gut beschrieben ist. Die beiden Zelllinien wurden mit RPMI-Medium [Tabelle 7], versetzt mit 10% FBS und 2% Penicillin/Streptomycin, bei 37 Grad Celsius und 5% CO₂ kultiviert. Die für die Exposition verwendeten Viren wurden aus dem Überstand der HTLV-III_B-und U1-Zellen gewonnen. Die Überstände wurden bei einer Konfluenz der Zellkultur von 60% - 70% gesammelt und durch leichtes Zentrifugieren bei 1800 rpm für vier Minuten von Zellen und Zelltrümmern befreit. Anschließend wurden, wie im Folgenden geschildert, die *p24*-Titer mittels ELISA gemessen [Kap. 2.2.9, Seite 28]. Diese zellfreien, Virus enthaltenden Überstände wurden vor jeder Testreihe frisch angefertigt. Um eine konstante Virusbelastung von 10³ - 10⁴ TU (transducing Units) in den Zellkulturen zu erreichen, wurden die *p24*-Titer des Überstandes ermittelt und entsprechend verdünnt. Da bei einem Viruspartikel (Physical Particle, PP) von ca. 2000 Molekülen des *p24*-Proteins ausgegangen werden muss, ergibt sich für die Masse eines PP bei einer Masse von 24 kDa je *p24*-Moleküls [62]:

$$(2 \times 10^3 \text{ Moleküle}) \times (24 \times 10^3 \text{ Da } p24\text{-Protein}) = 48 \times 10^6 \text{ Da } p24\text{-Protein}$$

Daraus resultiert eine absolute molekulare Masse je PP, wobei ein Da einem g mol⁻¹ entspricht:

$$48 \times 10^6 \text{ g} \times \text{mol}^{-1} p24\text{-Protein} / 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1} \approx 8 \times 10^{-17} \text{ g } p24\text{-Protein}$$

Vereinfacht wird auf 1×10^{-16} g p24-Protein je PP aufgerundet, woraus sich folgende Menge an PP je gemessenem Pikogramm p24-Protein ableiten lässt:

$$1 \times 10^{-12} \text{ g p24-Protein} / 1 \times 10^{-16} \text{ g p24-Protein pro PP} = 10^4 \text{ PP je pg p24}$$

Bei lentiviralen Infektionen berechnet man das Verhältnis von viralen Partikeln zu infizierenden Zellen (Multiplicity of Infection, MOI). Anhand der Berechnung der Viruspartikel und den ausgesäten Zellen wurde die Menge an Überstand bestimmt, der für ein Verhältnis 1:10 (Virus:Zellen, 0,1 MOI) benötigt wird.

Die HD-Zellen wurden demnach jeweils nach fünf (5-HD) und nach acht Tagen (8-HD) für 24 Stunden mit dem Virus exponiert, während bei den HUT78-Zellen die logarithmische Wachstumsphase gewählt wurde. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde das gesamte Medium vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die Kulturen drei Mal mit PBS gewaschen, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits die Adhäsion zur Zellkulturflasche verloren hatten. Die Zellen wurden im weiteren Verlauf mit ihrem entsprechenden Medium weiter kultiviert. Jeweils drei und fünf Tage nach der Exposition wurden Proben des Überstandes mittels ELISA auf das p24-Protein untersucht.

2.2.5 Gewinnung von RNA, DNA und cDNA

Zur Gewinnung von mRNA, RNA und DNA wurden etablierte Kits verwendet, welche im Folgenden beschrieben werden. Die zu analysierenden Zellen wurden mittels Zählkammer quantifiziert, um eine konstante Anzahl an Zellen für die Gewinnung von genetischem Material zu gewährleisten.

Für die Isolation von RNA wurde das RNeasy Kit der Firma QIAGEN verwendet [Tabelle 4, Seite 30]. Bei diesem Verfahren werden die zu untersuchenden Zellpellets zuerst lysiert. Das Lysat wird im Mikrofilter zentrifugiert, anschließend von DNA und Proteinen gereinigt und die RNA ausgefällt. Im letzten Schritt wird die isolierte RNA durch Alkoholverdünnungsreihen gereinigt. Die Ausbeute wurde mithilfe eines UV-Spektrophotometers der Marke NanoDrop2000 (Thermo Scientific, Welmington, Delaware, USA) quantifiziert. Des Weiteren wurde, mit der Zielsetzung den Reinheitsquotienten zu bestimmen, die Absorption bei jeweils 260 und 280 nm gemessen. Es wurde ein 260/280-Absorptionsquotient von $2,0 \pm 0,1$ akzeptiert. Analog

hierzu verwendeten wir zur Isolation von nuklearer DNA das QIAmp DNA Mini Kit [Tabelle 4]. Auch hier wurde eine Quantifizierung und eine Qualitätskontrolle des gewonnenen Materials vorgenommen. Bei der DNA wurde ein Absorptionsquotient 260/280 nm von $1,8 \pm 0,1$ toleriert. Die gewonnene RNA wurde entweder direkt für die Synthese des cDNA verwendet oder bei -80°C gelagert. DNA-Proben wurden bei 4°C verwahrt.

Zur cDNA-Synthese wurde ein Kit der Firma Applied Biosystems verwendet [Tabelle 4]. Die Einzelkomponenten des Mastermixes werden dafür direkt vor der Synthese gemischt und zusammen mit $2\mu\text{g}$ RNA (Verhältnis RT Mastermix zu RNA 1:1) im iCycler inkubiert [Tabelle 8, Seite 32]. Der Mastermix stellt sich wie folgt zusammen:

2,0 μl 10 x Reverse Transkriptase Pufferlösung	
0,8 μl 25 x Desoxyribonukleotidtriphosphat Mischung (100 mM)	
2,0 μl 10 x eines Primergemisches mit zufällig erstellten Sequenzen	
1,0 μl MultiScribe TM Reverse Transkriptase	
1,0 μl RNase Inhibitor	
3,2 μl Nuklease-freies H_2O	
<hr/>	
10,0 μl 2 x RT Mastermix	

Nach dem Mischen der Komponenten in $200\mu\text{l}$ -PCR Reaktionsgefäßen und kurzem Zentrifugieren des Inhaltes wurde das Reaktionsgemisch unter folgenden PCR-Bedingungen inkubiert:

1. Schritt: 10 Minuten Inkubation bei 25°C
2. Schritt: 120 Minuten Inkubation bei 37°C (Aktivitätsoptimum der RT)
3. Schritt: 5 Minuten Inkubation bei 85°C (Inaktivierung der RT)
4. Schritt: Kühlung bei 4°C bzw. bei längerer Lagerung bei -20°C

Vor der Einlagerung bzw. Weiterverwendung der cDNA wurden spektralphotometrische Messungen der DNA-Konzentration und -Qualität vorgenommen. Ein Verhältnis des 260/280 von etwa $2,0 \pm 0,1$ wurde als Richtwert für reine DNA akzeptiert.

2.2.6 *Transkriptom- und DNA-Analyse*

2.2.6.1 *Allgemeines*

Die methodische Grundlage der Studie bildet die Analyse der Transkriptionsprodukte und der genomischen DNA. Hierfür wurden unterschiedliche Methoden, wie die real-time reverse transcriptase semiquantitative polymerase chain reaction (RT²-qPCR), die alu-gag nested PCR und die einfache PCR angewandt. Während die RT²-qPCR der Analyse des Transkriptoms diente, wurde die nested PCR angewandt, um das Provirus in den infizierten Zellen nachzuweisen. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese in einem zweiprozentigen Agarose-Gel.

Für das Gel wurden zwei Gramm Agarose (Invitrogen) [Tabelle 4, Seite 30] mit 100 ml TAE Pufferlösung gemischt und für eine Minute in der Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt. Die verdunstete Flüssigkeit wurde durch die Zugabe von Wasser kompensiert und das Gel mit 4 µl Ethidium-Bromid (10g/ml) versetzt. Das flüssige Gel wurde in entsprechende Formen gegossen und härtete bei Raumtemperatur innerhalb von 15 Minuten aus, bevor es in die mit TEA-Pufferlösung gefüllte Elektrophoresekammer gegeben wurde. 10 µl der Proben wurden mit 5 µl einer Farblösung versetzt und in die Kammern des Gels gefüllt [Tabelle 4; Tabelle 8, Seite 32]. Zur Bestimmung der PCR-Produktlängen wurde ein DNA-Längenstandard verwendet [Tabelle 4]. Vor der Elektrophorese wurde 8 µl Ethidium-Bromid am positiven Pol der Kammer hinzugegeben und eine Spannung von 85 Volt für 90 Minuten angelegt. Die Gele wurden unter UV-Licht mit dem Molecular Imager® (BIO-RAD) abgelichtet.

2.2.6.2 *Grundlagen der RT-qPCR*

Essentiell für die Proteinbiosynthese der Zelle ist das Auslesen des Bauplans der Proteine auf der genomischen DNA. Komplexe Regulationsmechanismen unterliegen diesem Prozess, an deren Ende die sogenannte messenger RNA (mRNA) steht, welche die Matrize für die Proteinsynthese an den Ribosomen bildet. In der Transkriptomanalyse wird dies genutzt, um mittels PCR mRNA-Moleküle nachzuweisen. Hierfür wird mit dem Retrovirus als Vorbild das Enzym reverse Transkriptase verwendet, welches die aus den Zellen isolierte RNA in komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) umschreibt und somit die PCR als zweiten Arbeitsschritt ermöglicht. Als diese Technik Mitte der 80er Jahre entwickelt wurde,

mussten die PCR-Produkte nach mehreren separaten PCR-Analysen aufwendig gelelektrophoretisch untersucht werden, um quantitative Aussagen über die vorhandenen Gene zu treffen. Heute ermöglicht die real-time RT-qPCR (real-time semiquantitative Polymerase Kettenreaktion mit reverser Transkriptase) unter Zuhilfenahme fluoreszierender Färbemittel bzw. Marker und den entsprechenden Detektionskameras, die Verfolgung der Amplifikation der cDNA in Echtzeit [63]. Passen die in der PCR verwendeten Primer auf einen cDNA-Strang des gesuchten Gens, so wird man eine exponentielle Zunahme des Signals bis zu einem Maximum erkennen, welches durch die begrenzte Anzahl an Nukleotiden im PCR-Gemisch erklärt wird. Entsprechend der Menge an isolierter mRNA aus den Zellen, wird das Fluoreszenzsignal nach bestimmter Anzahl an Replikationszyklen erreicht (CT, Threshold Cycle). Als externe Kontrolle für das zu untersuchende Gen werden die sogenannten Haushaltsgene (housekeeping genes) herangezogen. Diese sind durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

- Sie werden ubiquitär in allen Zellen exprimiert
- Ihre Expression wird durch die Experimente nicht beeinflusst

Hierfür bieten sich besonders Gene an, welche Proteine zur Aufrechterhaltung der Basisfunktionen der Zelle kodieren [64, 65]. Bei den in der Studie verwendeten Zellen hat sich das für den Zellstoffwechsel wichtige Enzym Glyzeraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als Haushaltsgen bewährt. In vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe des Applied Stem Cell Laboratory wurden für dieses Haushaltsgen die geringsten Schwankungen in der Expressionsrate nachgewiesen [8, 66-68]. Zur Quantifizierung der Expression wurde die weit verbreitete $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode verwendet [69, 70]. Dazu wird für jeden Primer der PCR-Zyklus bestimmt, wobei die Amplifikation der cDNA exponentiell verläuft (C_t , threshold cycle). Dieser wird daraufhin durch Abzug des C_t -Wertes des Haushaltsgens normiert (ΔC_t). Anschließend kann mit Hilfe der Differenz der ΔC_t -Werte ($\Delta\Delta C_t$) der unterschiedlichen Versuchsgruppen eine Aussage über die Abnahme oder Zunahme der Expression getroffen werden (semi-quantitativ). Hierzu wird der negative $\Delta\Delta C_t$ als Exponent von zwei genommen, wodurch man die relative Expressionsveränderung (RQ) verglichen zur Kontrollgruppe erhält [63]:

$$(1) \Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Kontrolle}} - \Delta C_{t \text{ Test}} = [C_{t \text{ Kontrolle}} - C_{t \text{ GAPDH(K)}}] - [C_{t \text{ Test}} - C_{t \text{ GAPDH(T)}}]$$

$$(2) RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

2.2.6.3 *RT² Profiler PCR ArrayTM*

PCR-Arrays der Firma SA Biosciences verschafften einen Überblick über das Transkriptomprofil der Zellen vor und nach den Experimenten [Tabelle 4, Seite 30]. Diese Arrays enthalten Platten mit 96 PCR Reaktionsgefäßen, in denen 84 Primer für mRNA-Moleküle integriert sind. Für deren entsprechenden Proteine ist die Beteiligung an der Wirt-Virus-Wechselwirkung bei der HIV-Infektion nachgewiesen worden. Zudem werden bei diesen Arrays als interne Kontrolle die Expression fünf verschiedener Haushaltsgene eingesetzt, deren gemittelte Summe für die Berechnung der Expressionsrate verwendet wird [71]. Die Berechnung der Expressionsraten wurde auf Grundlage der in Kapitel 2.2.6.2 genannten Formeln und der mitgelieferten Software, online zugänglich unter <http://www.sabiosciences.com>, durchgeführt. Die statistische Analyse fand in Kooperation mit dem Department of Biostatistics, Tulane University in New Orleans mit Zuhilfenahme der Statistiksoftware SPSS, Version 16.0.2, statt. Die Arrays untersuchten jeweils manipulierte und nicht manipulierte Zellen dreier Spender (HD, HD-HIV, ASC, ASC-HIV) sowie drei getrennt voneinander infizierten HUT78-Zellkulturen (HUT78-HIV). Die Mittelwerte der relativen Expressionsraten ($2^{\Delta\Delta CT}$) wurden als unabhängige Stichproben einer Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen und die Studienhypothese auf einem Signifikanzniveau von 5% geprüft.

Die PCR-Platten wurden mit 500ng per Reaktionsgefäß der gewonnenen cDNA sowie einem mit dem Array gelieferten Master-Mix bestückt und im *iCycler MyiQ* der Firma BioRad [Tabelle 8, Seite 32] nach dem vorgegebenen Protokoll inkubiert:

1. Denaturierung der DNA: 1 Zyklus von 10 Minuten bei 95°C
2. 40 Zyklen:
 - a. Denaturierung für 15 Sekunden bei 95°C
 - b. Annealing für 40 Sekunden bei 55°C und Messung der Fluoreszenz
 - c. Elongation für 30 Sekunden bei 72°C
3. Schmelzkurve mit 81 Zyklen und einem Temperaturanstieg von 0,5°C beginnend bei 55°C und einer Zykluslänge von 10 Sekunden zur Qualitätskontrolle. Messung der Fluoreszenz nach jedem Zyklus

Der Mastermix stellte sich wie folgt zusammen:

1350 μ l RT² SYBR Green Mastermix (SA Biosciences)
102 μ l cDNA in H₂O (enthält 500 ng cDNA)
1248 μ l RNase-freies H₂O

Die Arbeiten zum Erstellen dieser Reaktionsgemische fanden unter Abzügen statt, deren Oberflächen zur Vermeidung von Kontaminationen vor Arbeitsbeginn mit DNase- und RNase-haltigen Reinigungsmitteln gesäubert wurden.

2.2.6.4 RT-qPCR

Die Validierung einiger ausgewählter PCR-Ergebnisse der Arrays und der Nachweis der *gag*-mRNA erfolgten durch die gezielte RT-qPCR-Analyse. Analog zum Funktionsprinzip des Arrays wurde zur Durchführung der PCR ein Reaktionsgemisch der Firma BioRad und Primer der Firma realtimeprimers.com genutzt. Als Detektionsmethode der replizierten cDNA-Stränge diente SYBR-Green. Das PCR-Protokoll wurde den Schmelztemperaturen (T_m) der jeweiligen Primer angepasst beziehungsweise beim Entwurf der Primersequenzen auf eine einheitliche T_m geachtet. Wie im allgemeinen Teil beschrieben, wurde die relative Genexpression mit den C_T -Werten des GAPDH als Haushaltsgen berechnet. Die verwendeten Primer mit ihren Sequenzen sind in Tabelle 5 [Seite 30] aufgeführt. Die RT-PCR-Analysen wurden jeweils an Zellen vierer unterschiedlicher Spender durchgeführt und nach dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Vorgehen analysiert.

2.2.6.5 Nested-PCR

Eine der grundlegenden Herausforderungen beim Nachweis der Integration des Provirus in das chromosomale Genom ist, dass bei der herkömmlichen PCR nicht nur integrierte sondern auch isolierte HIV-DNA amplifiziert wird. Während bei den HD-Zellen oder auch den HUT78s die aktive Virusproduktion durch die p24-Assays und die RT-PCR der viralen RNA nachgewiesen wurde, war es nicht möglich, die Integration in undifferenzierte ASCs zu untersuchen. Um bei Zellen, welche keine aktive Virusproduktion betreiben, zu belegen, dass das Provirus in ihrem Genom integriert ist, musste daher ein anderes Verfahren herangezogen werden. Neben der FISH bot sich die Durchführung einer sogenannten nested PCR an. Bei diesem Verfahren, das erstmals durch Chun et al. 1997 beschrieben wurde, wird in einem

ersten Schritt der PCR ein Reverse-Primer für eine im HIV-Genom gelegene Sequenz und ein Forward-Primer für eine im Wirtsgenom gelegene Sequenz gewählt. Das menschliche Genom bietet durch seine vielen repetitiven Sequenzen die Möglichkeit, einen Primer für eine solche Sequenz zu wählen. Damit einher geht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass das Provirus in der Nähe einer solchen Sequenz integriert ist [38, 72]. Die Alu-Familie stellt die häufigste repetitiven Sequenz dar und wird bei der nested PCR als Anker für das humane Genom verwendet, während beim HIV-Genom ein *gag*-Primer zum Einsatz kommt [Primer siehe Tabelle 5] [73].

In einem zweiten PCR-Schritt werden Zielsequenzen amplifiziert, welche spezifisch für das HI-Virus sind. In diesem Fall wurden Sequenzen gewählt, die innerhalb der LTR-Sequenz des Virus (long-terminal-repeat) liegen. Um unterschiedliche Varianten des HI-Virus erfassen zu können, wurden drei verschiedene Varianten der sogenannten RU5-Sequenz gewählt (wildtype, degenerate 1 und degenerate 2). Hat eine Integration stattgefunden, kommt es durch die Bindung des Forward- und Reverse-Primers zu einem exponentiellen Anstieg der Amplifikationsprodukte. Das PCR-Produkt steigt dagegen nur linear an, wenn ausschließlich Einzelstrang-DNA des Virus vorhanden ist. Diese Vorgehensweise lässt die Detektion sowohl der integrierten als auch der nicht integrierten viraler DNA zu, wobei die integrierte ein weitaus stärkeres Signal in der gelelektrophoretischen Darstellung erzeugt.

Für die Studie wurde das Protokoll von Liszewski et al. übernommen [72]. Abweichend von diesem Protokoll wurde für die Detektion der PCR-Produkte kein quantitatives Verfahren, sondern die Darstellung in einem zweiprozentigen Agarose-Gel vorgenommen.

Die genomische DNA von HIV-exponierten ASCs und HD-Zellen wurde dafür isoliert und nach dem oben genannten Prinzip einer PCR unterzogen. Als positive Kontrolle wurden chronisch infizierte HTLVIIIBs und als Negativkontrolle nicht manipulierte ASCs und HUT78-Zellen gewählt.

2.2.7 Immunhistochemie

Zur Validierung der Translation von wichtigen Zelloberflächenrezeptoren wurde eine immunhistochemische Färbung der Zellen vorgenommen. Die hämatopoetische Differenzierung und Kultivierung der Zellen wurde in 6-well-Kulturschalen

durchgeführt. Am achten Tag der Differenzierung wurden die Zellen, welche zu diesem Zeitpunkt bereits ihr Adhäsionsfähigkeit verloren hatten, zwei Mal mit PBS gewaschen und als Zellsuspension mit Hilfe des Shandon Double Cytofunnel (Thermo Scientific) durch Zentrifugieren auf einen extra adhäsiven Objektträger (X-tra[®] Slides, Leica) gebracht [Tabelle 7, Seite 32]. Dort wurden sie mit Paraformaldehyd fixiert sowie die Oberflächenproteine *CCR5*, *CXCR4*, *CD4*, *iNOS*, *CCR4* und beta-Aktin mit Maus- und Rattenantikörpern markiert [Tabelle 6, Seite 31]. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Die Zellen wurden in einer 1%igen PFA-Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in einem PBS-Bad gewaschen
2. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen für 15 Minuten in einer 0,05%igen Triton-X 100 Lösung in PBS bei Raumtemperatur inkubiert und in einem PBS-Bad gewaschen
3. Im letzten Schritt wurde eine 4%ige PFA-Lösung für 10 Minuten auf die Zellen gegeben und im Anschluss eine zweimalige Waschung mit PBS vorgenommen

Den so fixierten Zellen wurde vor Inkubation mit einem primären Antikörper für eine Stunde ein Blockungspuffer mit Ziegen Serum zugefügt, um eine spätere unspezifische Bindung der fluoreszierenden Ziegenantikörper zu verhindern. Alle sekundären Antikörper wurden aus Ziegen Serum gewonnen. Die so geblockten Zellen wurden über Nacht (ca. acht Stunden) in einer Feuchtkammer bei 4°C mit dem primären Antikörper [Tabelle 6] inkubiert. Am nächsten Tag folgte eine zweimalige Waschung. Die Inkubation mit einem sekundäre Antikörper [Tabelle 6, Seite 31] wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen ein letztes Mal mit PBS gewaschen. Zur Konservierung wurde ein Mounting-Medium der Firma Sigma-Aldrich (Fluoroshield[™] with DAPI) [Tabelle 6] auf die Zellen aufgebracht und diese mit einem Deckplättchen abgedeckt. Das Mounting-Medium ist mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen DNA und RNA versetzt, welcher ein Fluoreszenzsignal im Bereich von 460 nm (blau) emittiert und die selektive Darstellung des Nukleus ermöglicht. Das Fluoreszenzsignal wurde mit Hilfe eines Leica TCS SP-2 Confocal Mikroskops [Tabelle 8, Seite 32] bei einer 630-fachen Vergrößerung aufgenommen und mit der Leica Confocal Software analysiert und aufgearbeitet [Abbildung 19, Seite 47].

2.2.8 *Fluorsszytometrie*

Zur Qualitätssicherung wurden die aus dem Fettgewebe isolierten Stammzellen vor der Verwendung in den entsprechenden Experimenten einer flusszytometrischen Untersuchung unterzogen. Hierbei kamen speziell für die Flusszytometrie entwickelte Antikörper der Firma BD Biosciences und Beckman-Coulter zum Einsatz [Tabelle 6, Seite 31]. Für die Untersuchung wurden die ASCs in der zweiten bis dritten Generation aus T-175-Zellkulturflaschen geerntet und zwei Mal mit PBS gewaschen. Jeweils $3,5 \times 10^6$ Zellen wurden im zweiten Schritt mit jeweils bis zu drei verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern ($0,5\mu\text{g/ml}$ in PBS) [Tabelle 6] für eine Stunde inkubiert. Die Untersuchung wurde in der Core Facility des Center for Gene Therapy der Tulane University mit der Unterstützung von Herrn Hugh Alan Tucker mit einem Beckman-Coulter Epics FC500 Flusszytometer durchgeführt [Tabelle 8, Seite 32]. Die Daten wurden anschließend mit der tetraCXP Software des Herstellers analysiert [Tabelle 8].

2.2.9 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Zur Bestimmung der p24-Proteinkonzentration in den Zellkulturüberständen wurde ein ELISA-Kit der Firma Advanced BioScience Laboratories (Katalognr. 5447) verwendet. Die Zellüberstände wurden jeweils drei und fünf Tage nach der HIV-Exposition gesammelt und bis zur Verwendung in dem ELIS-Assay bei -80°C gelagert. Die Untersuchungen wurden entsprechend der mitgelieferten Gebrauchsanleitung durchgeführt. In diesem Assay wird die p24-Konzentration anhand eines mit einer Peroxidase verbundenen polyklonalen IgG Antikörpers gegen p24 detektiert. Bei einer Bindung des Antikörpers erzeugt die Peroxidase im zweiten Arbeitsschritt ein Farbumschlag des Indikatorfarbstoffes, der photometrisch festgehalten wurde. Die Konzentrationen des p24-Proteins wurden mithilfe einer mitgelieferten Standardverdünnungsreihe bestimmt. Sämtliche aus den Versuchsreihen gewonnenen Überstände von einer Zelllinie wurden mit einem 96-well-Kit auf diese Weise in einem Arbeitsschritt auf p24 untersucht. Als Kontrolle dienten die Überstände von exponierten ASCs und HUT78s. Es wurden die Zellkulturüberstände von ASCs, HD-Zellen dreier verschiedener Spender sowie von drei separat infizierten HUT78-Zellkulturen auf p24 hin untersucht. Jede einzelne Analyse wurde dreifach durchgeführt. Die Mittelwerte der p24-Konzentrationen

wurden als unabhängige Stichproben für jede Gruppe einer Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Dabei wurde die Studienhypothese auf einem Signifikanzniveau von 5% geprüft.

2.3 Eingesetzte Materialien

Die folgenden Tabellen führen die Materialien und Geräte mit Bestellinformationen auf, die in dieser Versuchsreihe zum Einsatz kamen.

Kurzbeschreibung	Firma	Katalognr.
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368814
RNeasy Plus Universal Mini Kit	QIAGEN	73404
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN	51304
Greiner PCR Tubes 0,2 ml 8-Strip	Sigma-Aldrich	Z617709
Multiplate™ Low Profile 96-well PCR Plates	Bio-rad	MLL-9601
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-rad	170-8880
PCR Array HIV Host Response	QIAGEN/ SAbiosciences	PAHS-051Z
Agarose	Sigma-Aldrich	A9539
DNA-Ladder Mix (100 bis 1000 bp)	Sigma-Aldrich	P1473
Tris Acetate-EDTA buffer (TAE-buffer) (10x)	Sigma-Aldrich	T8280
RNase-Free Water	Qiagen	129112

Tabelle 4: PCR-Reagenzien

Materialien, welche bei der Durchführung der unterschiedlichen PCR-Verfahren zum Einsatz kamen.

Gen	Sequenz
CD4	5'-GTA GTA GCC CCT CAG TGC AA-3' 5'-AAA GCT AGC ACC ACG ATG TC-3'
CD14	5'-ACA GGA CTT GCA CTT TCC AG-3' 5'-TCC AGG ATT GTC AGA CAG GT-3'
CD68	5'-CAA CTG CCA CTC ACA GTC CT-3' 5'-CAA TGG TCT CCT TGG AGG TT-3'
IL10	5'-AAG CCT GAC CAC GCT TTC TA-3' 5'-ATG AAG TGG TTG GGG AAT GA-3'
ITGAM	5'-ACG GAT GGA GAA AAG TTT GG-3' 5'-CAA AGA TCT TCT CCC GAA GC-3'
c-Kit	5'-CCG TGG TAG ACC ATT CTG TG-3' 5'-GTG CCC ACT ATC CTG GAG TT-3'
MMD2	5'-GCA GAC CAA GGT GTC CAA AT-3' 5'-CTG GCT GTC ACC AGA AGT CA-3'
MRC1	5'-GGC GGT GAC CTC ACA AGT AT-3' 5'-ACG AAG CCA TTT GGT AAA CG-3'
MSR1	5'-TCC TCG TGT TTG CAG TTC TC-3' 5'-CAT GTT GCT CAT GTG TTC CA-3'
TNF	5'-TCC TTC AGA CAC CCT CAA CC-3' 5'-AGG CCC CAG TTT GAA TTC TT-3'
gag	5'-ATA ATC CAC CTA TCC CAG TAG GAG AAA T-3' 5'-TTT GGT CCT TGT CTT ATG TCC AGA ATG C-3'
Tat	5'-GGA ATT CAC CAT GGA GCC AGT AGA TCC T-3' 5'-CGG GAT CCC TAT TCC TTC GGG CCT GT-3'
GAPDH	5'-CGA GAT CCC TCCA AAA TCA A-3' 5'-GGT GCT AAG CAG TTG GTG GT-3'
Alu (Fwd)	5' GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G-3'
gag (Rev) nt. 1505-1486	5' GTT CCT GCT ATG TCA CTT CC-3'
RU5 (R Fwd) nt. 518-559	5'-TTA AGC CTC AAT AAA GCT TGC C-3'
RU5 (U5 Rev) nt. 647-628	5'-GTT CGG GCG CCA CTG CTA GA-3'
RU5 wildtype Probe nt. 584-559	5'-CCA GAG TCA CAC AAC AGA CGG GCA CA-3'
RU5 degenerate1 nt. 584-559	5'-CCA GAG TCA CAT AAC AGA CGG GCA CA-3'
RU5 degenerate2 nt. 584-559	5'-CCA GAG TCA CAC AAC AGA TGG GCA CA-3'

Tabelle 5: Primer

Die in der Studie verwendeten Primer wurden von der Firma *realtimeprimers.com* zur Verfügung gestellt. In dieser Tabelle werden die Sequenzen für den Forward- und Reverse-Primer aufgelistet.

Kurzbezeichnung	Klon	Konjugat	Katalognr.	Firma	Protein
Polyklonaler Maus anti-human-CD4 AK IHC	-	unkonjugiert	550369	BD Parmingen™	CD4
Monoklonaler Maus anti-human-CD4 AK FCM	SK3	APC-Cy™7	341105	BD Parmingen™	CD4
Monoklonaler Maus anti-human-CD11b AK FCM	ICRF44	FITC	562793	BD Parmingen™	ITGAM, Integrin- α -M; Mac-1, Macrophage-1-antigen
Monoklonaler Maus anti-human-CD14 AK FCM	M ϕ P9	PE	340683	BD Parmingen™	CD14
Monoklonaler Maus anti-human-CD29 AK FCM	MAR4	PE	555443	BD Parmingen™	Integrin- β -1
Monoklonaler Maus anti-human-CD34 AK FCM	581	APC	560940	BD Parmingen™	CD34
Monoklonaler Maus anti-human-CD44 AK FCM	G44-26	FITC	560977	BD Parmingen™	CD44
Monoklonaler Maus anti-human-CD49b AK FCM	C3VLA3	FITC	IM1425	Beckman Coulter Inc.	Integrin, α ₂ -Subeinheit
Monoklonaler Maus anti-human-CD49c AK FCM	C3 II.1	PE	556025	BD Parmingen™	Integrin α ₃ -Subeinheit
Monoklonaler Maus anti-human-CD68 AK FCM	Y1/82A	FITC	562111	BD Parmingen™	CD68
Monoklonaler Maus-anti-human-CD90 AK FCM	5E10	PE	561970	BD Parmingen™	Thy-1, Thymocyte differentiation antigen 1
Monoklonaler Maus-anti-human-CD105 AK FCM	266	APC	562408	BD Parmingen™	Endoglin
Monoklonaler Maus-anti-human-CD147 AK FCM	HIM6	FITC	555962	BD Parmingen™	Basigin
Monoklonaler Ratte anti-human-CD184 AK IHC	1D9	unkonjugiert	551413	BD Parmingen™	CXCR4, C-X-C Chemokin receptor 4; Fusin
Polyklonaler Hase anti-human-CCR4 AK IHC	-	unkonjugiert	251837	Abcam	C-C Chemokin receptor 4
Polyklonaler Maus anti-human-CD195 AK IHC	-	unkonjugiert	555991	Abbiotec	C-C Chemokin receptor 5
Polyklonaler Maus anti-human-NOS2 AK IHC	-	unkonjugiert	250784	Abbiotec	iNOS, inducible nitric oxide synthase
Polyklonaler Ziege anti-Hase-IgG AK IHC	-	Alexa Flour [®] 488	150089	Abcam	Sekundärer AK
Polyklonaler Ziege anti-Maus-IgG AK IHC	-	Texas Red	150113	Abcam	Sekundärer AK
Polyklonaler Ziege anti-Ratte-IgG AK IHC	-	Texas Red	6843	Abcam	Sekundärer AK
Fluoroshield™ with DAPI		DAPI	F6057	Sigma	Mounting Medium

Tabelle 6: Antikörper

Aufgelistet sind alle in dieser Versuchsreihe zum Einsatz gekommenen Antikörper. Hierbei sind bei der Immunhistochemie (IHC) unkonjugierte und bei der Flusszytometrie (FCM) mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugierte Antikörper zum Einsatz gekommen.

Kurzbeschreibung	Firma	Katalognr.
αMEM ohne Glutamin	cellgro	15-012-CV
RPMI ohne Glutamin	cellgro	10-040-CV
High Glucose DMEM	cellgro	10-090-CV
Phosphat gepufferte Kochsalzlg. (PBS) ohne Mg und Ca ²⁺	cellgro	21-040-CV
DNase, RNase freies Wasser	GIBCO	10977-015
Trypsin-EDTA	Sigma	T4049-015
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	D2650
Fetales Rinderserum, FBS	PAA	A05-751
Glutamin	cellgro	25-005C1
Penicillin-Streptomycin-Lösung	cellgro	30-002C1
1-Monothioglycerol	Sigma-Aldrich	
Interleukin-1-beta	Prospec Bio	
Interleukin 3	Prospec Bio	
Monozyten Kolonien Stimulierender Faktor, MCSF	Prospec Bio	
100 µm Steriflip Filter	Millipore	SCNZ00100
50 ml/15ml Zentrifugenröhrchen	Greiner bio-one	227270/ 188281
T175/ T75/ T25 Zellkulturflaschen	Greiner bio-one	660190/ 658950/ 690910
6-/ 12-/ 96-well Zellkulturplatten	Greiner bio-one	657160/ 665165/ 655180
Shandon Double Cytofunnel	Thermo Scientific	5991039
White X-tra [®] Slides Clipped Case	Leica	3800200E

Tabelle 7: Zellkultur-Materialien

In dieser Tabelle sind alle für die Kultivierung und Differenzierung der ASCs sowie der übrigen Zelllinien aufgeführt.

Kurzbeschreibung	Firma
Zentrifuge	Smith Kline
Gel Elektrophorese System	Bio-Rad
Inkubator	Equatherm
Molecular Imager Gel Doc XR	Bio-Rad
Image Lab™ Software	Bio-Rad
iCycler MyiQ	Bio-Rad
iQ5 V2.0 RT-PCR Analyse-Software	Bio-Rad
Leica TCS SP-1 Konfokal Mikroskop mit Argon (457-477 nm; 488-514 nm) und HENE Laser (543 nm; 633 nm), Vergrößerung mit einem HCX PL APO 63x/1.4 Objektiv	Leica
Leica Confocal Software Version 2.2.1	Leica
SPSS Version	

Tabelle 8: Geräte und Software

Diese Tabelle enthält die für diese Versuchsreihe verwendeten Geräte des Applied Stem Cell Laboratory und den kooperierenden Laboratorien der Tulane University.

2.4 Zelllinien

2.4.1 ASCs

In der Studie verwendete ASC-Zelllinien wurden der laboreigenen Zellbank entnommen beziehungsweise frisch, nach Isolation aus der Gewebespende, weiterverwendet. Vor der Entnahme wurde durch den behandelnden Chirurgen die Einverständniserklärung der Patienten eingeholt. Eine Kopie der Einverständniserklärung, welche durch die Ethikkommission der Tulane University genehmigt wurde, ist im Anhang hinterlegt [Kap. 12.3, Seite xii]. Außerdem wurde eine kurze Anamnese der Patienten mit folgenden Fragen erhoben:

- Alter, Geschlecht und ethnische Zugehörigkeit (eZ)
- Vorerkrankungen, spezifisch die Frage nach malignen Erkrankungen, Diabetes mellitus (DM) Infektionskrankheiten
- Nikotinkonsum
- Habitus
- Gewebetyp (Haut, Fett, Muskel etc.)
- Hauptdiagnose
- Art des chirurgischen Eingriffs
- Beschaffenheit der Gewebeprobe (bei Tumoroperationen Entfernung zum Primärtumor, Narbengewebe, Infektionen im Entnahmegebiet, Bestrahlungen in der Vergangenheit etc.)

Die Zellbank bestand aus 130 Zelllinien. Im Rahmen der Studie wurden dieser insgesamt 13 Zelllinien entnommen. Die Zelllinien der Spender wurden unter folgenden Einschlusskriterien ausgewählt:

- Alter \leq 65 Jahre
- Keine malignen Erkrankungen in der Anamnese
- Keine Bestrahlungen, Narben oder Infektionen im Entnahmegebiet
- Patienten müssen seronegativ für HIV- und Hepatitis C- sein

Bevorzugt wurden Zellen von jungen Spenderinnen und Spendern verwendet, da sich gezeigt hat, dass diese sich besonders gut für die hämatopoetische Differenzierung eignen. Die meisten Spender waren weiblich (84,6%), hatten zum Zeitpunkt der Spende ein durchschnittliches Alter von 30,5 (\pm 14,9) Jahren und keine schwerwiegenden Erkrankungen. Einen Überblick über das Kollektiv verschafft Tabelle 9. Alle Patienten dieses Kollektivs waren Nichtraucher.

Nr	Geschlecht	eZ	Alter	Vorerkrankungen	Eingriff	Entnahmeort
1	Männlich	AA	17	-	Gynäkomastie	Brust
2	Weiblich	-	26	Asthma	Makromastie, BRP	Mamma
3	weiblich	AA	18	-	Makromastie, BRP	Mamma
4	Weiblich	AA	47	-	Makromastie, BRP	Mamma
5	Weiblich	AA	25	-	Makromastie, BRP	Mamma
6	Männlich	AA	14	PA	Gynäkomastie	Brust
7	Weiblich	C	16	-	Narbenrevision	Abdomen
8	Weiblich	-	17	-	Makromastie, BRP	Mamma
9	Weiblich	AA	28	-	Makromastie, BRP	Mamma
10	Weiblich	C	49	-	Makromastie, BRP	Mamma
11	Weiblich	AA	60	NIDDM, aHT, SAS	Makromastie, BRP	Mamma, Axilla
12	Weiblich	C	49	Gastrischer Adipositas	Bypass, Gewebereduktion Abdomen	Abdomen
13	Weiblich	AA	31	Gastrischer Adipositas	Bypass, Gewebereduktion Abdomen	Abdomen

Tabelle 9: Patientencharakteristika

Ausschnitt aus der Zelldatenbank des Applied Stem Cell Laboratory für die in dieser Studie verwendeten Zelllinien. eZ= ethnische Zugehörigkeit, AA = African American; C= Kaukasisch; NIDDM = nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus; aHT= arterieller Hypertonus; SAS= Schlafapnoesyndrom, PA= Hypophysenadenom, BRP= Brustreduktionsplastik

2.4.2 HUT78

HUT78 oder HuT-78 ist eine maligne T-Zelllinie, die einem kaukasischem Patienten mit einem Sézary-Syndrom entnommen wurde [74]. Diese Zelllinie wurde im RPMI-Medium [Tabelle 7], versetzt mit 10% FBS und 2% Penicillin/Streptomycin, bei 37 Grad Celsius und 5% CO₂, kultiviert. Die Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) zur Verfügung gestellt.

2.4.3 H9/HTLV_{III B}

Für die kontinuierliche Kultivierung des X4-Stammes des HIV-1 wurden T-Zelllinien von Patienten, welche an einer Haarzellleukämie litten, verwendet. Das Virus, welches sich in diesen Kulturen vermehrt, wird als HTLV_{III B} (human T-lymphotropic virus type IIIB) bezeichnet. Die Bezeichnung HTLV_{III B} geht auf den Entdecker des HI-Virus Robert Gallo zurück [75, 76]. Die verwendete Zelllinie H9/HTLV_{III B} wird vereinfacht mit HTLV_{III B} bezeichnet. Die Zellen wurden in einem mit 10% FBS, 1% Streptomycin und 1% Penicillin versetzten RPMI-Medium [Tabelle 7] bei Standardkulturbedingungen [Kapitel 2.4.2] kultiviert. Die Zellen wurden vom AIDS Research & Reference Reagent Program in Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt.

2.4.4 U1

Da Monozyten und Makrophagen nur schwer in Kultur zu halten sind, infizierte die Arbeitsgruppe Folk et al. die maligne Promonozyten-Zelllinie U937 mit dem R5-Stamm des HIV-1 um eine konstante Kultivierung dieses Virus-Stammes sicherzustellen [77]. Diese Zelllinie wurde als U1 bezeichnet. Die Zellen wurden in einem mit 10% FBS, 1% Streptomycin und 1% Penicillin versetzten RPMI-Medium [Tabelle 7] bei Standardkulturbedingungen [Kapitel 2.4.2] kultiviert [78]. Die Zellen wurden vom AIDS Research & Reference Reagent Program in Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der ASCs als multipotente Stammzellen

Wie bereits beschrieben, wurden zur Differenzierung Zellen verwendet, welche nach ihrer Isolation mit Hilfe der Flusszytometrie phänotypisiert wurden [Abbildung 9]. Es wurden Oberflächenmarker gewählt, welche bereits in vorangegangenen Publikationen zur Charakterisierung von ASCs herangezogen wurden [7, 68]. Die Antigene *CD90*, *CD105* und *CD44* waren bei diesen Zellen durchweg vorhanden, während die hauptsächlich hämatopoetischen Oberflächenantigene *CD4*, *CD68*, *CD34*, *CD45* und *CD11b* kein Signal in der Flusszytometrie zeigten. Mittels zelllinienspezifischer Differenzierungsmedien wurde das multipotente Differenzierungspotential für jede in dieser Studie verwendete Stammzelle untersucht [Kap. 2.2.3.1, Seite 16]. Hierbei wurde neben den mesenchymalen Differenzierungen ein hämatopoetisches Differenzierungspotential der Zellen [Kap. 2.2.3.2, Seite 18] nachgewiesen.

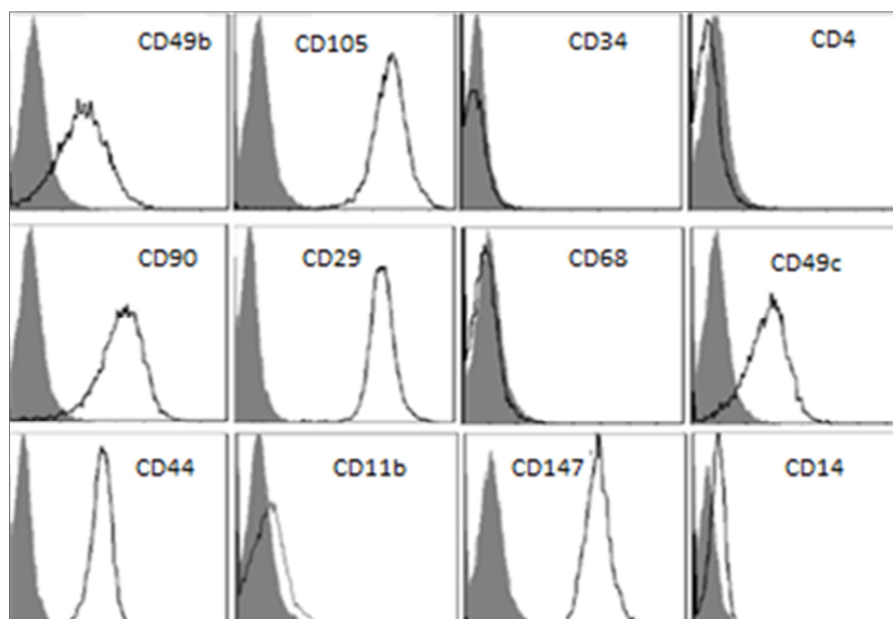


Abbildung 9: Flusszytometrischer Nachweis von typischen Oberflächenproteinen.

Die expandierten ASCs wurden vor der weiteren Verwendung in den Experimenten auf ihre typischen Oberflächenmarker untersucht. Hierbei spielen besonders CD49b und c, CD105, CD44 und CD90 eine wichtige Rolle. Von mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarkes unterscheiden sie sich, indem sie die Proteine CD34 und CD14 nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren. In grau ist das Hintergrundsignal ungefärbter Zellen und in weiß das Signal der fluoreszierenden Zellen aufgetragen.

3.2 Expression von für eine HIV-Infektion relevanten Genen

Vor der Exposition mit dem Virus wurde bei den hämatopoetisch differenzierten Zellen die Expression von wichtigen HIV-Korezeptoren mittels Real-time-PCR sichergestellt. Die Expression dieser Rezeptoren wurde erst nach der Virusexposition an fixierten Zellen nachgewiesen [Kap. 3.5, Seite 44]. Die erste Expressionsanalyse ergab im Vergleich zu den undifferenzierten ASCs einen deutlichen Anstieg in der Expression des CD4-Rezeptors ($33,9 \pm 3,4$). Daneben wiesen die für die HIV-Infektion wichtigen Rezeptoren *CCR5* ($1,93 \pm 0,26$), *CCR4* ($1,64 \pm 0,05$) und *CXCR4* ($2,7 \pm 0,42$) verglichen mit ASCs einen leichten jedoch signifikanten Anstieg der Expression auf. ($p < 0,05$) [Abbildung 10].

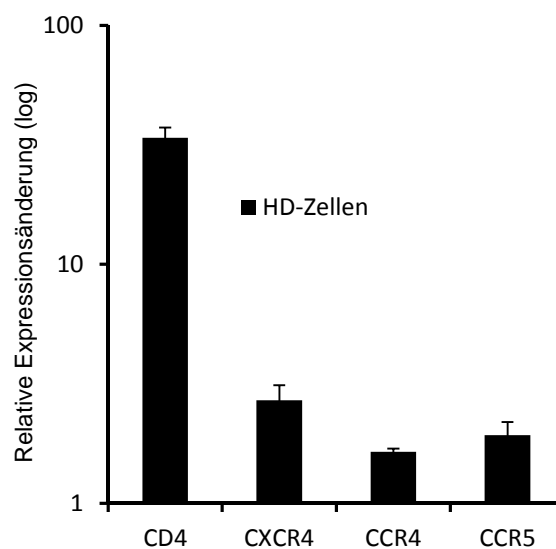


Abbildung 10: Relativer Anstieg der Expression von HIV-Korezeptoren in HD-Zellen

Nach acht Tagen Differenzierung wurde mRNA aus drei verschiedenen HD-Zelllinien isoliert und eine RT-PCR für wichtige HIV-Korezeptoren durchgeführt. Dargestellt ist die relative Expressionsänderung [$\log_{10}(2^{-\Delta\Delta CT})$] mit Standardabweichungen in HD-Zellen verglichen mit deren Expression in ASCs vor der Differenzierung (x-Achse); ($p \leq 0,05$).

Anschließend wurden die HD-Zellen analog zum Vorgehen nach der Exposition mit HIV-1 in einem umfangreichen PCR-Array mit 84 verschiedenen Primern auf wichtige Faktoren der HIV-Infektion im Menschen hin untersucht. Neben der Bestätigung der Expression von wichtigen HIV-Rezeptoren und den für hämatopoetische Zellen spezifischen Rezeptoren *CD68*, *TNFRSF1B*, *MBL2* und *SELL* [Abbildung 11], induzierte die Differenzierung eine signifikante Expressionsänderung immunmodulatorischer Gene ($p \leq 0,01$ bzw. $p \leq 0,05$, siehe Abbildung 11). Während die Interleukine 2, 10 und 16 sowie die Interferone alpha 1 und gamma eine moderate

Änderung in ihrer Expression aufwiesen, zeichneten sich die HD-Zellen durch eine hohe Genexpression der Interleukine 8 und 1 β aus. Eine ausgeprägte Steigerung der Expression ließ sich für die Chemokine *CCL8* und *CX3CL1* eruieren. Darüber hinaus ließ sich neben einer Überexpression des α -1-Antitrypsin Gens *SERPINA1*, auch eine starke Expressionssteigerung des Lymphoblastom-assoziierten Gens *BCL11B* feststellen [Abbildung 11].

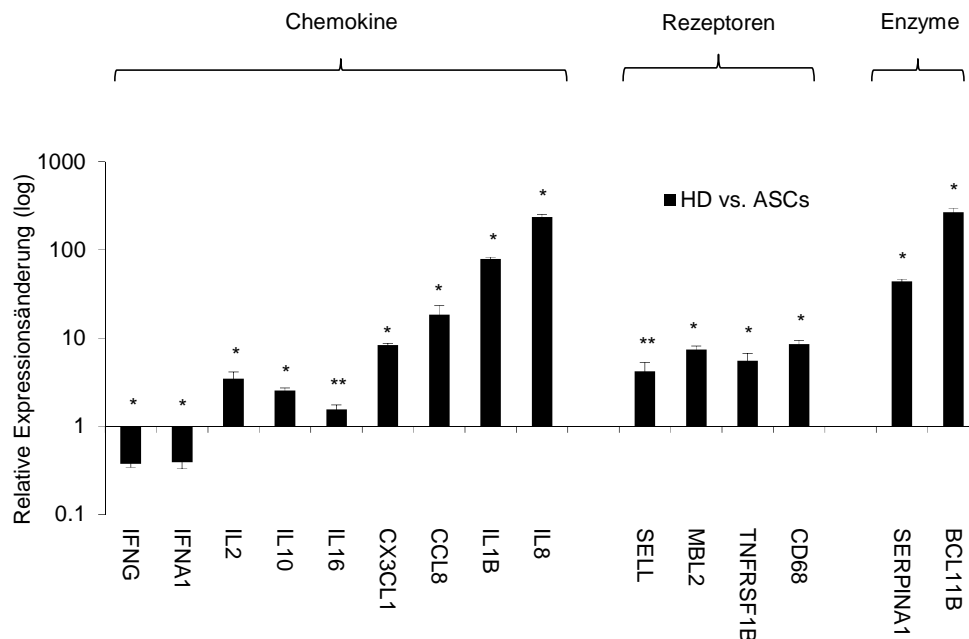


Abbildung 11: Expression von Chemokinen und Rezeptoren in HD-Zellen

Die komparative Analyse der Genexpressionen erfolgte in den RT²-PCR-Arrays. Dargestellt ist die relative Expressionsänderung [$\log_{10}(2^{-\Delta\Delta CT})$] mit Standardabweichungen der HD-Zellen (HDs) im Vergleich zur Expression in ASCs; (* = $p \leq 0,01$; ** = $p \leq 0,05$). Die Gene sind entsprechend ihrer Funktion innerhalb der Zelle angeordnet. Die genauen Messwerte des PCR-Arrays sind in Tabelle 10 im Anhang aufgelistet.

Des Weiteren ergab das Expressionsprofil auch Veränderungen in zellzyklus- und apoptosespezifischen Genen, von denen unter anderen *NF κ B*, *CBX5*, *BANF1* und *HMGAI* eine wichtige Rolle in der Expressionskontrolle des HIV-Genoms spielen [Abbildung 12 A]. Generell spiegelte sich eine Suppression der Genexpression dieser Gengruppe, einschließlich *BAX*, *CDKNA1*, *FOS*, *EP300*, *CDK7* und *PTK2B*, wider. Ebenso supprimiert waren der Makrophagen-spezifische Transkriptionsfaktor *CEBPB* und der Transkriptionsfaktor aktivierter T-Lymphozyten, *NFAT-C1* [Abbildung 12 B].

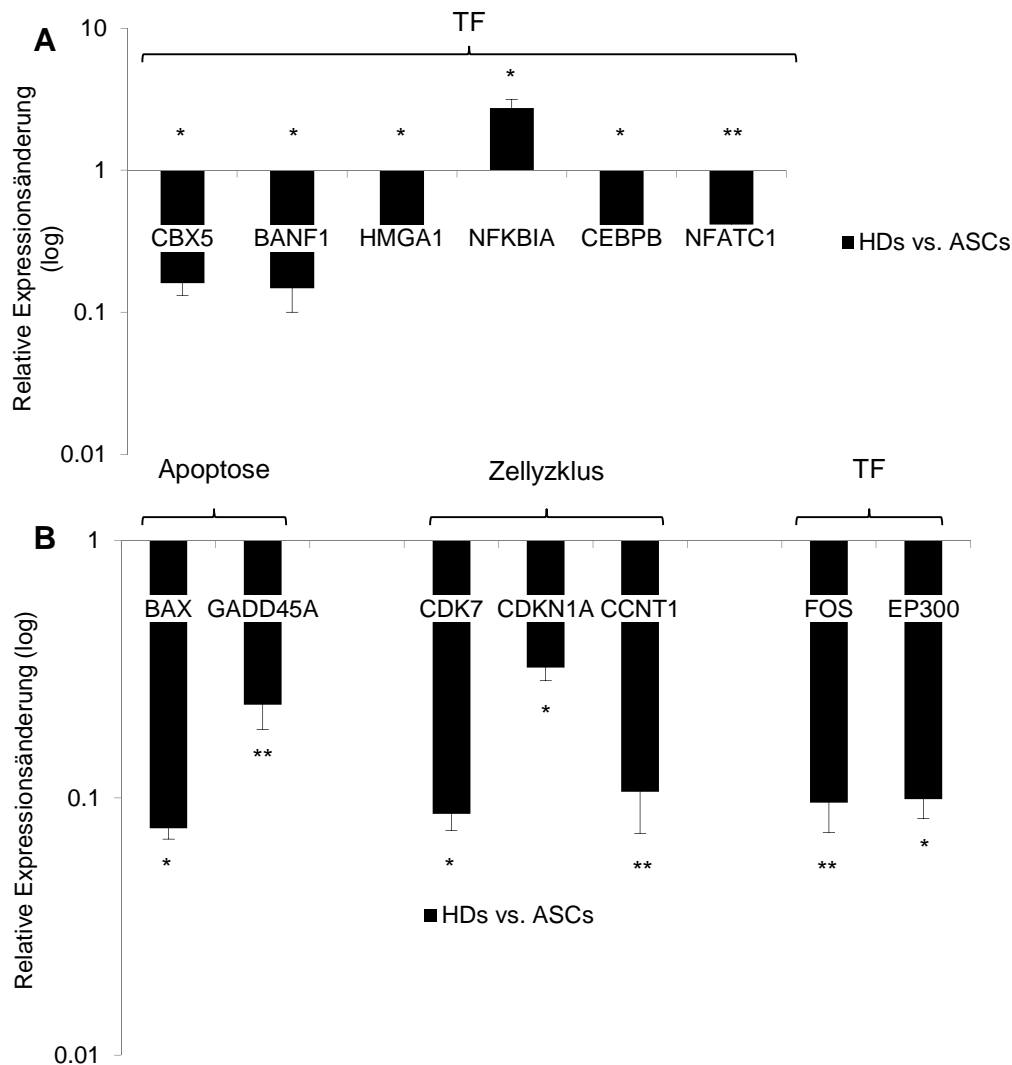


Abbildung 12: Expression von Genen des Zellzyklus in HD-Zellen

Die komparative Analyse der Genexpressionen erfolgte in den RT²-PCR-Arrays. Dargestellt ist die relative Expressionsänderung [$\log_{10}(2^{-\Delta\Delta CT})$] mit Standardabweichungen der HD-Zellen (HDs) im Vergleich zur Expression in ASCs (x-Achse); (* = $p \leq 0,01$; ** = $p \leq 0,05$). Die Gene sind entsprechend ihrer Funktion innerhalb der Zelle angeordnet, wobei Grafik **B** Gene des Zellzyklus im Allgemeinen und Grafik **A** die für die Expressionskontrolle des HIV-Genoms spezifischen Gene darstellt. TF= Transkriptionsfaktoren. Die genauen Messwerte des PCR-Arrays sind in Tabelle 10 im Anhang auf Seite viii aufgelistet.

3.3 HIV-Infektion in exponierten HD-Zellen

Ausgehend von der Annahme, dass die HD-Zellen die nötigen Oberflächenrezeptoren für den Eintritt des HI-Virus in die Zelle exprimieren, wurden die HD-Zellen mit dem X4- und R5-Stamm des HIV-1 inkubiert. Primär wurden zunächst die Zellüberstände der Zellkulturen jeweils drei und fünf Tage nach Exposition gesammelt und auf das virale Kapsidprotein *p24* untersucht [Abbildung 13 B]. Hierbei ergaben sich besonders in der frühen Phase (drei Tage nach Exposition) höhere *p24*-Titer in den

mit dem X4-Stamm des Virus inkubierten HD-Zellen. Diese Feststellung führte dazu, dass alle folgenden Untersuchungen nur mit den X4-exponierten HD-Zellen weitergeführt wurden.

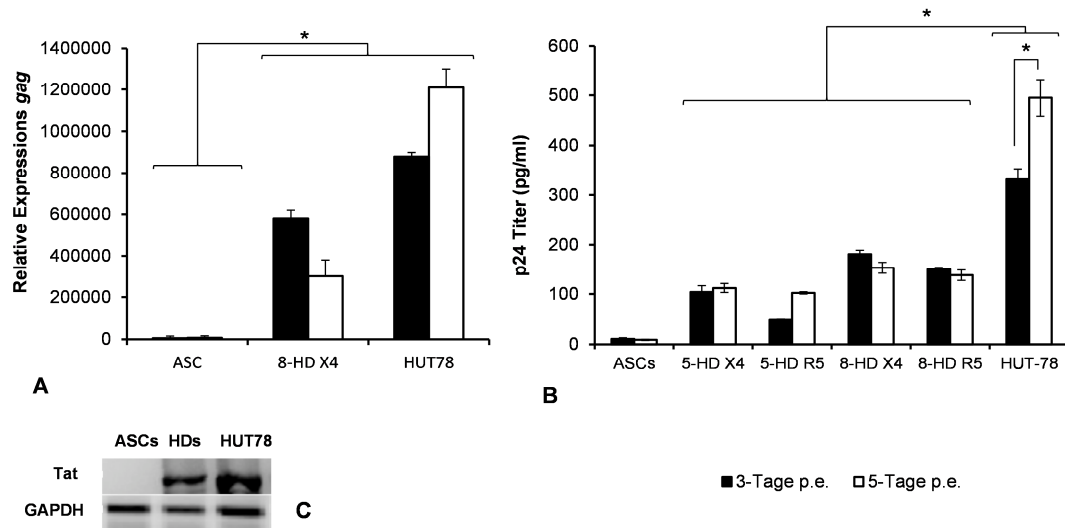


Abbildung 13: Produktive HIV-Infektion in HD-Zellen

In Grafik **A** sind die relative Expression der *gag*-mRNA in acht Tage alten HDs (8-HD) und HUT78-Zellen jeweils drei bzw. fünf Tage nach Exposition mit dem X4-Stamm des HIV (p.e. = post Exposition) als $2^{-\Delta\Delta CT}$ im Vergleich zu nativen ASCs dargestellt ($p \leq 0,01$). Der Unterschied in Expression zwischen infizierten HD-Zellen sowie HUT78-Zellen (X4) und ASCs war signifikant ($*=p \leq 0,01$). Grafik **B** zeigt die p24-Titer der Zellkulturüberstände von fünf bzw. acht Tage alten HDs (5-HD, 8-HD) und HUT78 Zellen. Die Überstände wurden jeweils drei bzw. fünf Tage nach Exposition mit R5- und X4-Stämmen des HIV gesammelt und mittels ELISA analysiert. Alle Expositionen wurden an drei Zelllinien durchgeführt und zeigen eine signifikante Steigerung zur Kontrolle ($p \leq 0,01$). Außerdem signifikant ist der Unterschied in p24-Titern zwischen den HUT78 und HD-Zellen, sowie zwischen den HD-Zellen und den ASCs ($*=p \leq 0,01$). Abbildung **C** stellt den gelelektrophoretischen Nachweis von *tat*-mRNA und GAPDH-mRNA nach 30 Zyklen einer RT-PCR dar.

Wie bereits im Methodenteil [Kap. 2.2.4, Seite 19] erläutert, wurden undifferenzierte ASCs und induzierte HD-Zellen fünf bzw. acht Tage nach Beginn der Differenzierung mit den beiden Stämmen des HI-Virus-1 inkubiert. Als positive Kontrolle dienten dabei HUT78 Zellen.

24 Stunden nach Exposition mit dem zellfreien Virus-Serum wurden die nicht gebundenen Virus-Partikel durch mehrfaches Waschen der Zellkultur entfernt und die Kultur weitere fünf Tage im Medium gehalten. Besonders bei den HD-Zellen gestaltete sich die Waschung schwierig, da die Zellen bereits, anders als HD-Zellen ohne Virusexposition, viel früher ihre Bindung zur Kulturflasche verloren und eine Monozyten-ähnliche Morphologie aufwiesen [Abbildung 14]. In diesem Fall wurde

abweichend von der dreimaligen Waschung eine höhere Anzahl von Waschungen durchgeführt (bis zu fünf), um sämtliche Viruspartikel aus der Kultur zu entfernen. Die Veränderung der Morphologie im zeitlichen Verlauf, insbesondere im Vergleich zu nicht exponierten HD-Zellen, ist der Abbildung 14 zu entnehmen. Dort ist ab dem zweiten Tag nach der Exposition eine deutliche morphologische Veränderungen zu erkennen. Die Zellen verlieren an Größe und ein deutlicher Anstieg der Zahl abgestorbener Zellen ist zu beobachten. Insgesamt weisen infizierte Zellen die Tendenz auf, sich schneller vom Gefäßboden zu lösen als HD-Zellen, welche nicht dem Virus ausgesetzt wurden [HD-Kontrolle, Abbildung 14].

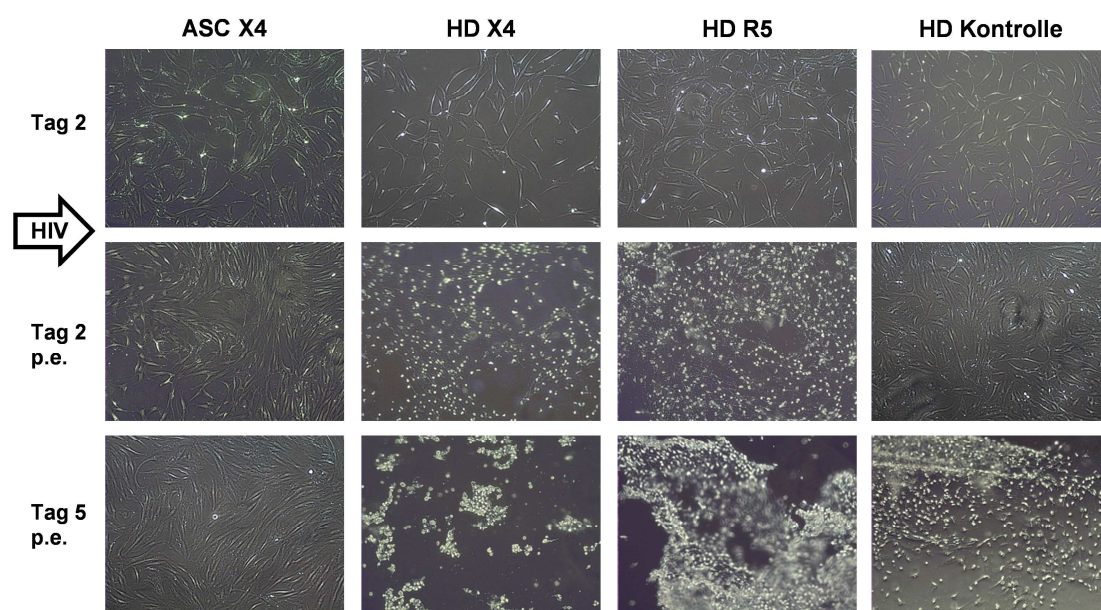


Abbildung 14: Exposition von ASCs und HD-Zellen mit HIV

Die Zellkulturen wurden täglich inspiziert und mit einer 200-fachen Vergrößerung 2 Tage nach Beginn der Differenzierung sowie drei und fünf Tage nach der HIV-Exposition mit X4- und R5- Stämmen fotografiert. Als Kontrolle dienten HD-Zellen, welche statt mit dem HTLIIIIB-Überstand mit HUT78-Kulturüberstand inkubiert wurden. Die Exposition von 8-HD-Zellen ist in dieser Übersicht nicht dargestellt.

Parallel zu diesen morphologischen Veränderungen zeigten die Zellen drei Tage nach Inkubation deutliche p24-Titer, welche jedoch nicht an die der HUT78-Zellen heranreichten [Abbildung 13 B]. Diese Titer stiegen im Gegensatz zur Positiv-Kontrolle kaum an bzw. sanken sogar ab. Wurden reifere HD-Zellen (8-HDs) mit dem Virus inkubiert, so resultierte dies zunächst auch in höheren p24-Titern, ohne im zeitlichen Verlauf einen weiteren Anstieg aufzuweisen. Mit zunehmender Reife der HD-Zellen nahmen sowohl die Adhäsionsfähigkeit der Zellen zum Kulturflaschenboden als auch die p24-Produktion ab.

Die exponierten ASCs zeigten im Verlauf nur sehr geringe p24-Titer, die entweder als Hintergrundrauschen bei der photometrischen Messung der ELISA-Platten oder als durch die Waschung nicht entfernte Viruspartikelreste interpretiert wurden.

Nachdem die Überstände der Zellkulturen auf Zeichen einer aktiven Virusvermehrung untersucht wurden, musste der Nachweis erbracht werden, dass nicht nur das Virus-Hüllen Protein vorhanden war. Dies gelang durch den Nachweis der viralen *gag* mRNA, welche das p24-Protein kodiert. Hierfür wurde die RT-PCR angewandt, welche die semiquantitative Bestimmung des *gag*-RNA Titers aus dem Lysat der geernteten Zellen ermöglichte [Abbildung 13 A]. Außerdem wurde in den HD-Zellen sowie den HUT78-Zellen *tat*-mRNA, welche in der frühen Phase der HIV-Infektion hochreguliert ist [Kap. 1.3, Seite 3], mittels RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese nachgewiesen [Abbildung 13 C]. Die PCR wurde jeweils in 30 Zyklen durchgeführt. Die HD-Zellen wiesen drei Tage nach Exposition einen deutlichen Anstieg in der Expression der *gag*-RNA im Vergleich zu den nicht-exponierten ASCs auf [Abbildung 13]. Analog zu den Titern des p24-Proteins kam es jedoch nach fünf Tagen zu einer Abnahme der nachgewiesenen mRNA, welcher sich reziprok in den HUT78 Zellen widerspiegelte. Diese Verläufe der HIV-*gag* Expression und p24- Produktion zeigten sich in allen drei untersuchten Zelllinien der ASCs.

3.4 Effekt der HIV-1-Exposition auf undifferenzierte ASCs

Obwohl eine produktive Infektion in den ASCs nicht nachgewiesen wurde, gab es einen Anfangsverdacht für eine Integration des HIV-Genoms in diesen Zellen. Sie zeigten auch keine Veränderung in ihrer Morphe oder signifikante Veränderungen in der Expression hämatopoetisch relevanter Oberflächenproteine, wie *CD4*, *CD14*, *CD68*, *NSRI*, *TNF α* oder *MSC1*. Auf der anderen Seite demonstrierten die ASCs drei Tage nach Exposition eine signifikant erhöhte Expression für die Gene *IL10* ($188,9 \pm 1,6$; $p \leq 0,01$), *c-Kit* ($6,4 \pm 1,4$; $p \leq 0,05$) und *MMD2* ($65 \pm 1,1$; $p \leq 0,01$). Fünf Tage nach Exposition zeigten diese Gene eine niedrigere Expression, die jedoch immer noch signifikant höher lag, als in nicht-exponierten ASCs (*IL10* = $67,5 \pm 1,5$; $p \leq 0,01$; *MMD2* = $24,3 \pm 1,3$; $p \leq 0,01$; *c-KIT* = $14,1 \pm 1,9$; $p \leq 0,05$) [Abbildung 15]. Drei mit HIV-1 exponierte Zelllinien wurden drei Tage nach HIV-Exposition auf ihr Differenzierungspotential in Adipozyten und Osteozyten untersucht. Während bei der

hämatopoetischen Differenzierung bereits morphologisch deutliche Unterschiede in der Differenzierungsgeschwindigkeit offenkundig wurden [Kap. 3.3, Seite 41], wiesen die Adipozyten- und Osteozytendifferenzierungen keine morphologischen Auffälligkeiten auf. Es wurden keine weiteren Untersuchungen, wie zum Beispiel die Messung der alkalischen Phosphatase in den Osteozyten oder die Bestimmung Adipozyten-spezifischer Gene, durchgeführt, um die Differenzierungspotentiale weiter zu quantifizieren.

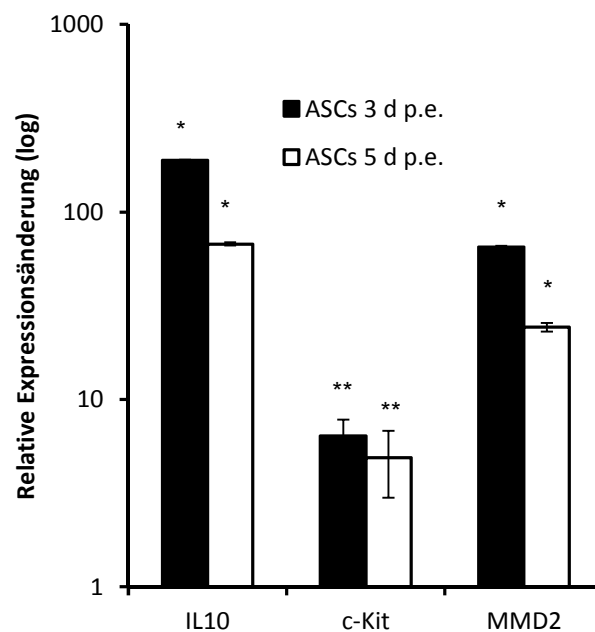


Abbildung 15: Effekt der HIV-Exposition auf ASCs

Jeweils drei und fünf Tage nach HIV-Exposition der ASCs wurde die mRNA isoliert und eine RT-PCR für IL10, c-Kit und MMD2 durchgeführt. Dargestellt ist die relative Expressionsänderung [$\log_{10}(2^{-\Delta\Delta CT})$] mit Standardabweichungen von ASCs nach Exposition verglichen mit der Expression von nativen ASCs; (** = $p \leq 0,05$, * = $p \leq 0,01$). Hier nicht dargestellt sind die Expression von CD4, CD14, CD68, NSR1, TNF α und MSC1, die in der RT-PCR keinen signifikanten Anstieg der Expression im Vergleich zu nativen ASCs zeigten. d= Tage, p.e. = post Exposition

Zum Nachweis integrierter Proviren des HIV-1 wurde eine *Alu-gag* basierte nested-PCR nach Liszewski et al. angewandt. [72] In dieser PCR wurden Primer verwendet, deren PCR-Produkt sowohl das HIV-*gag*-Gen als auch repetitive genomische Sequenzen, welche spezifisch für das humane Genom sind, enthält. Dies ermöglicht den Nachweis einer Integration des viralen Genoms in chromosomale DNA. Das Produkt der *Alu-gag*-PCR ist etwa 160 Basenpaare lang und war in HIV-exponierten HD-Zellen und HTLV_{IIIB}-Zellen nachzuweisen. Das Signal in mit HIV inkubierten HD-Zellen war hierbei etwas schwächer als in HTLV_{IIIB}-Zellen. Die

Exposition von ASCs mit einer MOI von 0,1 des X4-Virus führte zu keiner in der nested PCR nachweislichen Integration von Proviren [Abbildung 16].

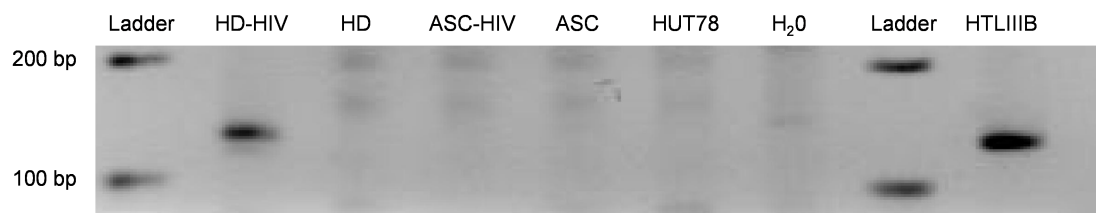


Abbildung 16: Nested PCR

Das Endprodukt der *nested* PCR wurde in einem 2%igen Agarose-Gel bei 80V für 90 Minuten laufen gelassen und mit einer Gammakamera fotografiert. Es wurde die genomische DNA von mit HIV-1 (X4) (0,1 MOI) exponierten HD-Zellen (HD-HIV) und ASCs (ASC-HIV) sowie HD-Zellen (HD) als auch ASCs untersucht. Als negative Kontrolle dienten HUT78-Zellen sowie HTLII_B-Zellen als Positivkontrolle.

3.5 Gen-Profilanalyse in infizierten HD- und HUT78-Zellen

Nachdem sich die Anzeichen für eine produktive HIV-Infektion in den HD-Zellen zunehmend verstärkten, wurden die exponierten Zellen, wie schon die nicht exponierten Zellen zuvor [Kap. 3.2, Seite 37], mit Hilfe eines RT-PCR Arrays für Gene mit Relevanz für die HIV-Infektion einem Gen-Profil-Analyse unterzogen. [Abbildung 17]. Hierbei wurden die ΔC_t -Werte der HD-Zellen zum einen mit denen der nicht infizierten und zum anderen mit denen der infizierten HUT78-Zellen verglichen. In der Gesamtbetrachtung wird deutlich, dass die Differenzen in der Expression der untersuchten Gene zwischen den exponierten und nicht-exponierten HD-Zellen tendenziell größer waren, als zu den infizierten HUT78-Zellen. So vermag das Virus in den HD-Zellen ähnliche Reaktionen auf molekulargenetischer Ebene wie in HUT78-Zellen zu erzeugen. Besonders fiel die vergleichbare Expression von lymphozytären Rezeptoren und Liganden, wie *CD247*, der Tyrosin Proteinkinase *HCK* und dem Chemokin-Liganden 5 (*RANTES/CCL5*), in den infizierten HD-Zellen und den HUT78-Zellen auf.

Daneben wiesen die infizierten HD-Zellen eine signifikante Steigerung ($p \leq 0,01$) in der Expression Makrophagen-typischer Rezeptoren und Liganden, wie *DC-SIGN/CD209*, *CCR5*, dem Stromal-derived-factor 1 (*CXCL12/SDF-1*), Macrophage inflammatory protein 1 β (*CCL4/MIP-1 β*) und dem CAT-box enhancer binding protein β (*CEBPB*) auf [Abbildung 17 A]. Außerdem war, im Vergleich zu nicht infizierten HD-Zellen, die Expression des normalerweise auf basophilen und eosinophilen

Granulozyten exprimierten Rezeptors *CCR4* hochreguliert. Die Liganden *Interferon-regulating-factor 1* und 2, deren Expression nach HIV-1-Exposition im Vergleich zu nativen HD-Zellen signifikant erhöht war, regulieren über *p53* und *p300* den Zellzyklus. Als einziges Rezeptor-Gen zeigte das *CD4* in infizierten HD-Zellen eine signifikant ($p \leq 0,01$) niedrigere Expression im Vergleich zu HUT78-Zellen. Eine Änderung der Expression verglichen mit nativen HD-Zellen konnte in exponierten HD-Zellen nicht festgestellt werden.

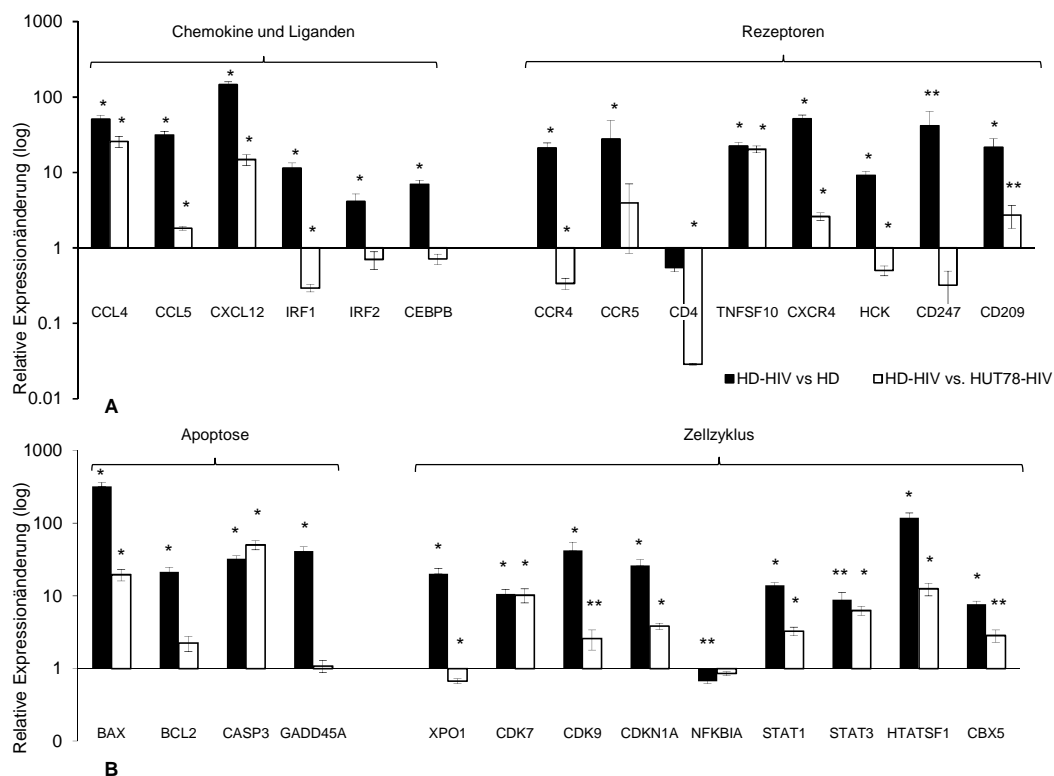


Abbildung 17: Expressionsprofile ausgewählter Gene der HIV-exponierten Zellen.

Die komparative Analyse der Genexpressionen erfolgte in den RT²-PCR-Arrays. Dargestellt ist die relative Expressionsänderung [$\log_{10}(2^{-\Delta\Delta CT})$] mit Standardabweichungen der postexpositionellen HD-Zellen (HD-HIV) verglichen mit der Expression in HD-Zellen und HIV-infizierten HUT78-Zellen (HUT78-HIV); (* = $p \leq 0,01$, ** = $p \leq 0,05$). Die Graphen A und B spiegeln die funktionalen Gruppierungen der Proteine in der Zelle wieder: HIV-Rezeptoren und Liganden (A), Zellzyklus und Apoptose (B). Die exakten Werte mit p-Werten sind in Tabelle 11 im Anhang [Seite ix] aufgeführt.

Während die wichtigen Gene des Zellzyklus und der Apoptose nach der Differenzierung der ASCs zu HD-Zellen geringer exprimiert wurden, führte die Exposition und Infektion zu einer signifikanten Hochregulierung der *BAX*-, *BCL2*-, *CASP3*-, *TNFSF10*-, *STAT1*-, *STAT3*-, *CDK7*- und *CDKN1A*-Gene ($p \leq 0,01$). Einige dieser Gene (*CASP3*, *BAX*, *BTRC*, *CDK7*, *CDKN1A* und *STAT3*) wiesen auch im

Vergleich zu infizierten HUT78-Zellen eine signifikant höhere Expression ($p \leq 0,01$) auf. *NFκB1α* zeigte verglichen mit HD-Zellen oder HUT78-Zellen, trotz einer Expressionssteigerung aller anderen Faktoren des HIV-Transkriptionskomplexes (*CDK9*, *CDKN1α*, Kap. 1.3), keine nennenswerte Veränderung in seiner Expression. Außerdem fällt die gesteigerte Expression des Growth Arrest and DNA-Damage-inducible protein 45α (*GADD45α*) ins Auge, welches in Zellen mit DNA-Schäden die Apoptose-Kaskade zu aktivieren vermag.

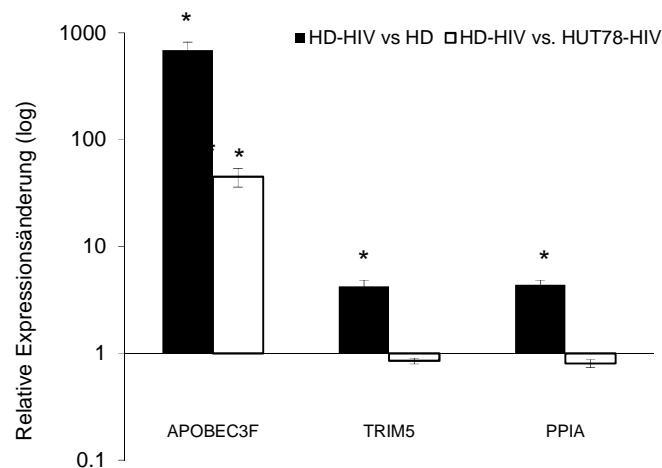


Abbildung 18: Expression der Gene angeborener Immunantwort

Die komparative Analyse der Genexpressionen erfolgte in den RT²-PCR-Arrays. Dargestellt ist die relative Expressionsänderung [$\log_{10}(2^{-\Delta\Delta CT})$] mit Standardabweichungen der postexpositionellen HD-Zellen (HD-HIV) verglichen mit der Expression in HD-Zellen und HIV-infizierten HUT78-Zellen (HUT78-HIV); (* = $p \leq 0,05$). Den dargestellten Genen *APOBEC3F*, *TRIM5*, *HTATSF1* und *PPIA* wird eine Rolle in der angeborenen Immunantwort auf die Infektion mit Retroviren zugesprochen.

Wie bereits in Kapitel 1.6 angesprochen, haben Zellen Mechanismen entwickelt, mit denen sie sich gegen eine Infektion mit einem Retrovirus zur Wehr setzen. In diesem Array waren die Gene von drei dieser Proteine im Vergleich zu nicht infizierten HD-Zellen in ihrer Expression signifikant gesteigert ($p \leq 0,01$). Während das Tripartite Motif-Containing Protein 5 alpha (*TRIM5*) und das Cyclophilin A (*PPIA*) mit vergleichbarer Expression, wie in infizierten HUT78-Zellen, nachzuweisen waren, zeigten die infizierten Zellen gegenüber den HUT78-Zellen eine signifikante Expressionssteigerung des Gens *APOBEC* (apolipoprotein B mRNA editing enzyme).

Um einige dieser Expressionen auf der Protein-Ebene zu validieren, wurde ein immunhistochemischer Nachweis für die CCR4-, CCR5- und CXCR4-Rezeptoren sowie *NOS2* erbracht [Abbildung 17]. Entgegen der in der PCR nachweisbaren CD4-mRNA-Titer wurde keine Expression des CD4-Rezeptors auf der Zelloberfläche der HD-Zellen festgestellt.

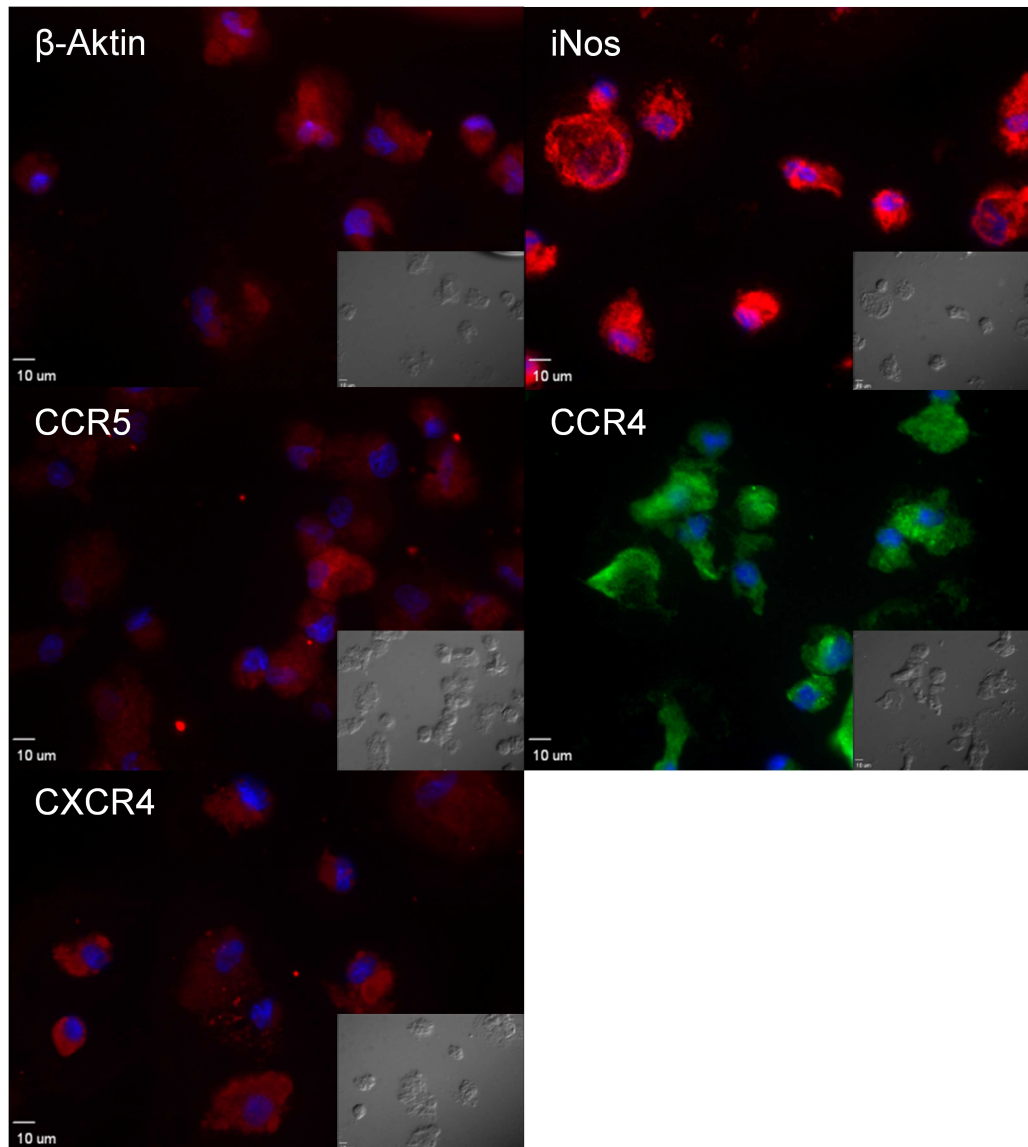


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von Zellrezeptoren

Immunhistochemischer Nachweis der Rezeptoren CCR4 (primärer Antikörper (pAk) gegen CCR4, sekundärer Antikörper (sAk) markiert mit Alexa Flour 488, grün), CXCR4 (pAk anti-CXCR4, sAk Texas Red, rot), CCR5 (P Ak anti-CCR5, sAk Texas Red, rot), des Enzyms Nitrit Oxid Synthase (iNOS) (pAk anti-CXCR4, sAk Texas Red, rot) und als Kontrolle β -Actin (pAk β -Actin, sAk Texas Red, rot). Die Bilder wurden mit einem Leica TCS SP-2 confocal Mikroskop bei 630-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Zellkerne wurden mit einem DNA/RNA-spezifischen Antikörper markiert, der bei 460nm emittiert (blau). Die kleinen Abbildungen rechts sind die entsprechenden Aufnahmen im Differentialinterferenzkontrastmodus des Mikroskops. Der Maßstab in der linken unteren Ecke der Bilder entspricht 10 μ m.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der HD-Zellen

4.1.1 Hämatopoetische Differenzierung CD34⁺ ASCs

Wie in Kapitel 1.4 erwähnt, spielen neben Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen, T-Lymphozyten eine wichtige Rolle in der frühen und latenten Phase der HIV-Infektion [Kap. 1.3 und Kap. 1.4, Seite 3-7]. In der postnatalen Periode sowie im Erwachsenenalter entwickeln sich diese Zellen der myeloischen Reihe aus CD34-positiven Progenitorzellen. Der Nachweis, dass aus CD34-positiven hämatopoetischen Progenitorzellen hervorgehende Makrophagen eine Empfänglichkeit für eine Infektion mit dem HI-Virus aufzeigen, wurde bereits erbracht [79]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich auch klonal expandierte CD90-, CD105-, CD44-positiv und CD4-, CD34-, CD45-, CD11b- und CD68-negative Subpopulationen von ASCs in myeloide Zellen differenzieren [68], welche ebenfalls eine aktive HIV-Infektion unterhalten können. Da die differenzierten Zellen neben den monozytären Attributen auch Eigenschaften anderer hämatopoetischer Zelllinien aufweisen, findet in dieser Abhandlung eine terminologische Differenzierung zu monozytären Zellen statt. Die Expression von L-Selektin (*SELL*) [Abbildung 11, Seite 38], welches früh im Differenzierungsprozess von hämatopoetischen Stammzellen zu Lymphozyten exprimiert wird, gibt unter anderem einen Hinweis darauf, dass die vorliegenden Zellen sich noch in einem frühen Stadium der hämatopoetischen Differenzierung befinden könnten [80] [Abbildung 20, Seite 50]. Dagegen zeigen die Zellen jedoch eine signifikant gesteigerte Transkription des CD68-Rezeptors, welcher in den ASCs vorher nicht exprimiert war. CD68 ist einer der wichtigsten Zelloberflächenmarker der Monozyten. Obendrein weisen die vorhergegangenen funktionalen Studien der HD-Zellen auf ihre Makrophagen-ähnlichen Eigenschaften hin [9]. Aufgrund dieser nicht ganz eindeutigen Expressionsmuster wurde in dieser Studie davon abgesehen die differenzierten Zellen als Monozyten oder Makrophagen zu bezeichnen. Stattdessen wird durchgängig die Bezeichnung „HD-Zellen“ verwendet.

4.1.2 Korezeptorexpression

Im Übrigen belegen die vorliegenden Ergebnisse aus der Transkriptomanalyse, dass die HD-Zellen auf die Inkubation mit HI-Viren in Form einer Hochregulation von Genen reagierten, welche für die Unterhaltung einer retroviralen Infektion mit HIV notwendig sind [Abbildung 20, Seite 50].

Im Vorfeld dieses Experiments wurde gezeigt, dass die HD-Zellen bereits in der frühen Differenzierung den T-Lymphozytenmarker *CD4* exprimieren [9], welches durch das Vorhandensein und die Hochregulierung der *CD4*-Transkripte in den HD-Zellen bestätigt wurde [Abbildung 10, Seite 37]. Der fehlende immunhistochemische Nachweis des *CD4*-Rezeptors ließe sich durch eine sehr geringe Expression unterhalb der Nachweisgrenze der Immunhistochemie erklären. Die signifikant höhere Expression der *CD4*-mRNA in HUT78-Zellen unterstützt diese These. Ferner wurde für hämatopoetische Zellen *in vitro* nachgewiesen, dass der *CD4*-Rezeptor nur eine untergeordnete Rolle spielen kann und für die HIV-Infektion die Expression der Korezeptoren *CCR5* oder *CXCR4* entscheidend sind [81, 82]. Der Nachweis einer produktiven Infektion in HD-Zellen [Kap. 3.3, Seite 39] stünde daher nicht im Widerspruch zu einem fehlendem Nachweis des *CD4*-Rezeptors. Retrospektiv betrachtet, hätte wegen ihrer höheren Sensitivität eine flusszytometrische Untersuchung der Zellen diesen Nachweis der Expression ermöglicht.

Eine weitere Voraussetzung für den Eintritt des Virus in die HD-Zellen ist die Expression der für die Fusion mit der Wirtsmembran verantwortlichen Korezeptoren *CCR5*, *CCR4* und *CXCR4* [Abbildung 20, Seite 50]. Ihre Expression wurde sowohl mittels PCR als auch immunhistochemisch belegt. Dies erklärt die Empfänglichkeit der HD-Zellen für den R5-Stamm und X4-Stamm des HIV-1. Verglichen mit *CCR5* und *CCR4* zeigten die Zellen vor und nach der Exposition mit HIV-1 eine signifikant höhere Expression von *CXCR4*. Diese korrelieren mit den leichten jedoch nicht signifikanten Unterschieden der p24-Produktion in R5- und X4-infizierten HD-Zellen. Insgesamt zeigten HD-Zellen verglichen mit infizierten HUT78-Zellen eine höhere Expression monozytärer (*CCR4*, *CCR5*) als lymphatischer Rezeptoren (*CD4* [$p \leq 0.05$]).

4.2 Infektionsgeschehen in den HD-Zellen

4.2.1 Chemokinsekretion in HD-Zellen

Nicht nur in Bezug auf ihre Zelloberflächenrezeptoren weisen die vorliegenden Ergebnisse auf den Wandel der mesenchymalen Stammzellen des Fettgewebes zu hämatopoetischen Zellen hin. Wie in Abbildung 20 verdeutlicht, sind in postexpositionellen HD-Zellen, wenn man von *CX3CL* und *CCL8* (Endothelien) sowie IL2 (T-Lymphozyten) absieht, die für Monozyten spezifischen Chemokine signifikant erhöht exprimiert.

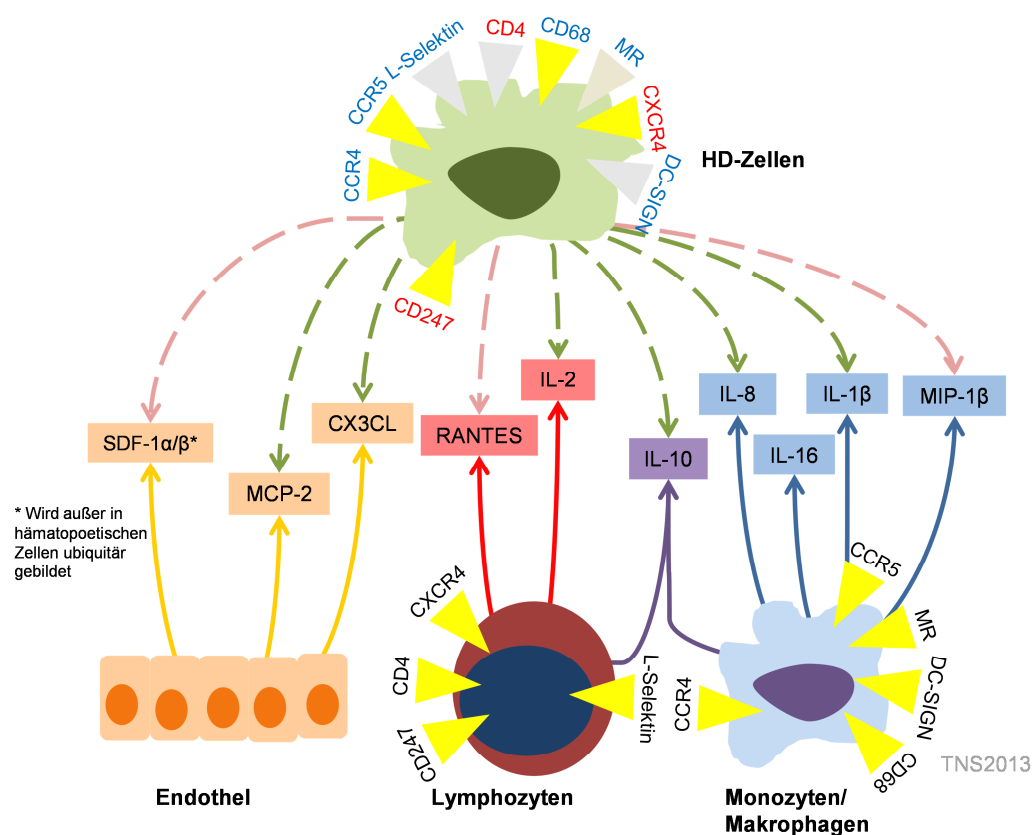


Abbildung 20: Rezeptoren und Chemokine der HD-Zellen

Schematische Darstellung der Oberflächenrezeptoren und sezernierten Chemokine von Endothelzellen, Lymphozyten und Monozyten, die in dem PCR-Array bzw. in der IHC untersucht worden sind (basierend auf Taschenatlas der Immunologie, Seite 314-338, [83]). Im oberen Teil der Abbildung ist eine HD-Zelle mit den entsprechenden Molekülen dargestellt. Die gestrichelten Linien (grün vor und rot nach HIV-Exposition) sollen die mögliche Sezernierung von Chemokinen bei Nachweis von mRNA-Transkripten im PCR-Array widerspiegeln. Rezeptoren, deren mRNA nur in den Arrays nachgewiesen wurde, sind grau und Rezeptoren mit IHC-Nachweis gelb gekennzeichnet.

So zeigen HD-Zellen selbst ohne Exposition mit HIV-1 eine signifikante Erhöhung von Transkriptionsprodukten der Gene für die Interleukine-1, -8, -10 und -16, deren

Sekretion normalerweise hauptsächlich durch Monozyten und Makrophagen erfolgt [83]. Zusätzlich wies die Vorgängerstudie zu diesem Experiment für die nativen sowie aktivierten HD-Zellen die Sezernierung von Interleukin-1, -2 und -10 nach [9]. Von besonderer Bedeutung könnte hierbei die erhöhte Expression der Chemokine *CCL5* (*RANTES*) und *CCL4* (*MIP-1 β*) in postexpositionellen HD-Zellen sein. Während *RANTES* unter anderem durch Interleukin-1 aktivierte T-Lymphozyten und *MIP-1 β* von aktivierten Makrophagen ausgeschüttet werden, binden beide Chemokine an den CCR5-Rezeptor von Promyelozyten. Auf diese Weise stimulieren sie nicht nur Progenitorzellen zur weiteren Differenzierung, sondern konkurrieren im HIV-Infizierten um die Bindung am CCR5-Rezeptor und unterbinden so die Virus-Zellmembran-Fusion des R5-Stammes [84, 85]. Derselbe Mechanismus gilt für den *SDF-1 β/α* , welcher mit dem X4-Stamm des HIV-1 um die Rezeptorbindung an *CXCR4* konkurriert [52]. Die drei Chemokine *SDF-1 β/α* , *RANTES* und *MIP-1 β* waren in dieser Untersuchung nicht nur im Vergleich zu nativen HD-Zellen sondern auch im Vergleich zu infizierten HUT78-Zellen erhöht, wobei der Anstieg der *SDF-1 β/α* - und *MIP-1 β* -Transskripte signifikant war ($p \leq 0.01$) [Abbildung 17 A]. Dies könnte die niedrigere p24-Produktion in HD-Zellen nach Exposition mit R5- sowie X4-Stämmen erklären, was auf eine geringere Virusproduktion bzw. geringere Anzahl an infizierten Zellen hinweisen würde.

4.2.2 Korezeptorexpression nach HIV-Exposition

Dem CXCR4-Rezeptor kommt außerdem eine weitere Bedeutung zu. Wie einleitend bereits erwähnt, zeichnen sich frisch infizierte Patienten bei Serokonversion durch das Vorkommen von einer deutlich höheren Anteil an R5- als X4-HI-Viren aus [Kapitel 1.4, Seite 7]. Dies erklärt sich durch die Eigenschaft des viralen Proteins *tat*, dass den CXCR4-Rezeptor auf den Zellen blockiert und so den Eintritt von X4-Viren am Anfang der Infektion verhindert. Erst später, mit Abnahme des *tat*-Proteins, nimmt die Konzentration an X4-Viren im Serum zu. Durch den Nachweis der *tat*-mRNA in mit dem X4-Virus infizierten HD-Zellen liegt es nahe anzunehmen, dass *tat* bei Translation und Sekretion in die Zellkultur den CXCR4-Rezeptor anderer HD-Zellen blockieren könnte.

Tat hat jedoch nicht nur einen hemmenden Effekt auf den CXCR4-Rezeptor, sondern kann auch seine eigene sowie die Expression von *CCR5* in hämatopoetischen

Vorläuferzellen steigern [86, 87]. Wie in Kapitel 1.3 erwähnt, nimmt das *tat*-Protein mehrere Funktionen im Infektionszyklus des HIV-1 ein. Durch seine Sekretion aus infizierten Zellen stimuliert es benachbarte Zellen, vermehrt die HIV-Korezeptoren zu exprimieren, wobei hier besonders *CCR5* betroffen ist [88, 89]. Diese Beobachtung wurde in den infizierten HD-Zellen bestätigt [Abbildung 17, Seite 45].

4.2.3 Mikroumfeld der HD-Zellen

Die Expressionssteigerung der Chemokine in HD-Zellen und die *tat*-Expression werfen eine weitere Frage auf, welche in dieser Studie nicht weiter untersucht wurde. Die Auswirkungen, welche die *tat*-Sekretion für das Mikroumfeld der HD-Zellen hat, wurden im vorherigen Abschnitt [Kapitel 4.2.2] bereits besprochen. Die Transkripte der Chemokin-Gene, welche nach HIV-Exposition mit HIV-1 hochreguliert waren, konnten bereits aus nicht stimulierten, nativen HD-Zellen isoliert werden [Abbildung 11, Seite 38]. Obwohl kein Proteinnachweis im Rahmen dieses Experiments erbracht wurde, deuten die signifikanten Expressionssteigerungen der Chemokine *MIP-1 β* , *RANTES* und *SDF-1 β / α* darauf hin, dass diese translatiert und möglicherweise an die Umgebung abgegeben wurden. *In vivo* könnte die Freisetzung von *RANTES* und *SDF-1 β / α* außerdem zu einer Rekrutierung von hämatopoetischen Progenitorzellen und deren Stimulation zur Differenzierung (*MIP-1 β*) führen.

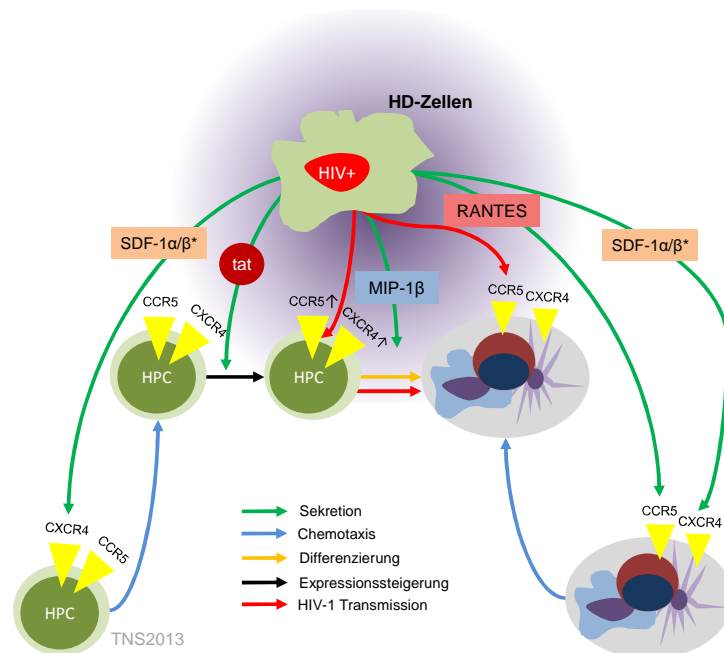


Abbildung 21: Mögliches Mikroumfeld der HD-Zellen

Die Grau hinterlegten Zellhaufen stellen die Gesamtheit von hämatopoetischen Zellen dar.

Zukünftige Untersuchungen des Mikroumfeld *in vitro* und *in vivo* könnten zeigen, ob infizierte HD-Zellen durch Sekretion von Chemokinen und *tat* in ihre Umgebung ein Reservoir für das HIV-1 aufrechterhalten [Abbildung 21].

4.2.4 Verlauf der HIV-Infektion in HD-Zellen

Wenngleich die p24-Titer einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu nicht exponierten ASCs zeigten, war gleichzeitig auch der Unterschied zu HUT78 signifikant niedriger. Diese Beobachtung spiegelte sich auf der Expressionsebene anhand der *gag*-mRNA wider, wobei der Unterschied zwischen HD-Zellen und HUT78 nicht signifikant war. Mögliche Ursachen dafür wurden in vorherigen Abschnitten bereits erläutert [Kap. 4.2.2, Seite 51, Kap. 4.2.3, Seite 52]. Darüber hinaus zeigten sich, wenn auch nicht signifikant, in acht Tage alten HD-Zellen höhere p24-Titer als in fünf Tage alten. Diese Beobachtung, welche in R5- sowie X4-infizierten HD-Zellen erkennbar ist, ließe sich mit der weiteren Reifung der Zellen im Zuge der Differenzierung erklären. Eine gesonderte Prüfung von Expressionsraten von Rezeptoren und Kofaktoren in den unterschiedlichen Stadien der Differenzierung zur Validierung des Reifungsprozesses wurde in dieser Studie nicht durchgeführt.

Eine weitere Besonderheit der HD-Zellen war die fehlende Zunahme des p24-Proteins und der mRNA-Konzentration im zeitlichen Verlauf. Während die HUT78-Zellen fünf Tage nach HIV-Exposition signifikant höhere p24-Titer aufwiesen, stiegen die Titer in HD-Zellen nur geringfügig an und sanken in manchen Fällen sogar. Bei der mikroskopischen Kontrolle der Zellkulturen fiel auf, dass die HD-Zellen besonders nach HIV-Exposition spätestens nach vier Tagen vermehrt Zelldebris aufwiesen, was ein Hinweis auf abgestorbene Zellen ist. Die mangelnde Zunahme an viraler Proteinproduktion kann demzufolge eine durch die Infektion bedingte erhöhte Apoptoserate innerhalb der Zellkultur gewesen sein. Hinweise für eine mögliche Aktivierung der zur Apoptose führenden Signaltransduktionswege gab die relative Expressionssteigerung der proapoptotischen Gene *BAX*, *CASP3* und *GADD45A*. Hierbei wurde unter anderem beschrieben, dass das *env*-Protein des HIV über den CD4- und CXCR4-Rezeptor das Bcl-2 assoziierte Protein X (*BAX*) aktiviert und so die Permeabilisierung der Mitochondrien induziert [90, 91]. Die Hochregulierung des Caspase 3-Gens (*CASP3*), welches durch eine von *BAX* induzierten Kaskade aktiviert wird, würde darüber hinaus die These der *env*-induzierten Apoptose untermauern. Als

weitere virales Protein wurde für das virale Protein *vpr* eine Induktion der Apoptose in HIV-infizierten Zellen durch das *GADD45a* belegt. *GADD45a* wird in Zellen exprimiert, die aufgrund einer Schädigung ihrer DNA in einem G2-Arrest verweilen [92].

Zukünftige Untersuchungen könnten mittels Annexin-5-Färbungen der Zellen und Untersuchung der p24-Produktion in kürzeren Zeitintervallen diesen Erklärungsansatz validieren.

4.2.5 Expressionskontrolle in HD-Zellen

Es wurde bereits erläutert, wie groß der Einfluss des Virus auf die Regelmechanismen der Transkription ist [Kap. 1.3, Seite 3]. Die Aktivität und die Fähigkeit einer Zelle zur Zellteilung bestimmt unter anderem, ob sich das Virus stumm in das Genom integriert oder sich in der Wirtszelle vermehrt. In HD-Zellen fiel neben den Genexpressionen von *CDKN1A* und *CDK7* besonders die der *CDK9* ins Auge, welche in den infizierten HD-Zellen verglichen zu den nicht exponierten HD-Zellen und infizierten HUT78-Zellen hochreguliert war. Im frühen Infektionszyklus aktiviert das virale Protein *tat* über eine Phosphorylase die zelleigene Zytokinkinase 9, um die eigene Transkription zu potenzieren [Abbildung 3, Seite 6]. Es sei an dieser Stelle auch der HIV-*tat*-spezifische Faktor 1 erwähnt (*HTATSF1*), welcher es dem Virus ermöglicht, durch Transkriptionskontrolle das richtige Verhältnis von Virusproteinen in der Zelle aufrechtzuerhalten [93]. Die ebenfalls an diesem Prozess beteiligte p65-Subeinheit des *NFκB*, der *NFκB1A* wurde mit einer ähnlich hohen Expressionsrate, wie in infizierten HUT78-Zellen gemessen, obwohl die regulierenden Zellrezeptoren, wie *TNFSF10*, *IRF1* und 2, höhere Expressionsraten in den infizierten HD-Zellen zeigten. Dennoch stärkt die für HIV-infizierte T-Lymphozyten typische Hochregulierung des *CDK9* die Annahme einer aktiven Replikation des Virus in HD-Zellen [94, 95].

Ferner zeigten die HD-Zellen eine gesteigerte Expression des *STAT3*- und *CDKN1A*-Gens. In gesunden Zellen wandert das durch Chemokinstimulation aktivierte, zytoplasmatische Protein *STAT3* (Signal transducer and activator of transcription) in den Zellkern und aktiviert dort die *CDK9* und den cycline dependent inhibitor 1 (p21/*CDKN1A*). Während *STAT3* durch die Aktivierung der *CDK9* die Teilung der Zellen verursacht, ist das p21 ein wichtiger Regulator des Zellzyklus [96]. Die

Chemokinsekretion infizierter Zellen kann daher Wachstum und Zellteilung benachbarter Zellen stimulieren und somit die Grundvoraussetzung für eine aktive Virusproduktion schaffen. Es würde den verglichen mit nicht infizierten HD-Zellen starken Expressionsanstieg der den Zellzyklus aktivierenden Gene erklären [Kap.3.2, Seite 37]. Obendrein wurde für das *p21* eine Suppression der HIV-Infektion durch Komplexbildung mit der viralen Integrase in hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen [97]. Dieser Effekt wurde bei hohen Expressionen dieses Gens aufgezeigt und könnte eine Erklärung für die messbar geringere Virusproduktion in HD-Zellen sein.

Zusammenfassend legt die Analyse der Expression Zellzyklus-relevanter Gene in HD-Zellen die Vermutung nahe, dass über die Integration des Provirus hinaus, durch Aktivierung wichtiger Schlüsselfaktoren der Zellteilung und Transkription, die Grundvoraussetzungen für die Virusreplikation geschaffen werden. Wenngleich das Expressionsmuster Unterschiede zu infizierten HUT78-Zellen zeigt, muss bedacht werden, dass es sich bei den HD-Zellen wahrscheinlich um eine heterogene Zellkultur handelt. Es muss davon ausgegangen werden, dass sich die differenzierten Zellen teilweise in unterschiedlichen Differenzierungs- und Reifestadien befinden. Diese Vermutung wird auch durch den nicht ganz eindeutig zu definierenden Zelltyp [Kap. 4.1, Seite 48] unterstützt. Zukünftige Untersuchungen sollten daher auch eine Analyse des Zellzyklus zum Beispiel mittels einer flusszytometrischen Messung einschließen.

4.2.6 Aktivierung der antiretroviralen Immunabwehr in HD-Zellen

Die HD-Zellen reagieren offensichtlich nicht nur mit der Expressionssteigerung von Genen, welche die HIV-Infektion unterstützen, sondern auch mit solchen, welche sie behindern. Einige Mechanismen wurden bereits in vorherigen Abschnitten beschrieben und sollen hier noch einmal im Gesamtkontext betrachtet werden [Kap. 4.2.3, Seite 52, Kap. 4.2.5, Seite 54]. Die Hochregulation dieser Gene in HD-Zellen mag eine Erklärung bieten, warum diese bei Weitem nicht den Grad an aktiver Virusreplikation zeigen, wie HUT78-Zellen. Während die Expression der Gene *PPIA* und *TRIM5* annähernd der Expression von infizierten HUT78 entsprach, zeigte sich in infizierten HD-Zellen eine deutlich höhere Expression von *APOBEC3F*. Diesen drei Genen ist gemein, dass sie bei retroviralem Befall in der Lage sind, den

Infektionszyklus an spezifischen Punkten zu unterbinden. *TRIM5 alpha*, dessen genetische Variante im Rhesus Affen die HIV-1-Infektion unterbindet [98], vermag als pattern recognition molecule (PRM) das virale Kapsid zu erkennen und zu deaktivieren. Dies geschieht unter anderem durch die Komplexbildung mit Cyclophilin A (*PPIA*), welches in infizierten HD-Zellen hochreguliert war.

Da die oben genannten Gene in HUT78-Zellen jedoch eine ähnliche Expression zeigen, würde nur der Anstieg von Transkripten des *APOBEC3F*- und *TAT-SF*-Gens die niedrigere Virusproduktion erklären. Die Familie der Apolipoprotein B mRNA editing Enzyme (*APOBEC*) sind auf der einen Seite zwar als potenter Inhibitor der retroviraler Infektionen bekannt, werden jedoch von dem durch HIV-Stämme exprimierten Protein *vif* neutralisiert [Tabelle 1, Seite 5]. In *vif*-negativen HIV-Stämmen vermag dieses Enzym durch Desaminierung der viralen Transkripte die Replikation des Virus zu unterbinden [99, 100]. Die Hochregulierung der Gene *BANF1*, *BTRC*, *CD209*, *APOBEC3F* und *TAT-SF1* weisen auf eine produktive Replikation des Virus in den HD-Zellen hin, ähnlich wie es vom Ablauf der Infektionszyklen in T-Zellen bekannt ist.

Zusammengenommen gibt die Expression dieser Gene den Hinweis, dass HD-Zellen auf die Integration des Provirus mit der Hochregulierung von retroviralen Abwehrmechanismen reagieren. Der Unterschied in Expression alleine kann aber nicht für den Unterschied in Virusproduktion verantwortlich gemacht werden.

4.3 HD-Zellen und HIV im Gesamtkontext

Die Ergebnisse der Studie weisen erstmalig nach, dass hämatopoetische Differenzierungsprodukte (HD-Zellen) der im Fettgewebe befindlichen mesenchymalen Stammzellen sich *in vitro* durch eine Empfänglichkeit gegenüber den R5- und X4-Stämmen des HIV-1 auszeichnen. Durch Expression von Oberflächenrezeptoren, wie *CCR5*, *CXCR4* und im geringen Umfang *CD4*, ermöglichen sie den Eintritt und die Replikation des Virus. Dies geschieht, ähnlich wie in Makrophagen und Monozyten *in vivo*, in einem viel geringeren Umfang als in *CD4*-positiven T-Lymphozyten, was sich in geringeren p24-Titern im Zellüberstand widerspiegelt. Dennoch offenbaren sie, anders als Makrophagen und Monozyten, eine höhere Empfindlichkeit gegenüber den zytopathischen Effekten des HI-Virus. Die

Ursache hierfür liegt am ehesten in der Aktivierung der Apoptose durch das virale Hüllenprotein.

Außerdem geben die Ergebnisse der Transkriptomanalyse Anhalt für die Entwicklung eines Mikroumfeldes *in vitro*, welches durch die Ausschüttung von Chemokinen durch HD-Zellen eine Infektion aufrecht erhalten und benachbarte, nicht infizierte Zellen, mit einbeziehen könnte. Die Übertragung dieser Erkenntnis auf *in vivo* Modelle haben das Potential die erfolgreiche Immunevasion des Virus besser zu verstehen und neue Therapiestrategien zu entwickeln [Kap.4.4, Seite 58]. Auch muss aufgrund des wiederholten Nachweises des hämatopoetischen Differenzierungspotentials von ASCs überlegt werden, ob diese Zellen von infizierten gewebständigen Makrophagen rekrutiert und so in das Infektionsgeschehen mit einbezogen werden. Auch wenn diese Studie bei einer MOI von 0,1 keine Hinweise auf eine Integration des Virus in genomische DNA der ASCs hergibt, kann die Freisetzung von Zytokinen infizierten hämatopoetischen Zellen ein Mikroumfeld schaffen, welches die hämatopoetische Differenzierung weiterer ASCs anregt. Darüber hinaus deuten noch nicht veröffentlichte Ergebnisse aus aktuellen Versuchen unseres Labors darauf hin, dass ASCs, welche zuvor einer hohen Viruslast ausgesetzt wurden (10 MOI), nach Induktion der hämatopoetischen Differenzierung HI-Viren produzieren. Es muss daher die Frage gestellt werden, das HIV bei ausreichender Viruslast in ASCs eindringen oder an ihrer Zelloberfläche binden kann. Es wurde bereits zuvor für unterschiedliche *CD4*-negative Zelltypen belegt, dass sie das Virus binden und damit seine Infektiösität aufrechterhalten. Bei Kokultivierung dieser exponierten Zellen mit *CD4*-positiven Zellen kam es zu einer Transmission der Viren auf die *CD4*-positiven Zellen [101]. Als mögliche *CD4*-negative Zelltypen wurden neben hämatopoetischen Zellen wie Erythrozyten, Thrombozyten, dendritische Zellen auch Epithelien diskutiert [82, 102]. Mögliche Rezeptoren, die eine solche Bindung vermitteln, sind *CD209* (*DC-SIGN*), das Mannose Binding Lektin sowie Heparansulfat Proteoglykane [82, 103, 104].

Die für eine valide Aussage nur unzureichenden Untersuchungen der ASCs mittels RT-PCR nach HIV-Exposition gaben den Hinweis, dass die Zellen nach der Exposition mit dem Zellüberstand von HTLVIII B-Zellen ein erhöhtes hämatopoetisches Differenzierungspotential entwickelten, welches durch eine

Bindung des Virus an noch zu identifizierende Rezeptoren vermittelt sein könnte. Eine Studie von Sankal et al. zeigte, dass das Virus in *CD4*-negativen ASCs von HIV-infizierten Patienten eine erhöhte Adiponektin-Sekretion induzierte [105]. Kokulturen von ASCs und zum Beispiel infizierten Makrophagen hätten das Potential, diese Wechselwirkungen von infizierten hämatopoetischen Zellen und ASCs für ein *in vitro* Modell zu beantworten.

4.4 Ausblick und mögliche Therapeutische Anwendungsgebiete der ASCs

Zu Beginn dieser Abhandlung wurde im Hinblick auf erfolgreiche Therapieversuche der HIV-Infektion bereits auf die Rolle der Chemokin-Rezeptor-Mutante *CCR5Δ32* hingewiesen [59, 60]. Bei diesem Forschungsansatz werden Möglichkeiten gesucht, durch Manipulationen des *CCR5*-Rezeptors die natürliche HIV-Immunität der Mutationsträger zu kopieren. Während die pharmakologische Blockierung des Rezeptors durch Maraviroc zwar erfolgreich die Viruslast reduziert, verzeichneten die Ärzte der Charité in Berlin den bisher einzigen eindeutigen Heilungserfolg eines HIV-positiven Patienten durch die in Kapitel 1.6 [Seite 10] beschriebene Stammzelltransplantation. Dieser erste erfolgreiche Versuch dürfte jedoch aufgrund der hohen Komplikationsraten und des Mangels an passenden Spendern sicher nur eine Ausnahme darstellen. Darüber hinaus hat die nebenwirkungsarme Therapie mit Maraviroc und seinen Nachfolgesubstanzen wie Vicriviroc die Effizienz der ART deutlich erhöht, ohne jedoch die erhoffte Elimination des Virus herbeizuführen [106, 107].

Nach jetzigem Stand der Forschung bietet dennoch die Stammzelltherapie die größten Chancen auf die Eliminierung des HIV aus infizierten Individuen. Wie beschrieben, hat es bereits erfolgreiche *in vitro* und *in vivo* Studien gegeben, bei denen es gelang, gentechnisch *CCR5Δ32*-positive Stammzellen zu generieren. Am erfolgversprechendsten ist hierbei die Anwendung von Zinkfinger-Nukleasen, welche eine über mehrere Zellgenerationen stabile Gen-Mutation erzeugen [57, 58].

Aufgrund ihrer einfachen Isolation und ihrem großen Vorkommen im Fettgewebe böten sich ASCs als potentielle Stammzellen für eine Stammzelltherapie an. In der Folgestudie wird daher zurzeit untersucht, ob sich ASCs, in denen das *CCR5*-Gen durch Zinkfinger-Nukleasen verändert wurde, in hämatopoetische Zellen ohne den *CCR5*-Rezeptor differenzieren lassen, und ob diese eine Immunität gegenüber dem

HIV-1 besitzen. Die Zinkfinger-Nuklease bindet dabei spezifisch mit ihrer DNA-bindenden Domäne am CCR5-Genlokus der zellulären DNA. Die gekoppelte Restriktionsendonuklease *Fok I* erzeugt innerhalb des Gens einen DNA-Bruch, welcher durch zelleigene DNA-Reparaturmechanismen wieder zusammengefügt wird. Das daraus resultierende Transkriptionsprodukt ist ein CCR5-Rezeptor, der wie die Mutante *CCR5Δ32* nicht an der Zelloberfläche exprimiert und mit Hilfe eines Western-Blot nachgewiesen wird [57, 108]. Die weitere prinzipielle Vorgehensweise ähnelt dem bereits beschriebenen Versuchsaufbau [Seite 13] und wird in Abbildung 22 skizziert.

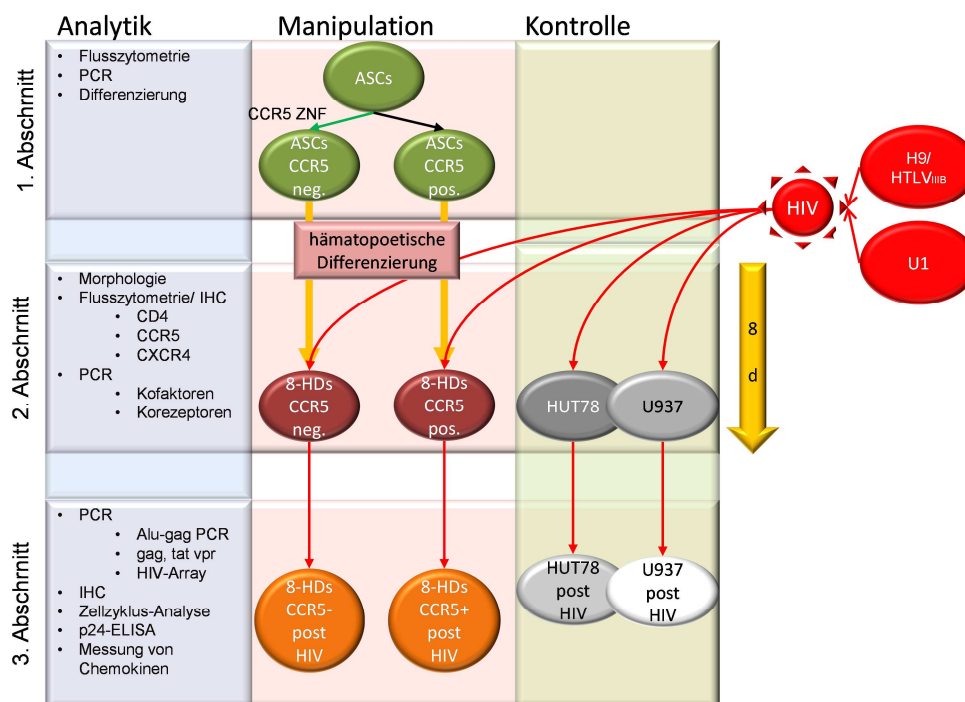


Abbildung 22: Studiendesign Folgestudie

Die Folgestudie besteht ebenfalls aus drei Abschnitten (rosa) und wurde neben dem Grunddesign um einige methodische Verfahren erweitert. Im Zentrum steht das Gene-Silencing (grüner Pfeil) durch die CCR5-spezifische Zinkfinger Nuklease (CCR5 ZNF). 8-HDs= 8 Tage Stimulation zur hämatopoetischen Differenzierung, IHC= Immunhistochemie, d: Tag, neg. = negativ, pos.= positiv

Die Erfahrungen der beschriebenen Studie [66] veranlasst jedoch dazu, einige Veränderungen zu realisieren. So werden Oberflächenrezeptoren der differenzierten Zellen neben der Immunhistochemie auch flusszytometrisch untersucht. Dies bietet, neben der höheren Sensitivität, den Vorteil, Subpopulationen innerhalb der HD-Zellen zu identifizieren. Außerdem sollen die infizierten HD-Zellen bezüglich ihrer Chemokinausschüttung mittels ELISA analysiert werden. Ferner ergibt sich die

Notwendigkeit einer Zellzyklusanalyse nach HIV-Exposition. Als letzte Änderung wird die Kontrolle um die maligne Promonozyten-Zelllinie U937 erweitert.

4.5 Limitationen der Studie

Bei der Diskussion der erhobenen Daten wurde schon in Ansätzen auf die methodischen Einschränkungen der Studie verwiesen. Ein wichtiger Aspekt bei der Betrachtung dieser Daten ist, dass einerseits durch die Selektion der Spender versucht wurde, eine homogene Gruppe von zu untersuchenden Zellen zu erstellen. Andererseits muss jedoch bedacht werden, dass, neben den Erkenntnissen aus einer kurzen Anamnese, keine weiteren Daten zu den Spendern, wie zum Beispiel ihr genetisches Profil, vorhanden waren. Es wurde zu Beginn der Einführung [Kapitel 1.6, Seite 10] bereits erwähnt, wie wichtig allein der HLA-Typ eines Individuums für den Verlauf der HIV-Infektion ist.

Des Weiteren ist die Anwendung eines PCR-Arrays eine Methode, um sich einen Überblick über bestimmte Signaltransduktionswege und Expressionsprofile einer Zelle zu verschaffen. Dieser Studie gelang es, bestimmte Regelkreise, wie die Beteiligung des Mikroumfeldes der Zellen oder die Regulierung des Zellzyklus, als potentiell wichtige Elemente der HIV-Infektion in HD-Zellen zu identifizieren. Dennoch sollte bei einer Stichprobengröße von drei bedacht werden, dass statistische Ergebnisse auch zufällig Signifikanzen ergeben können. Es ist daher essentiell die erhobenen Ergebnisse als Basis für zukünftige Studien zu sehen und die aufgestellten Thesen durch umfassendere Studien mit größeren Stichproben zu validieren.

Der Aspekt der Wechselwirkungen von HD-Zellen und ASCs mit dem R5-Stamm des HIV-1 muss, wie in der Folgestudie geplant, noch tiefergehend untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Einleitung

Mesenchymale Stammzellen des Fettgewebes könnten aufgrund ihres hämatopoetischen Potentials und ihres Vorkommens in leicht zugänglichen Geweben eine wichtige Rolle in zukünftigen Therapien der Infektion mit dem humanen Immunschwächevirus (HIV) spielen. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Studie untersucht daher hämatopoetisch differenzierte fettgewebsständige mesenchymale Stammzellen (ASCs) auf ihre Wechselwirkungen mit dem HIV-1.

Methoden

Die ASCs wurden aus humanem Fettgewebe isoliert und expandiert sowie durch Chemokin-Stimulation hämatopoetisch differenziert. Nach Exposition mit X4- und R5-Stämmen des HIV-1 wurden die HD-Zellen auf eine produktive Infektion mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und nested PCR (Polymerase Chain Reaction) untersucht. Außerdem fand eine Transkriptomanalyse auf wichtige HIV-Korezeptoren und Kofaktoren mittels RT-PCR-Arrays (Real-Time-PCR) statt. Wichtige HIV-Korezeptoren wurden des Weiteren durch eine immunhistochemische Färbung der HD-Zellen nachgewiesen.

Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen eine Monozyten-ähnliche Reaktion der HD-Zellen auf die Exposition mit dem HI-Virus. Neben dem Nachweis einer produktiven Infektion zeigten HD-Zellen signifikante Expressionssteigerungen der HIV-relevanten Rezeptoren CCR5, CXCR4 sowie CD4. Des Weiteren demonstrierten sie eine gesteigerte Expression der zellulären Faktoren, wie dem *nef* assoziiertem Faktor HCK und den *tat*-assoziierten Faktoren CDK9 sowie PPIA. Außerdem war die Genexpression von Faktoren der angeborenen Immunabwehr gegen retrovirale Infektionen wie APOBEC3F, TRIM5 und XPO1 in infizierten HD-Zellen hochreguliert. Dagegen zeigten undifferenzierte ASCs keine Hinweise auf eine aktive Virusproduktion oder Integration des HIV-1.

Diskussion

Die Voraussetzung für Eintritt, Integration und Reproduktion des Virus in HD-Zellen wird durch die Expression der HIV-Korezeptoren CCR5, CXCR4 und CD4 und Kofaktoren wie CDK9, NFκB, Exoprtin-1 und TAT-SF ermöglicht. In ihren zellulären Wechselwirkungen mit dem HIV-1 stimmen die HD-Zellen mit Zellen der myeloischen Reihe überein. Sie sind jedoch im Gegensatz zu Makrophagen und Monozyten empfindlich gegenüber den zytopathischen Effekten des HIV-1 und reagieren bei Exposition mit Expression von Apoptose-Genen, wie *BAX*, *Bcl-2* und *CASP3*. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse auf die Unterhaltung eines infektionsfördernden Mikroumfeldes durch HD-Zellen hin. Aufgrund dieser Eigenschaften könnte den ASCs und ihren Differenzierungsprodukten eine Rolle in der Latenzbildung der HIV-Infektion zukommen und sich in der Konsequenz neue Angriffspunkte für die antiretrovirale Therapie eröffnen.

Mit der Zielsetzung diese These weiter zu validieren, werden in einer Folgestudie zum einen die Exposition von nativen ASCs mit unterschiedlichen Viruslasten und zum anderen der Effekt eines CCR5-Knockouts auf die Empfänglichkeit von HD-Zellen für eine Infektion mit HIV-1 untersucht. Außerdem soll das Mikroumfeld der HD-Zellen bei Exposition mit HIV-1 näher untersucht werden.

6 Referenzen

1. Thompson, M.A., J.A. Aberg, J.F. Hoy, A. Telenti, C. Benson, P. Cahn, J.J. Eron, H.F. Gunthard, S.M. Hammer, P. Reiss, D.D. Richman, G. Rizzardini, D.L. Thomas, D.M. Jacobsen, and P.A. Volberding, *Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel*. JAMA, 2012. **308**(4): p. 387-402.
2. Nakagawa, F., R.K. Lodwick, C.J. Smith, R. Smith, V. Cambiano, J.D. Lundgren, V. Delpech, and A.N. Phillips, *Projected life expectancy of people with HIV according to timing of diagnosis*. AIDS, 2012. **26**(3): p. 335-43.
3. *Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012*. 2012 [cited 2012 5. Dezember 2012]; Available from: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf.
4. *Epidemiologisches Bulletin 47/2012*. 2012 [cited 2012 5. November 2012]; Available from: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2012/Ausgaben/47_12.pdf?__blob=publicationFile.
5. Zuk, P., M. Zhu, P. Ashjian, D. De Ugarte, J. Huang, H. Mizuno, Z. Alfonso, J. Fraser, P. Benhaim, and M. Hedrick, *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**: p. 4279 - 4295.
6. Zuk, P., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. Futrell, A. Katz, P. Benhaim, H. Lorenz, and M. Hedrick, *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7**: p. 211 - 228.
7. Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell, *Adipose-derived stem cells for regenerative medicine*. Circ Res, 2007. **100**(9): p. 1249-60.
8. Izadpanah, R., C. Trygg, B. Patel, C. Kriedt, J. Dufour, J. Gimble, and B. Bunnell, *Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue*. J Cell Biochem, 2006. **99**: p. 1285 - 97.
9. Freisinger, E., C. Cramer, X. Xia, S. Murthy, D. Slakey, E. Chiu, E. Newsome, E. Alt, and R. Izadpanah, *Characterization of hematopoietic potential of mesenchymal stem cells*. J Cell Physiol, 2010. **225**: p. 888 - 97.
10. Zhu, T., B.T. Korber, A.J. Nahmias, E. Hooper, P.M. Sharp, and D.D. Ho, *An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 594-7.
11. De Cock, K.M., *Epidemiology and the emergence of human immunodeficiency virus and acquired immune deficiency syndrome*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001. **356**(1410): p. 795-8.

12. Huang, A., J.W. Hogan, S. Istrail, A. Delong, D.A. Katzenstein, and R. Kantor, *Global analysis of sequence diversity within HIV-1 subtypes across geographic regions*. *Future Virol*, 2012. **7**(5): p. 505-517.
13. Barre-Sinoussi, F., *HIV as the cause of AIDS*. *Lancet*, 1996. **348**(9019): p. 31-5.
14. Alkhatib, G., C. Combadiere, C.C. Broder, Y. Feng, P.E. Kennedy, P.M. Murphy, and E.A. Berger, *CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1*. *Science*, 1996. **272**(5270): p. 1955-8.
15. Zaitseva, M., K. Peden, and H. Golding, *HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1614**: p. 51 - 61.
16. Zhu, P., J. Liu, J. Bess, Jr., E. Chertova, J.D. Lifson, H. Grise, G.A. Ofek, K.A. Taylor, and K.H. Roux, *Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes*. *Nature*, 2006. **441**(7095): p. 847-52.
17. *Los Alamos HIV Database*. 2013 [cited 2013 February 6th 2013]; Available from: <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>.
18. Ratner, L., W. Haseltine, R. Patarca, K.J. Livak, B. Starcich, S.F. Josephs, E.R. Doran, J.A. Rafalski, E.A. Whitehorn, K. Baumeister, and et al., *Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III*. *Nature*, 1985. **313**(6000): p. 277-84.
19. Moore, J., S. Kitchen, P. Pugach, and J. Zack, *The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2004. **20**: p. 111 - 126.
20. Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R.E. Sutton, C.M. Hill, C.B. Davis, S.C. Peiper, T.J. Schall, D.R. Littman, and N.R. Landau, *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. *Nature*, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
21. Nekhai, S., M. Jerebtsova, A. Jackson, and W. Southerland, *Regulation of HIV-1 transcription by protein phosphatase 1*. *Curr HIV Res*, 2007. **5**(1): p. 3-9.
22. Askjaer, P., T.H. Jensen, J. Nilsson, L. Englmeier, and J. Kjems, *The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(50): p. 33414-22.
23. Pollard, V.W. and M.H. Malim, *The HIV-1 Rev protein*. *Annu Rev Microbiol*, 1998. **52**: p. 491-532.
24. Perelson, A., P. Essunger, and D. Ho, *Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo*. *AIDS*, 1997. **11**(Suppl A): p. S17 - 24.

25. Ogg, G., X. Jin, S. Bonhoeffer, P. Moss, M. Nowak, S. Monard, J. Segal, Y. Cao, S. Rowland-Jones, A. Hurley, M. Markowitz, D. Ho, A. McMichael, and D. Nixon, *Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy*. J Virol, 1999. **73**: p. 797 - 800.
26. Zhang, Z., T. Schuler, M. Zupancic, S. Wietgreffe, K.A. Staskus, K.A. Reimann, T.A. Reinhart, M. Rogan, W. Cavert, C.J. Miller, R.S. Veazey, D. Notermans, S. Little, S.A. Danner, D.D. Richman, D. Havlir, J. Wong, H.L. Jordan, T.W. Schacker, P. Racz, K. Tenner-Racz, N.L. Letvin, S. Wolinsky, and A.T. Haase, *Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1353-7.
27. Stevenson, M., T.L. Stanwick, M.P. Dempsey, and C.A. Lamonica, *HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration*. EMBO J, 1990. **9**(5): p. 1551-60.
28. Ruiz, M., C. Cicala, J. Arthos, A. Kinter, A. Catanzaro, J. Adelsberger, K. Holmes, O. Cohen, and A. Fauci, *Peripheral blood-derived CD34+ progenitor cells: CXC chemokine receptor 4 and CC chemokine receptor 5 expression and infection by HIV*. J Immunol, 1998. **161**: p. 4169 - 4176.
29. Bagnara, G., G. Zauli, M. Giovannini, M. Re, G. Furlini, and M. La Placa, *Early loss of circulating hemopoietic progenitors in HIV-1-infected subjects*. Exp Hematol, 1990. **18**: p. 426 - 430.
30. Re, M., G. Zauli, D. Gibellini, G. Furlini, E. Ramazzotti, P. Monari, S. Ranieri, S. Capitani, and M. La Placa, *Uninfected haematopoietic progenitor (CD34+) cells purified from the bone marrow of AIDS patients are committed to apoptotic cell death in culture*. AIDS, 1993. **7**: p. 1049 - 1055.
31. Koka, P., B. Jamieson, D. Brooks, and J. Zack, *Human immunodeficiency virus type 1-induced hematopoietic inhibition is independent of productive infection of progenitor cells in vivo*. J Virol, 1999. **73**: p. 9089 - 9097.
32. Neal, T., H. Holland, C. Baum, F. Villinger, A. Ansari, R. Saral, J. Wingard, and W. Fleming, *CD34+ progenitor cells from asymptomatic patients are not a major reservoir for human immunodeficiency virus-1*. Blood, 1995. **86**: p. 1749 - 1756.
33. Chelucci, C., I. Casella, M. Federico, U. Testa, G. Macioce, E. Pelosi, R. Guerriero, G. Mariani, A. Giampaolo, H. Hassan, and C. Peschle, *Lineage-specific expression of human immunodeficiency virus (HIV) receptor/coreceptors in differentiating hematopoietic precursors: correlation with susceptibility to T- and M-tropic HIV and chemokine-mediated HIV resistance*. Blood, 1999. **94**: p. 1590 - 1600.
34. Guilak, F., K. Lott, H. Awad, Q. Cao, K. Hicok, B. Fermor, and J. Gimble, *Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells*. J Cell Physiol, 2006. **206**: p. 229 - 237.

35. Woodbury, D., K. Reynolds, and I. Black, *Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis*. J Neurosci Res, 2002. **69**: p. 908 - 917.
36. Toma, C., M. Pittenger, K. Cahill, B. Byrne, and P. Kessler, *Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart*. Circulation, 2002. **105**: p. 93 - 98.
37. Fukuda, K., *Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes*. C R Biol, 2002. **325**: p. 1027 - 1038.
38. Chun, T.W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J.A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T.C. Quinn, Y.H. Kuo, R. Brookmeyer, M.A. Zeiger, P. Barditch-Crovo, and R.F. Siliciano, *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection*. Nature, 1997. **387**(6629): p. 183-8.
39. Orenstein, J.M., C. Fox, and S.M. Wahl, *Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections*. Science, 1997. **276**(5320): p. 1857-61.
40. Scadden, D., M. Zeira, A. Woon, Z. Wang, L. Schieve, K. Ikeuchi, B. Lim, and J. Groopman, *Human immunodeficiency virus infection of human bone marrow stromal fibroblasts*. Blood, 1990. **76**: p. 317 - 322.
41. Moses, A., S. Williams, M. Heneveld, J. Strussenberg, M. Rarick, M. Loveless, G. Bagby, and J. Nelson, *Human immunodeficiency virus infection of bone marrow endothelium reduces induction of stromal hematopoietic growth factors*. Blood, 1996. **87**: p. 919 - 925.
42. Canque, B., A. Marandin, M. Rosenzweig, F. Louache, W. Vainchenker, and J. Gluckman, *Susceptibility of human bone marrow stromal cells to human immunodeficiency virus (HIV)*. Virology, 1995. **208**: p. 779 - 783.
43. Sloand, E., N. Young, T. Sato, P. Kumar, S. Kim, F. Weichold, and J. Maciejewski, *Secondary colony formation after long-term bone marrow culture using peripheral blood and bone marrow of HIV-infected patients*. AIDS, 1997. **11**: p. 1547 - 1553.
44. Bahner, I., K. Kearns, S. Coutinho, E. Leonard, and D. Kohn, *Infection of human marrow stroma by human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) is both required and sufficient for HIV-1-induced hematopoietic suppression in vitro: demonstration by gene modification of primary human stroma*. Blood, 1997. **90**: p. 1787 - 1798.
45. Gill, V., R. Shattock, J. Scopes, P. Hayes, A. Freedman, G. Griffin, E. Gordon-Smith, and F. Gibson, *Human immunodeficiency virus infection impairs hemopoiesis in long-term bone marrow cultures: nonreversal by nucleoside analogues*. J Infect Dis, 1997. **176**: p. 1510 - 1516.

46. Wang, L., D. Mondal, V. La Russa, and K. Agrawal, *Suppression of clonogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by HIV type 1: putative role of HIV type 1 tat protein and inflammatory cytokines*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2002. **18**: p. 917 - 931.
47. Lawrence, D., L. Durham, L. Schwartz, P. Seth, D. Maric, and E. Major, *Human immunodeficiency virus type 1 infection of human brain-derived progenitor cells*. *J Virol*, 2004. **78**: p. 7319 - 7328.
48. Gorry, P., M. Churchill, S. Crowe, A. Cunningham, and D. Gabuzda, *Pathogenesis of macrophage tropic HIV-1*. *Curr HIV Res*, 2005. **3**: p. 53 - 60.
49. Kedzierska, K. and S. Crowe, *The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection*. *Curr Med Chem*, 2002. **9**: p. 1893 - 1903.
50. Cassol, E., M. Alfano, P. Biswas, and G. Poli, *Monocyte-derived macrophages and myeloid cell lines as targets of HIV-1 replication and persistence*. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**: p. 1018 - 1030.
51. O'Brien, S.J. and G.W. Nelson, *Human genes that limit AIDS*. *Nat Genet*, 2004. **36**(6): p. 565-74.
52. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 657-700.
53. Winkler, C., W. Modi, M.W. Smith, G.W. Nelson, X. Wu, M. Carrington, M. Dean, T. Honjo, K. Tashiro, D. Yabe, S. Buchbinder, E. Vittinghoff, J.J. Goedert, T.R. O'Brien, L.P. Jacobson, R. Detels, S. Donfield, A. Willoughby, E. Gomperts, D. Vlahov, J. Phair, and S.J. O'Brien, *Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC)*. *Science*, 1998. **279**(5349): p. 389-93.
54. Limborska, S.A., O.P. Balanovsky, E.V. Balanovskaya, P.A. Slominsky, M.I. Schadrina, L.A. Livshits, S.A. Kravchenko, V.M. Pampuha, E.K. Khusnutdinova, and V.A. Spitsyn, *Analysis of CCR5Delta32 geographic distribution and its correlation with some climatic and geographic factors*. *Hum Hered*, 2002. **53**(1): p. 49-54.
55. Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G.A. Huttley, M.W. Smith, R. Allikmets, J.J. Goedert, S.P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, R. Detels, and S.J. O'Brien, *Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study*. *Science*, 1996. **273**(5283): p. 1856-62.

-
56. Jin, Q., J. Marsh, K. Cornetta, and G. Alkhatib, *Resistance to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) generated by lentivirus vector-mediated delivery of the CCR5{Delta}32 gene despite detectable expression of the HIV-1 co-receptors*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 10): p. 2611-21.
 57. Perez, E.E., J. Wang, J.C. Miller, Y. Jouvenot, K.A. Kim, O. Liu, N. Wang, G. Lee, V.V. Bartsevich, Y.L. Lee, D.Y. Guschin, I. Rupniewski, A.J. Waite, C. Carpenito, R.G. Carroll, J.S. Orange, F.D. Urnov, E.J. Rebar, D. Ando, P.D. Gregory, J.L. Riley, M.C. Holmes, and C.H. June, *Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(7): p. 808-16.
 58. Holt, N., J. Wang, K. Kim, G. Friedman, X. Wang, V. Taupin, G.M. Crooks, D.B. Kohn, P.D. Gregory, M.C. Holmes, and P.M. Cannon, *Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(8): p. 839-47.
 59. Oh, D.Y., H. Jessen, C. Kucherer, K. Neumann, N. Oh, G. Poggensee, B. Bartmeyer, A. Jessen, A. Pruss, R.R. Schumann, and O. Hamouda, *CCR5Delta32 genotypes in a German HIV-1 seroconverter cohort and report of HIV-1 infection in a CCR5Delta32 homozygous individual*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2747.
 60. Allers, K., G. Hutter, J. Hofmann, C. Loddenkemper, K. Rieger, E. Thiel, and T. Schneider, *Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation*. Blood, 2011. **117**(10): p. 2791-9.
 61. Sekiya, I., D.C. Colter, and D.J. Prockop, *BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(2): p. 411-8.
 62. Pfister, K.K., S.E. Benashski, J.F. Dillman, 3rd, R.S. Patel-King, and S.M. King, *Identification and molecular characterization of the p24 dynactin light chain*. Cell Motil Cytoskeleton, 1998. **41**(2): p. 154-67.
 63. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, and W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. Biotechniques, 2008. **44**(5): p. 619-26.
 64. Suzuki, T., P.J. Higgins, and D.R. Crawford, *Control selection for RNA quantitation*. Biotechniques, 2000. **29**(2): p. 332-7.
 65. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
 66. Nazari-Shafti, T., E. Freisinger, U. Roy, C. Bulot, C. Senst, C. Dupin, A. Chaffin, S. Srivastava, D. Mondal, E. Alt, and R. Izadpanah, *Mesenchymal stem cell derived hematopoietic cells are permissive to HIV-1 infection*. Retrovirology, 2011. **8**(1): p. 3.

-
67. Izadpanah, R., T. Joswig, F. Tsien, J. Dufour, J. Kirijan, and B. Bunnell, *Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques*. *Stem Cells Dev*, 2005. **14**: p. 440 - 451.
 68. Freisinger, E., C. Cramer, X. Xia, S.N. Murthy, D.P. Slakey, E. Chiu, E.R. Newsome, E.U. Alt, and R. Izadpanah, *Characterization of hematopoietic potential of mesenchymal stem cells*. *J Cell Physiol*, 2010. **225**(3): p. 888-97.
 69. Schmittgen, T.D. and B.A. Zakrajsek, *Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR*. *J Biochem Biophys Methods*, 2000. **46**(1-2): p. 69-81.
 70. Schefe, J.H., K.E. Lehmann, I.R. Buschmann, T. Unger, and H. Funke-Kaiser, *Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel gene expression's CT difference"formula*. *J Mol Med (Berl)*, 2006. **84**(11): p. 901-10.
 71. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman, *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biol*, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
 72. Liszewski, M., J. Yu, and U. O'Doherty, *Detecting HIV-1 integration by repetitive-sampling Alu-gag PCR*. *Methods*, 2009. **47**: p. 254 - 260.
 73. Jelinek, W.R. and C.W. Schmid, *Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression*. *Annu Rev Biochem*, 1982. **51**: p. 813-44.
 74. Gazdar, A.F., D.N. Carney, P.A. Bunn, E.K. Russell, E.S. Jaffe, G.P. Schechter, and J.G. Guccion, *Mitogen requirements for the in vitro propagation of cutaneous T-cell lymphomas*. *Blood*, 1980. **55**(3): p. 409-17.
 75. Popovic, M., M.G. Sarngadharan, E. Read, and R.C. Gallo, *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS*. *Science*, 1984. **224**(4648): p. 497-500.
 76. Gallo, R.C., P.S. Sarin, E.P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V.S. Kalyanaraman, D. Mann, G.D. Sidhu, R.E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic, *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. *Science*, 1983. **220**(4599): p. 865-7.
 77. Folks, T.M., J. Justement, A. Kinter, C.A. Dinarello, and A.S. Fauci, *Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line*. *Science*, 1987. **238**(4828): p. 800-2.
 78. Granowitz, E.V., B.M. Saget, M.Z. Wang, C.A. Dinarello, and P.R. Skolnik, *Interleukin 1 induces HIV-1 expression in chronically infected U1 cells: blockade by interleukin 1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein type I*. *Mol Med*, 1995. **1**(6): p. 667-77.

-
79. Anderson, J.S., S. Bandi, D.S. Kaufman, and R. Akkina, *Derivation of normal macrophages from human embryonic stem (hES) cells for applications in HIV gene therapy*. *Retrovirology*, 2006. **3**: p. 24.
 80. Kohn, L.A., Q.L. Hao, R. Sasidharan, C. Parekh, S. Ge, Y. Zhu, H.K. Mikkola, and G.M. Crooks, *Lymphoid priming in human bone marrow begins before expression of CD10 with upregulation of L-selectin*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(10): p. 963-71.
 81. Wyatt, R. and J. Sodroski, *The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens*. *Science*, 1998. **280**(5371): p. 1884-8.
 82. Ugolini, S., I. Mondor, and Q.J. Sattentau, *HIV-1 attachment: another look*. *Trends Microbiol*, 1999. **7**(4): p. 144-9.
 83. Antonio Pezzutto, T.U., Gerd-Rüdiger Burmeister, *Taschenatlas der Immunologie*. 2nd Edition ed. 2007: Thieme. 362.
 84. Majka, M., T. Rozmyslowicz, B. Lee, S. Murphy, Z. Pietrzowski, G. Gaulton, L. Silberstein, and M. Ratajczak, *Bone marrow CD34(+) cells and megakaryoblasts secrete beta-chemokines that block infection of hematopoietic cells by M-tropic R5 HIV*. *J Clin Invest*, 1999. **104**: p. 1739 - 1749.
 85. Cocchi, F., A. DeVico, A. Garzino-Demo, S. Arya, R. Gallo, and P. Lusso, *Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells*. *Science*, 1995. **270**: p. 1811 - 1815.
 86. Xiao, H., C. Neuveut, H. Tiffany, M. Benkirane, E. Rich, P. Murphy, and K. Jeang, *Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000. **97**: p. 11466 - 11471.
 87. Gibellini, D., M.C. Re, F. Vitone, N. Rizzo, C. Maldini, M. La Placa, and G. Zauli, *Selective up-regulation of functional CXCR4 expression in erythroid cells by HIV-1 Tat protein*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **131**(3): p. 428-35.
 88. Huang, L., I. Bosch, W. Hofmann, J. Sodroski, and A.B. Pardee, *Tat protein induces human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) coreceptors and promotes infection with both macrophage-tropic and T-lymphotropic HIV-1 strains*. *J Virol*, 1998. **72**(11): p. 8952-60.
 89. Mondal, D., C. Williams, M. Ali, M. Eilers, and K. Agrawal, *The HIV-1 Tat protein selectively enhances CXCR4 and inhibits CCR5 expression in megakaryocytic K562 cells*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2005. **230**: p. 631 - 644.
 90. Ferri, K.F., E. Jacotot, J. Blanco, J.A. Este, N. Zamzami, S.A. Susin, Z. Xie, G. Brothers, J.C. Reed, J.M. Penninger, and G. Kroemer, *Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases*. *J Exp Med*, 2000. **192**(8): p. 1081-92.

91. Muthumani, K., A. Choo, A. Premkumar, D. Hwang, K. Thieu, B. Desai, and D. Weiner, *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism*. Cell Death Differ, 2005. **12**(Suppl 1): p. 962 - 970.
92. Andersen, J., E. Zimmerman, J. DeHart, S. Murala, O. Ardon, J. Blackett, J. Chen, and V. Planelles, *ATR and GADD45alpha mediate HIV-1 Vpr-induced apoptosis*. Cell Death Differ, 2005. **12**: p. 326 - 334.
93. Miller, H., K. Saunders, G. Tomaras, and M. Garcia-Blanco, *Tat-SF1 is not required for Tat transactivation but does regulate the relative levels of unspliced and spliced HIV-1 RNAs*. PLoS One, 2009. **4**: p. e5710.
94. Sedore, S., S. Byers, S. Biglione, J. Price, W. Maury, and D. Price, *Manipulation of P-TEFb control machinery by HIV: recruitment of P-TEFb from the large form by Tat and binding of HEXIM1 to TAR*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**: p. 4347 - 4358.
95. Giraud, S., F. Bienvenu, S. Avril, H. Gascan, D.M. Heery, and O. Coqueret, *Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8004-11.
96. Giraud, S., A. Hurlstone, S. Avril, and O. Coqueret, *Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the p21waf1 gene*. Oncogene, 2004. **23**: p. 7391 - 7398.
97. Zhang, J., D.T. Scadden, and C.S. Crumpacker, *Primitive hematopoietic cells resist HIV-1 infection via p21*. J Clin Invest, 2007. **117**(2): p. 473-81.
98. Biris, N., Y. Yang, A.B. Taylor, A. Tomashevski, M. Guo, P.J. Hart, F. Diaz-Griffero, and D.N. Ivanov, *Structure of the rhesus monkey TRIM5alpha PRYSPRY domain, the HIV capsid recognition module*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(33): p. 13278-83.
99. Dang, Y., R. Davis, I. York, and Y. Zheng, *Identification of 81LGxGxxIxW89 and 171EDRW174 domains from human immunodeficiency virus type 1 Vif that regulate APOBEC3G and APOBEC3F neutralizing activity*. J Virol, 2010. **84**: p. 5741 - 5750.
100. Berger, G., S. Durand, G. Fargier, X.N. Nguyen, S. Cordeil, S. Bouaziz, D. Muriaux, J.L. Darlix, and A. Cimarelli, *APOBEC3A is a specific inhibitor of the early phases of HIV-1 infection in myeloid cells*. PLoS Pathog, 2011. **7**(9): p. e1002221.
101. Olinger, G.G., M. Saifuddin, and G.T. Spear, *CD4-Negative cells bind human immunodeficiency virus type 1 and efficiently transfer virus to T cells*. J Virol, 2000. **74**(18): p. 8550-7.
102. Hu, Q., I. Frank, V. Williams, J.J. Santos, P. Watts, G.E. Griffin, J.P. Moore, M. Pope, and R.J. Shattock, *Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue*. J Exp Med, 2004. **199**(8): p. 1065-75.

-
103. Pohlmann, S., F. Baribaud, and R.W. Doms, *DC-SIGN and DC-SIGNR: helping hands for HIV*. Trends Immunol, 2001. **22**(12): p. 643-6.
 104. Gummuluru, S., M. Rogel, L. Stamatatos, and M. Emerman, *Binding of human immunodeficiency virus type 1 to immature dendritic cells can occur independently of DC-SIGN and mannose binding C-type lectin receptors via a cholesterol-dependent pathway*. J Virol, 2003. **77**(23): p. 12865-74.
 105. Sankale, J., Q. Tong, C. Hadigan, G. Tan, S. Grinspoon, P. Kanki, and G. Hotamisligil, *Regulation of adiponectin in adipocytes upon exposure to HIV-1*. HIV Med, 2006. **7**: p. 268 - 274.
 106. Chen, W., P. Zhan, E. De Clercq, and X. Liu, *Recent progress in small molecule CCR5 antagonists as potential HIV-1 entry inhibitors*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(1): p. 100-12.
 107. Kuritzkes, D.R., *HIV-1 entry inhibitors: an overview*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(2): p. 82-7.
 108. Urnov, F.D., J.C. Miller, Y.L. Lee, C.M. Beausejour, J.M. Rock, S. Augustus, A.C. Jamieson, M.H. Porteus, P.D. Gregory, and M.C. Holmes, *Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 646-51.
 109. Ker, H.L. (2008) *Erfolg an Berliner Charité: Aids-Kranker nach Stammzelltherapie HIV-negativ*. Spiegel Online.

7 Epilog

“Wir haben bei Ihnen leider eine Infektion mit dem HI-Virus festgestellt...” Dieser Satz mag einer der folgenschwersten sein, den wir in unserem Beruf als Arzt aussprechen müssen. Zieht man den Pressespiegel zum Weltaidstag 2012 heran, wird deutlich, dass bei den Betroffenen nicht nur die Kontrolle der Infektion sondern auch die gesellschaftlichen Aspekte der Krankheit einen großen Stellenwert haben.

Noch vor meinem Forschungsaufenthalt in den USA wurde ich auf einen am 12.11.2008 publizierten Artikel des *Spiegels* aufmerksam, welcher über den mit dem HIV infizierten Patienten Timothy Brown berichtete, der nach einer Stammzelltransplantation aufgrund einer Leukämie-Erkrankung als HIV-negativ eingestuft wurde [109].

Nicht lange nach Erscheinen dieses Artikel im *Spiegel* erhielt ich Anfang 2009 die Möglichkeit im Rahmen eines Erstforschungsauftrages der *Alliance of Cardiovascular Researchers* die Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen zu erforschen. Nachdem ich zunächst ein Projekt im Bereich der Brustkrebsforschung übernahm, um die Grundlagen der Zellkultivierung und die Basistechniken der molekulargenetischen Forschung zu erlernen, wurde ich auf ein anderes Projekt des *Applied Stem Cell Laboratory* aufmerksam. Meiner Vorgängerin in diesem Projekt, Frau Eva Freisinger, war es erstmals gelungen, eine hämatopoetische Differenzierung der Stammzellen mesenchymalen Ursprungs zu induzieren [9]. Es lag daher die Vermutung nahe, dass diese Zellen ein Potential für zukünftige therapeutische Anwendungen in der Bekämpfung der HIV-Infektion bilden können.

Motiviert durch diesen Ausblick begann ich 2009 unter der ausgezeichneten Anleitung von den Herren Dr. Izadpanah, Professor Alt und Professor Klein dieses Projekt in Angriff zu nehmen; in der Hoffnung, dass der Heilungserfolg bei dem Patienten Timothy Brown kein Einzelfall bleiben möge. Ich hoffe, dass unsere Erkenntnisse einen Beitrag dazu leisten können, dass es der Wissenschaftsgemeinde gelingt, den Schlüssel zur Heilung der HIV-Infektion zu finden.

8 Acknowledgements

When Professor Klein first introduced me to the exchange program with Tulane University in 2008 I would never have imagined what a great experience this endeavor would be. Not only did he hereby introduce me to the world of science but he has also supported me in every possible way along each step of my scientific career. For his dedication and support during these past five years I want to express my deepest gratitude.

I also want to word my greatest appreciation to Professor Alt who not only sponsored my stipend through the Alliance of Cardiovascular Researchers but has also been a great mentor to me, both in personal and professional matters. Through his and Dr. Izadpanah's patronage during my employment at the Applied Stem Cell Laboratory I have gained the necessary expertise to further thrive and learn amongst the scientific society.

Working on a scientific project like mine hugely depends on a functioning team of scientists in full dedication to their work. I had the great honor and wonderful experience of working with some of the finest and most experienced scientists in this field. This in mind, I would like to thank Dr. Izadpanah, Dr. Mondal, Professor Alt and Dr. Mageed for their continuous encouragement and guidance as well as for the broad array of laboratory skills they took time to teach me. Furthermore I want to thank my dear friends and colleagues Eva Freisinger, Dr. Christine Bulot, Samantha Gerlach, Alan Tucker, Kerstin Horner zu Bentrup, Dr. Abigail Chaffin, Dr. Charles Dupin and Dr. Roy. Their input and profound research experience made my employment at Tulane University a great working experience. I would also like to express my gratitude to my fellow students from Magdeburg Christiane Senst, Stefan Krüger and David Springer whose contribution to this project made the successful publication in a peer reviewed journal possible.

At this point I would also like to remember Dr. Edward Newsome who passed away way too soon in 2010. I will always remember him as a great teacher and supporter of my work.

Apart from the support I received during my work at the Applied Stem Cell Laboratory I experienced overwhelming support from my friends in New Orleans. Above all I would like to express my greatest appreciation to Professor Harold Erath and his wife Paula for welcoming me to the city of New Orleans and turning my stay into one of the most memorable experiences of my life.

Keeping in mind that the foundation for a scientific career is built by one's university I would like to also thank my teacher's at the Otto-von-Guericke-University in Magdeburg, especially Professor Christian Vorwerk and PD Dr. Dörthe Jechorek.

During the makings of this document I was aided by my dear friend Dorothea Horn, my two sisters Yasmin and Sara as well as my father Nasser. They have helped and supported me during the writing process and I am more than thankful for all they have done for me.

Last, but most importantly, I want to thank my whole family and especially my parents Dorothee and Nasser. They have dedicated their lives to raising me and my two sisters and have always supported us in every imaginable way. Without their support this thesis would not have been possible.

In remembrance of my great grandfather Mir Zadegh Kouchakpour I dedicate this thesis to him. His support and belief in the importance of education paved the way for further success in following generations of our family.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Empfänglichkeit hämatopoetischer Zelllinien mesenchymaler CD34⁺ und CD14⁺ Stammzellen des Fettgewebes für eine Infektion mit dem humanen Immunschwächevirus Typ 1 und deren potentieller Nutzen in Prävention und Therapie der HIV-Infektion

im Applied Stem Cell Laboratory des Heart and Vascular Institute an der Tulane University (New Orleans, Louisiana, USA) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Kardiologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Unterstützung durch

Herrn Prof. em. Dr. Helmut U. Klein und Herrn Prof. Dr. Eckhard U. Alt

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 10.01.2014

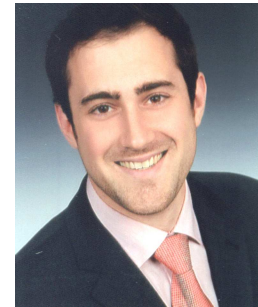


Unterschrift

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Mir Timo Zadegh Nazari-Shafti
 Geburtsdatum: 30.04.1985 (Lübeck)
 Kontakt: timo.nazari@gmail.com



Bildungsweg:

2005 - 2012 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
 1996 - 2005 Gymnasium (Leibniz-Gymnasium, Bad Schwartau, Deutschland)

Klinische Ausbildung:

März bis Juli 2012 Wahltertial Anästhesie am AMEOS Klinikum St. Salvador, Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin
 Dezember 2011 - März 2012 Innere Medizin Tertial am Inselspital Bern, Schweiz, Kardiologie mit Prof. Paul Mohacsi
 August-Dezember 2011 Chirurgie Tertial an der Tulane University, New Orleans, Herz-Thorax-Chirurgie mit Dr. John Pigott, MD
 Juli 2011 Famulatur am Isar Medizin Zentrum, München, Kardiologie
 Februar - März 2011 Famulatur am West Florida Hospital, Pensacola, Florida, USA, Kardiologie
 August - Oktober 2010 Famulatur am Heart and Vascular Institute der Tulane University, New Orleans, Louisiana, USA, kardiologische Intensivstation, Herztransplantationszentrum
 September - Oktober 2008 Praxis-Famulatur Pädiatrie, Praxis Dr. Constantin von der Lühe, Lübeck
 Juli - September 2008 Famulatur Innere Medizin am Diakonissenkrankenhaus Leipzig, Gastroenterologie und Hämatologie

Berufliche Erfahrung

- 2008 - 2009
und
2010 - 2011 Telemetrisches Monitoring von Patienten in der
kardiologischen Klinik des Universitätsklinikums
Magdeburg
- 2008 - 2009
und
2010 - 2011 Betreuung des Laborpraktikums Biochemie im 2.
Studienjahr im Institut für Neurobiochemie der
Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Wissenschaftliche Tätigkeit

- Februar 2009 - April 2010 Forschungsaufenthalt am Heart and Vascular
und
Juli bis Oktober 2010 Institute, Tulane University, New Orleans (USA) im
Applied Stem Cell Laboratory
- April 2013 – Dezember 2013 Research Fellow im Department of Molecular
Pathology an der University of Texas, MD
Anderson Cancer Center, Houston (USA)
- Ab Januar 2014 Postdoctoral Fellow im Regenerative Medicine
Department am Methodist Research Institute,
Cornell University, Houston (USA)

Magdeburg, den 10.01.2014



11 Publikationen

Nazari-Shafti TZ, Freisinger E, Roy U, Bulot CT, Senst C, Dupin CL, Chaffin AE, Mondal D, Alt EU and Izadpanah R. *Mesenchymal Stem Cell Derived Hematopoietic Cells are Permissive to HIV-1 Infection*. *Retrovirology* 2011, 8:3 (am 12. 01. 2011 veröffentlicht)

Senst C, **Nazari-Shafti TZ**, Krueger S, Bentrup KH , Dupin CL, Chaffin AE, Wörner PM, Abdel-Mageed AB, Alt EU, Izadpanah R. *Prospective dual role of mesenchymal stem cells in breast tumor microenvironment*. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Jan., 137(1):69-79 (am 10.11.2012 veröffentlicht)

Abstract:

Nazari-Shafti TZ., , Freisinger E, Chaffin A, Parsha K, Honer zu Bentrup K, Slakey D, Dupin C, Alt E.U und Izadpanah R. *Migratory Properties of Adult Mesenchymal Stem Cells in Response to Breast Cancer*. Posterpräsentation im Rahmen der Health Science Research Days. Tulane Health Science Center, New Orleans, Louisiana, USA. 3. März 2010.

Nazari-Shafti TZ., Freisinger E, Parsha K, Newsome E, Alt EU und Izadpanah R. *Migratory Properties of Adult Mesenchymal Stem Cells in Response to Breast Cancer*. Posterpräsentation im Rahmen der Women's Health Research Days 2009. Tulane Health Science Center, New Orleans, Louisiana, USA. 13. November 2009. Auszeichnung in der Kategorie "Basic Science".

Nazari-Shafti TZ, Noureldine SI, Friedlander P und Kandil E. *Thyroidectomy: A Treatment Option for Patients with Cardiac Manifestations of Graves' Disease*. Posterpräsentation im Rahmen der 8th International Conference on Head and Neck Cancer, Toronto, Canada. 21. Juli – 25. Juli 2012

In Vorbereitung:

Nazari-Shafti TZ, Krueger S, Freisinger E, Roy U, Bulot CT, Senst C, Mondal D, Alt EU und Izadpanah R. *Adult Mesenchymal Stem Cells as a host for dormant HIV-1 infection*.

Veröffentlichung ausstehend:

Nazari-Shafti TZ, Noureldine SI und Kandil E. *Thyroidectomy: An optimal treatment Option for Patients with Cardiac Manifestations of Graves' Disease*.

12 Anhang

12.1 Ergebnisse des PCR-Arrays

Gen	RQ (HD vs. ASCs)	95% Konfidenzintervall	p-Wert
Abbildung 11			
Liganden			
IFNG	0,3752	(0,31; 0,44)	< 0,01
IFNA1	0,3902	(0,27; 0,51)	< 0,01
IL2	3,4679	(2,17; 4,76)	< 0,01
IL10	2,536	(2,16; 2,91)	< 0,01
IL16	1,5439	(1,16; 1,93)	0,023589
CX3CL1	8,341	(7,69; 9,00)	< 0,01
CCL8	18,3516	(8,71; 28,00)	< 0,01
IL1B	79,1152	(38,81; 48,74)	< 0,01
IL8	235,212	(199,66; 270,76)	< 0,01
Rezeptoren			
SELL	4,1988	(2,11; 6,29)	0,023113
MBL2	7,4221	(6,15; 8,70)	< 0,01
TNFRSF1B	5,5329	(3,23; 7,83)	< 0,01
CD69	8,5342	(7,69; 9,00)	< 0,01
Enzyme			
SERPINA1	43,7742	(38,81; 48,74)	< 0,01
BCL11B	267,2971	(199,66; 270,76)	< 0,01
Abbildung 12 A und B			
Apoptose			
BAX	0,0763	(0,06; 0,09)	< 0,01
GADD45A	0,2304	(0,14; 0,32)	0,016359
Zellzyklus			
CDK7	0,0867	(0,06; 0,11)	< 0,01
CDKN1A	0,3208	(0,25; 0,39)	< 0,01
CCNT1	0,1057	(0,04; 0,17)	0,039227
Transkriptionsfaktoren			
FOS	0,096	(0,05; 0,14)	0,012292
EP300	0,099	(0,06; 0,13)	< 0,01
CBX5	0,1613	(0,10; 0,22)	< 0,01
BANF1	0,1473	(0,06; 0,24)	< 0,01
HMGA1	0,3385	(0,25; 0,43)	< 0,01
NFKBIA	2,7385	(1,91; 3,56)	< 0,01
CEBPB	0,3695	(0,28; 0,46)	< 0,01
NFATC1	0,4151	(0,29; 0,54)	0,015642

Tabelle 10 : Ergebnisse der PCR-Arrays Teil 1

Aufgeführt sind die Mittelwerte relativen Expressionsänderungen (RQ) mit dem 95%-Konfidenzintervall (KI) dem p-Wert entsprechend ihrer Anordnung in den Abbildungen 12 A und B sowie Abbildung 11. Die Abkürzungen der einzelnen Gene sind in Tabelle 12 hinterlegt.

Gen	HD vs. HD-HIV	95 % KI	p-value	HD-HIV vs HUT78-HIV	95 % KI	p-value
Abbildung 15 A						
Liganden						
CCL4	51,0652	(38,28; 63,85)	< 0,01	25,7836	(17,41; 34,16)	< 0,01
CCL5	31,3389	(24,20; 38,48)	< 0,01	1,8225	(1,62; 2,02)	< 0,01
CXCL12	146,8342	(120,56; 173,11)	< 0,01	14,8612	(10,19; 19,53)	< 0,01
IRF1	11,467	(7,74; 15,19)	< 0,01	0,2937	(0,23; 0,36)	< 0,01
IRF2	4,1392	(2,04; 6,24)	< 0,01	0,7066	(0,34; 1,07)	0.25694
CEBPB	6,9425	(5,19; 8,70)	< 0,01	0,7155	(0,49; 0,94)	0.078864
Rezeptoren						
CCR3	21,1226	(14,11; 28,13)	< 0,01	0,3376	(0,22; 0,45)	< 0,01
CCR5	27,7802	(20,01; 35,54)	< 0,01	3,9577	(0,00001; 10,05)	0.21805
CD4	0,5503	(0,42; 0,68)	0.109071	0,0287	(0,02; 0,03)	< 0,01
TNFSF10	22,414	(17,40; 27,42)	< 0,01	20,3471	(16,21; 24,48)	< 0,01
CXCR4	51,3017	(38,70; 63,90)	< 0,01	2,6159	(2,04; 3,19)	< 0,01
HCK	9,1652	(6,73; 11,60)	< 0,01	0,5023	(0,36; 0,65)	< 0,01
CD247	41,691	(20,32; 66,34)	0.024603	0,3202	(0,00001; 0,66)	0.253101
CD209	21,6632	(9,01; 34,31)	< 0,01	2,7267	(0,93; 4,52)	0.030543
Abbildung 15 B						
Apoptose						
BAX	321,827	(244,47; 399,18)	< 0,01	19,5435	(12,72; 26,36)	< 0,01
BCL2	21,4985	(15,07; 27,92)	< 0,01	2,2389	(1,21; 3,27)	0.060591
CASP3	32,4753	(26,34; 38,61)	< 0,01	50,2803	(35,86; 64,70)	< 0,01
GADD45A	41,2387	(29,50; 52,97)	< 0,01	1,0833	(0,67; 1,49)	0.631198
Zellzyklus						
XPO1	20,2453	(13,20; 27,29)	< 0,01	0,6708	(0,56; 0,78)	< 0,01
CDK7	10,6112	(7,45; 13,77)	< 0,01	10,2225	(5,81; 14,63)	< 0,01
CDK9	42,2541	(17,60; 66,91)	< 0,01	2,5882	(1,04; 4,14)	0.015855
CDKN1A	26,0588	(15,63; 36,49)	< 0,01	3,8354	(3,08; 4,59)	< 0,01
NFKBIA	0,6701	(0,59; 0,75)	0.01972	0,8525	(0,75; 0,96)	0.055697
STAT1	14,0029	(11,72; 16,28)	< 0,01	3,2625	(2,40; 4,12)	< 0,01
STAT3	8,8619	(4,55; 13,17)	0.011393	6,2806	(4,53; 8,03)	< 0,01
HTATSF1	119,0931	(81,62; 156,57)	< 0,01	12,451	(7,66; 17,24)	< 0,01
CBX5	7,6745	(6,17; 9,18)	< 0,01	2,8396	(1,75; 3,93)	0.019772
Abbildung 18						
Angeborene Immunantwort auf Retroviren						
APOBEC3F	686,4673	(429,54; 943,39)	< 0,01	44,8097	(27,48; 62,14)	< 0,01
TRIM5	4,2452	(3,14; 5,35)	< 0,01	0,8478	(0,74; 0,95)	0.064375
PPIA	4,3855	(3,55; 5,22)	< 0,01	0,8039	(0,68; 0,93)	0.063211

Tabelle 11 : Ergebnisse der PCR-Arrays Teil 2

Aufgeführt sind die Mittelwerte relativen Expressionsänderungen (RQ) mit dem 95%-Konfidenzintervall (KI) dem p-Wert entsprechend ihrer Anordnung in den Abbildungen 15 A und B sowie Abbildung 18. Die Abkürzungen der einzelnen Gene sind in Tabelle 12 hinterlegt.

12.2 Liste der Gene des PCR-Arrays

Gen Bank Nr.	Gen Abkürzung	Gen Bezeichnung
NM_080649	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1
NM_021822	APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
NM_004322	BAD	BCL2-associated agonist of cell death
NM_003860	BANF1	Barrier to autointegration factor 1
NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein
NM_022898	BCL11B	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)
NM_000633	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
NM_033637	BTRC	Beta-transducin repeat containing
NM_004346	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
NM_001228	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
NM_012117	CBX5	Chromobox homolog 5
NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
NM_002983	CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
NM_002984	CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
NM_002985	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
NM_005623	CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8
NM_001240	CCNT1	Cyclin T1
NM_001123396	CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2
NM_001837	CCR3	Chemokine (C-C motif) receptor 3
NM_005508	CCR4	Chemokine (C-C motif) receptor 4
NM_000579	CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5
NM_021155	CD209	CD209 molecule
NM_000734	CD247	CD247 molecule
NM_000616	CD4	CD4 molecule
NM_000610	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
NM_001781	CD68	CD68 molecule
NM_004355	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
NM_001799	CDK7	Cyclin-dependent kinase 7
NM_001261	CDK9	Cyclin-dependent kinase 9
NM_000389	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
NM_005194	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
NM_006833	COPS6	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 6 (Arabidopsis)
NM_001877	CR2	Complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2
NM_004380	CREBBP	CREB binding protein
NM_002996	CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
NM_000609	CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
NM_003467	CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
NM_001972	ELANE	Elastase, neutrophil expressed
NM_001429	EP300	E1A binding protein p300
NM_002000	FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for
NM_005252	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
NM_001924	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
NM_002110	HCK	Hemopoietic cell kinase
NM_002131	HMGA1	High mobility group AT-hook 1
NM_014500	HTATSF1	HIV-1 Tat specific factor 1
NM_024013	IFNA1	Interferon, alpha 1
NM_002176	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast
NM_000619	IFNG	Interferon, gamma
NM_000572	IL10	Interleukin 10
NM_002187	IL12B	Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
NM_004513	IL16	Interleukin 16
NM_000576	IL1B	Interleukin 1, beta
NM_000586	IL2	Interleukin 2
NM_000584	IL8	Interleukin 8
NM_002198	IRF1	Interferon regulatory factor 1
NM_002199	IRF2	Interferon regulatory factor 2
NM_002262	KLRD1	Killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1
NM_002342	LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)

NM_005923	MAP3K5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5
NM_000242	MBL2	Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble
NM_172390	NFATC1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
NM_020529	NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
NM_002574	PRDX1	Peroxiredoxin 1
NM_004103	PTK2B	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta
NM_005611	RBL2	Retinoblastoma-like 2 (p130)
NM_000655	SELL	Selectin L
NM_000295	SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1
NM_000488	SERPINC1	Serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1
NM_003064	SLPI	Secretory leukocyte peptidase inhibitor
NM_003073	SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1
NM_007315	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
NM_003150	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
NM_005653	TFCP2	Transcription factor CP2
NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor
NM_001066	TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
NM_003810	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
NM_033093	TRIM5	Tripartite motif containing 5
NM_006292	TSG101	Tumor susceptibility gene 101
NM_013245	VPS4A	Vacuolar protein sorting 4 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
NM_002995	XCL1	Chemokine (C motif) ligand 1
NM_003400	XPO1	Exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)
NM_003403	YY1	YY1 transcription factor
HOUSKEEPING GENES		
NM_001101	ACTB	Actin, beta
NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0

Tabelle 12 : Im PCR-Array getestete Gene

12.3 Patientenaufklärungsbogen (Englisch)

Tulane University

Human Research Protection Office Biomedical IRB Consent Form for Participation in a Research Study

Title: Comparative Analysis of Stem Cells Derived from Various Age Groups

Version Date: _02/10/2012 Approval Date: _____ Sign By Date: _____ Page 1 of 4 Subject Initials: _____

Principal Investigator: Dr. Reza Izadpanah
Co-Investigators: Abigail Chaffin M.D., Jennifer McGee M.D.
Study Title: Comparative Analysis of Stem Cells Derived from Various Age Groups
Performance Sites: Tulane University Health Science Center
Sponsor: Tulane Applied Stem Cell Laboratory, Heart & Vascular Institute, Tulane University. Department of Surgery, Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Tulane University.

Introduction

You are invited to participate in a research study to comparatively analyze the Stem Cells derived from various age groups.

This consent form will give you the information you will need to understand why this study is being done and why you are being invited to participate. It will also describe what you will need to do to participate and any known risks, inconveniences or discomforts that you may have while participating. We encourage you to take some time to think this over and to discuss it with your family, friends and doctor. We also encourage you to ask questions now and at any time. If you decide to participate, you will be asked to sign this form and it will be a record of your agreement to participate. You will be given a copy of this form.

The total number of subjects to be enrolled for this study is 160 participants, and participants will not be contacted in the future.

Disclosure of Potential Conflict of Interest

The investigator(s) in this study are also healthcare providers. They are interested in the knowledge to be gained from this study and in your well-being. Investigators may obtain salary or other financial support for conducting the research. You are under no obligation to participate in any research study offered to you.

Why is this study being done?

This study is designed to learn more about the role of and effect of normal adult stem cells that are found in skin and soft tissue as they age. 160 subjects will be enrolled from 20 to >80 years of age. Participation will entail the anonymous donation of tissue that would otherwise be removed and discarded at the time of treatment. Patient information will be strictly anonymous.

What are the study procedures? What will I be asked to do?

If you agree to take part in this study will receive no intervention or treatment that is outside of the treatment advised by their surgeon. Tissue samples that would otherwise be discarded at the time of treatment/debridement will be collected at the time of surgery and subsequently used to study differences in stem cells and other features between age groups. In the future, the stem cells derived from your tissue might undergo genetic modifications in the form of gene addition or gene deletion and then be introduced into animal models of human disease to evaluate their potential therapeutic

Tulane University**Human Research Protection Office Biomedical IRB Consent Form for Participation in a
Research Study**

Title: Comparative Analysis of Stem Cells Derived from Various Age Groups

Version Date: _02/10/2012 Approval Date: _____ Sign By Date: _____ Page 2 of 4 Subject Initials: _____

The processing of the tissue to isolate cells, and all further experiments on the cells shall be conducted at Tulane University Health Science Center. Your active participation in this study shall be limited to the procedure you are planned to undergo. After the procedure, the study does not require you to be contacted in any form.

What are the risks or inconveniences of the study?

As patients would be undergoing these surgical procedures with or without the existence of our study, no major risk is introduced into the equation. The risk of breach of confidentiality always exists, though any patient data collected in this study, such as age, race, gender, or medical conditions, will be kept strictly anonymous. No research investigator will have access to sensitive patient information such as name, financial, or insurance data. The subject will be given any new information gained during the course of the study which might affect her/his willingness to participate.

Risks to Unborn or Nursing Child

As any treatment procedure during which tissue collected for this study would have occurred with the discarding of tissue of interest, no further risk is introduced by this study to unborn or nursing children.

What are the benefits of the study?

There are no immediate potential benefits from participation in this study. Information gained from this study will help the investigators to better understand the role of adult stem cells in various age populations in order to develop better therapies that may help patients with similar problems avoid surgery or other medical procedures in the future.

Alternative Treatment: The alternative is to not participate in the study, in which case excess tissue of interest removed at the time of surgery will be discarded instead of used for research.

Will I receive payment for participation?

You will not be paid to be in this study.

Are there costs to participate?

There are no costs to you to participate in this study.

How will my personal information be protected?

Patient data will be anonymous. No research results will be placed in the medical record of the patient. Research results will be kept confidential to the extent allowed by law. In no way will subjects be identified should if study results are published.

Tulane University**Human Research Protection Office Biomedical IRB Consent Form for Participation
in a Research Study**

Title: Comparative Analysis of Stem Cells Derived from Various Age Groups

Version Date: _02/10/2012 Approval Date: _____ Sign By Date: _____ Page 3 of 4 Subject Initials: _____

The study data will not include any individual's information and does not stand the risk of being disclosed.

The following procedures will be used to protect the confidentiality of your data. The researchers will keep all study records (including any codes to your data) locked in a secure location. Research records will be labeled with a unique database number.

You should also know that the Tulane University Human Research Protection Office and the Biomedical Institutional Review Board (IRB) may inspect study records as part of its auditing program, but these reviews will only focus on the researchers and not on your responses or involvement. The IRB is a group of people who review research studies to protect the rights and welfare of research participants.

If you have any questions about your rights as a research subject, please call the Tulane University Human Research Protection Office at (504) 988-2665 or email irbmain@tulane.edu.

Can I stop being in the study and what are my rights?

You do not have to be in this study if you do not want to. If you agree to be in the study, but later change your mind, you may drop out at any time. There are no penalties or consequences of any kind if you decide that you do not want to participate.

Who do I contact if I have questions about the study?

Take as much time as you like before you make a decision to participate in this study. We will be happy to answer any question you have about this study. If you have further questions about this study, want to voice concerns or complaints about the research or if you have a research-related problem, you may contact the principal investigator, (Dr. Reza Izadpanah, 504-988-3040) or the physician in-charge (Dr. Abigail Chaffin, 504-988-5500). If you would like to discuss your rights as a research participant, discuss problems, concerns, and questions; obtain information; or offer input with an informed individual who is unaffiliated with the specific research, you may contact the Tulane University Human Research Protection Office at 504-988-2665 or email at irbmain@tulane.edu.

Tulane University

**Human Research Protection Office Biomedical IRB Consent Form for Participation
in a Research Study**

Title: Comparative Analysis of Stem Cells Derived from Various Age Groups

Version Date: _02/10/2012 Approval Date: _____ Sign By Date: _____ Page 4 of 4 Subject Initials: _____

Documentation of Consent:

I have read this form and decided that I will participate in the research project described above. Its general purposes, the particulars of involvement and possible risks and inconveniences have been explained to my satisfaction. I understand that I can withdraw at any time. My signature also indicates that I have received a copy of this consent form.

Subject

Date

Parent/Legally Authorized Representative (if applicable)

Date

Person Obtaining Consent

Date

I am unable to read but this consent document has been read and explained to me by

_____ (name of reader). I volunteer to participate in this research.

Subject

Date

Witness

Date

Person Obtaining Consent

Date

[Optional]

Principle Investigator

Date

12.4 Publikation

Timo Z. Nazari-Shafti, Eva Freisinger, Upal Roy, Christine T. Bulot, Christiane Senst, Charles L. Dupin, Abigail E. Chaffin, Sudesh K. Srivastava, Debasis Mondal, Eckahrd U. Alt, Reza Izadpanah:

Mesenchymal stem cell derived hematopoietic cells are permissive to HIV-1 infection

Publiziert in Retrovirology 2011, 8:3; <http://www.retrovirology.com/content/8/1/3>



RESEARCH

Open Access

Mesenchymal stem cell derived hematopoietic cells are permissive to HIV-1 infection

Timo Z Nazari-Shafti¹, Eva Freisinger¹, Upal Roy², Christine T Bulot², Christiane Senst¹, Charles L Dupin⁵, Abigail E Chaffin³, Sudesh K Srivastava⁴, Debasis Mondal², Eckhard U Alt^{1*†}, Reza Izadpanah^{1,3**}

Abstract

Background: Tissue resident mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent, self-renewing cells known for their differentiation potential into cells of mesenchymal lineage. The ability of single cell clones isolated from adipose tissue resident MSCs (ASCs) to differentiate into cells of hematopoietic lineage has been previously demonstrated. In the present study, we investigated if the hematopoietic differentiated (HD) cells derived from ASCs could productively be infected with HIV-1.

Results: HD cells were generated by differentiating clonally expanded cultures of adherent subsets of ASCs (CD90⁺, CD105⁺, CD45⁻, and CD34⁻). Transcriptome analysis revealed that HD cells acquire a number of elements that increase their susceptibility for HIV-1 infection, including HIV-1 receptor/co-receptor and other key cellular cofactors. HIV-1 infected HD cells (HD-HIV) showed elevated p24 protein and *gag* and *tat* gene expression, implying a high and productive infection. HD-HIV cells showed decreased *CD4*, but significant increase in the expression of *CCR5*, *CXCR4*, *Nef*-associated factor *HCK*, and *Vpu*-associated factor *BTRC*. HIV-1 restricting factors like APOBEC3F and TRIM5 also showed up regulation. HIV-1 infection increased apoptosis and cell cycle regulatory genes in HD cells. Although undifferentiated ASCs failed to show productive infection, HIV-1 exposure increased the expression of several hematopoietic lineage associated genes such as *c-Kit*, *MMD2*, and *IL-10*.

Conclusions: Considering the presence of profuse amounts of ASCs in different tissues, these findings suggest the possible role that could be played by HD cells derived from ASCs in HIV-1 infection. The undifferentiated ASCs were non-permissive to HIV-1 infection; however, HIV-1 exposure increased the expression of some hematopoietic lineage related genes. The findings relate the importance of ASCs in HIV-1 research and facilitate the understanding of the disease process and management strategies.

Background

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (AIDS), predominantly infects hematopoietic cells such as T-helper lymphocytes, monocytes and macrophages. Despite the development of highly active anti-retroviral therapy (HAART), the persistence of reservoirs of HIV-1 poses obstacles to the eradication of the disease. Although initial viral decay kinetics in plasma had indicated optimistic outcomes of HAART [1], long-term

measurements have suggested that mononuclear lymphocytes harbor the virus for prolonged periods of time [2].

Infection of lymphoid and myeloid lineages is mediated by recognition of the T-cell receptor CD4 or by the chemokine co-receptors CXCR4 and CCR5. CXCR4 appears to be the most important for HIV-1 entry into T-lymphocytes (T-tropic), whereas CCR5 is known for viral entry into cells such as monocytes and macrophages (M-tropic) [3]. These receptors promote viral attachment and fusion to cellular membranes, thus facilitating entry into hematopoietic cells [4]. Although the peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells (HPCs) can express the HIV-1 co-receptors [5], susceptibility to either T-tropic or M-tropic strains of HIV-1 seem to correlate only with lineage commitment

* Correspondence: ealtmd@aol.com; rizadpan@tulane.edu

† Contributed equally

¹Applied Stem Cell Laboratory, Heart and Vascular Institute, Department of Medicine, Tulane University Health Science Center, New Orleans, Louisiana, USA

Full list of author information is available at the end of the article

of HPCs [6]. Even though an early loss of circulating CD34⁺ HPCs and impaired clonogenic potential and apoptosis of these progenitor cells have been documented in HIV-1 infected individuals [7,8], the evidence of productive infection of HPCs remains controversial [9,10].

The mesenchymal stem cells (MSCs) are endowed with multi lineage differentiation potentials and self-renewal properties, which qualify them as potential sources for cell transplantation and gene therapy. MSCs from several origins, including bone marrow and adipose tissue, have been well described. Adipose tissue derived MSCs (ASCs), like bone marrow derived MSCs, have the capacity to differentiate along multiple lineages at clonal levels. They can differentiate into neurons, cardiomyocytes, chondrocytes, osteocytes, and adipocytes [11-16]. However, it is not known whether lineage specific differentiation of MSCs would enable them to be infected by HIV-1 and whether they may act as long-term viral reservoirs within systemic sites.

The HIV-1 infection of bone marrow mesenchymal progenitors and of mesenchyme-derived cells (e.g., fibroblasts and endothelial cells) present in various peripheral organs has been shown to occur via both M-tropic and T-tropic strains of HIV-1 [17-19]; however, integrated provirus is rarely found in these cells and a productive infection has not been documented. However, *in vitro* infection of stromal cells grown in long-term bone marrow cultures (LTBMC) with HIV-1 has been reported [20-22]. Our previous studies had shown that a T-tropic strain of HIV-1 can infect bone marrow MSC cultures and decrease their colony forming ability and adipogenic potential [23]. Further, it has also been shown that multipotent human progenitor cells isolated from fetal brains are permissive towards HIV-1 infection [24]. However, it has not been well established as to how these mesenchyme derived cells become susceptible to HIV-1 and whether their HIV-1 production rates are comparable to that observed in HIV-1 infected lymphoid or myeloid cells. Importantly, despite the possible presence of ASCs in systemic organs, there is no evidence about the ability of HIV-1 to infect either undifferentiated ASCs or their differentiated counterparts.

Recent work from our laboratory has demonstrated that under specific *in vitro* stimulations even the CD34⁻ ASC clones (CD90⁺, CD105⁺, CD45⁻ and CD34⁻) could undergo hematopoietic differentiation (HD) and display macrophage-like characteristics [25]. Macrophages are known to play a crucial role in both HIV-1 infectivity and pathogenesis. Although they can generate high levels of viral progeny, they are resistant to HIV-1 induced cytopathic effects and harbor the virus for a long time [26-28]. Hence, our efforts were focused on studying the susceptibility of the ASCs and the

HD-differentiated ASCs for HIV-1 infection and their subsequent abilities to support viral replication. Initially, the differentiated cells were analyzed for receptors, ligand binding, and cofactors, which are directly involved in HIV-1 infection, followed by analysis of changes in gene expression that occurs following HIV-1 infection. Both HIV-1 susceptibility markers and productive replication in HIV-1 exposed HD cells were compared with those observed in a HIV-1 infected T-cell line, and the findings are reported in the present study.

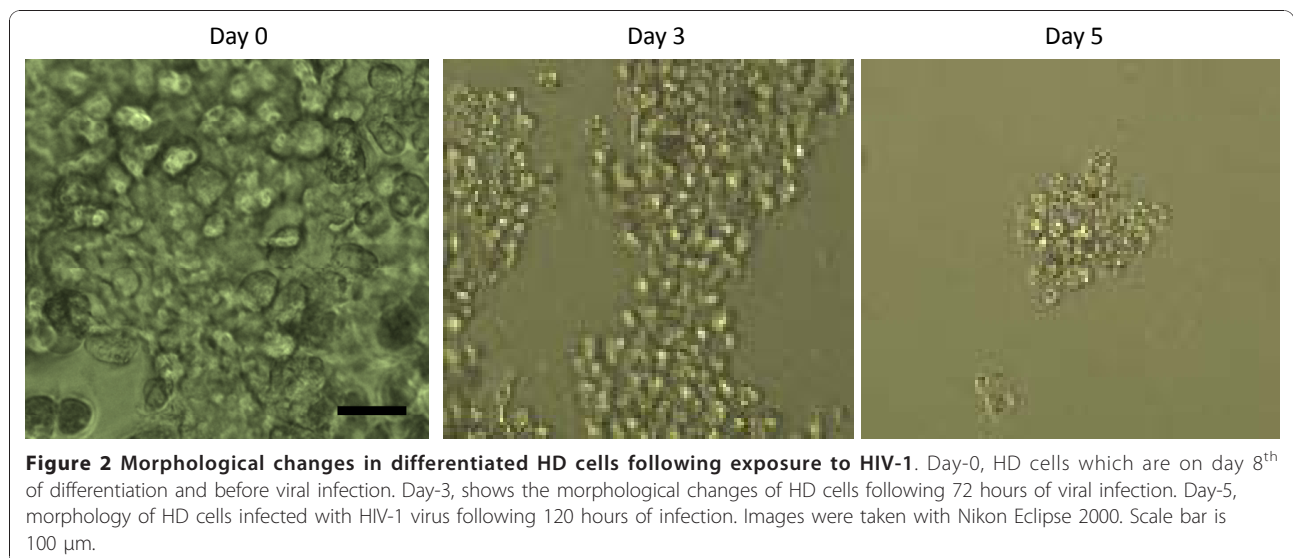
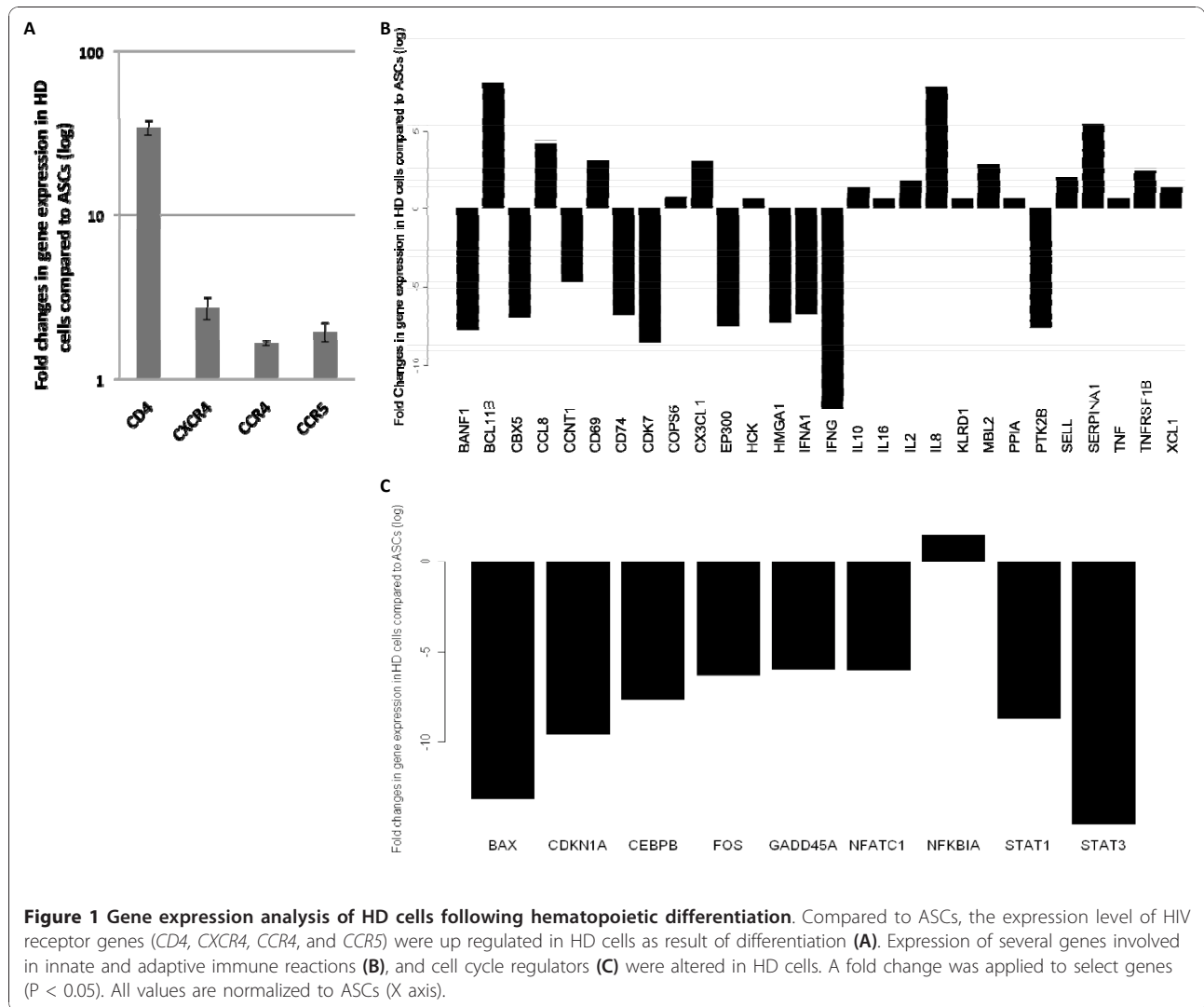
Results

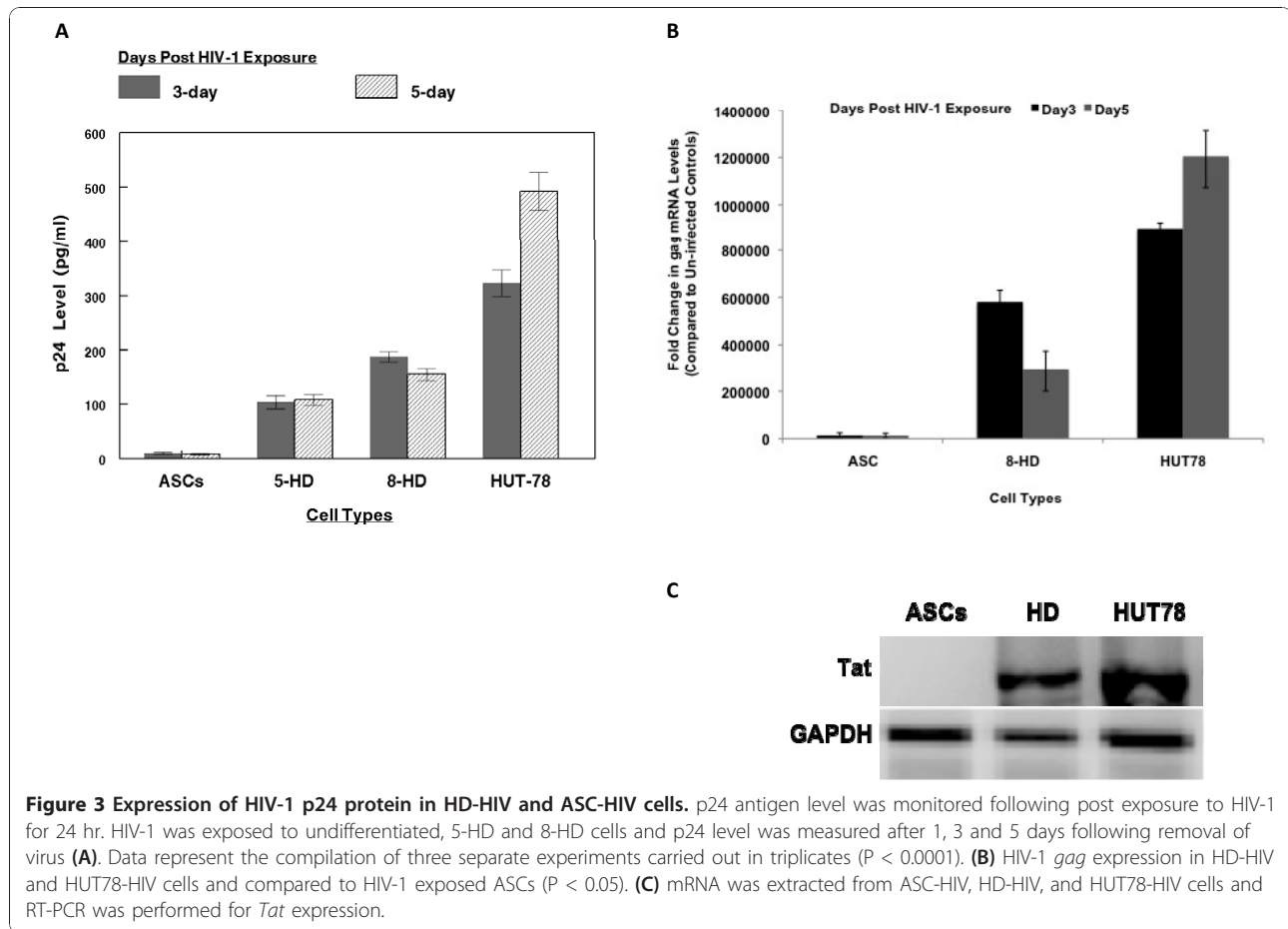
Up-regulation of HIV-1 susceptibility genes in HD cells

HD cells were prepared by differentiating expanded cultures of ASC clones, phenotypically identified as CD90⁺, CD105⁺, CD44⁺, CD4⁻, CD68⁻, CD34⁻, CD45⁻, and CD11b⁻ cells as described previously [25]. For the initial assessment of HD cells, we performed a transcriptomic analysis after 8 days of differentiation. The HD cells expressed a number of HIV-1 receptors such *CD4* (33.9 ± 3.4 fold), *CXCR4* (2.7 ± 0.42 fold), *CCR4* (1.64 ± 0.05 fold), and *CCR5* (1.93 ± 0.26 fold) compared to undifferentiated ASCs (Figure 1A). HD cells also expressed a series of genes involved in innate and adaptive immune reactions and key cellular cofactors for HIV-1 infection such as *IL-8*, *SERPINA1*, *CCL8*, *CD69* and interleukins 2, 10, and 16 (Figure 1B). The expression of lymphoid associated gene *BCL11B* was markedly up regulated. Further, the expression of a number of cell cycle regulators, such as *BAX*, *CDKN1A*, *FOS*, *GADD45A*, *NFATC1*, *CEBPB*, *STAT1*, and *STAT3*, decreased while the expression of *NFκB1A* slightly increased as a result of differentiation (Figure 1C).

A highly productive HIV-1 infection is evident in virus exposed HD cells

Since cells of the hematopoietic system are among the main targets of the HIV-1 virus, we investigated the effect of viral exposure on HD cells. Clonally expanded cells were allowed to differentiate into HD cells for 5 (5-HD) or 8 (8-HD) days in differentiation media. For analyzing the infectivity of HD cells, we exposed them to very low levels of HIV-1 virus (10³-10⁴ TU/10⁵ cells or 0.1 MOI) for 24 hours. Unbound viral particles were removed and cultures maintained for an additional 5 days. Following infection of HD cells, noticeable morphological changes beginning from day 3 post-infection were observed. These morphological changes heralded a loss of significant numbers of cells by day 5 post-infection, indicating the dominance of viral infection on HD cells (Figure 2). Subsequently using ELISA for HIV-1 p24, we assayed the levels of HIV-1 p24 released in the supernatant of HD-HIV, and HIV-1 exposed undifferentiated ASCs (ASCs-HIV) cultures which served as





controls. The concentration of p24 in culture supernatant is depicted in Figure 3A.

Both 5-HD and 8-HD cultures showed consecutively increasing levels of p24 on days 3 to 5. On day 5 of infection, p24 levels in 5-HD and 8-HD cultures remained unchanged; the p24 levels in ASCs-HIV were negligible, indicating no evidence of viral replication.

To quantify HIV-1 cDNA and proviral DNA, the mRNA level of "*gag*" and "*Tat*" were assayed. Figure 3B shows the increased expression of *gag* in HD-HIV cells 3 days post infection. This level decreased significantly by day 5 after infection. The *gag* expression in HD-HIV cells was comparable to the HIV-1 infected "HUT-78" (HUT78-HIV), a T-lymphoblastoid cell line that served as a positive control in these experiments. The RT-PCR experiments showed enhanced expression of *Tat* in HD-HIV and HUT78-HIV cells (Figure 3C). The expression of *gag* and *Tat* were not detected in ASCs-HIV.

HIV-1 infection significantly alters the gene expression profile in HD cells

The expression of selected genes mainly involved in HIV-1 infection and immune response was analyzed as

described in the methods. The results obtained for each group, normalized to the mean value of the house keeping gene, were compared by scatter plot analysis using PCR-array data analysis software (SABiosciences). To study the effect of viral exposure on HD cells, we compared the expression of selected genes in HD-HIV cells versus un-infected HD cells. The gene profile of HD-HIV cells was then compared to HUT78-HIV cells. The analysis showed that HIV-1 infection altered gene expression within HD cells in a similar fashion to that seen in HUT78-HIV cells. Several genes were perturbed in response to viral exposure, and these included genes coding for HIV-1 receptors and ligands (*CCL4*, *CCL5*, *CCR5*, *CXCL12*, *CXCR4*, *CXCL12*). The viral exposure showed its maximum effect on the HD-HIV cells, when compared to HUT78-HIV cells (Figure 4A).

HIV-1 infection also profoundly altered expression of the cell cycle and apoptosis regulatory genes including *BAX*, *BCL2*, *CDKN1A*, *GADD45A*, *CDK9*, *IRF1*, *CEBPB*, and *IRF2*. The changes in the expression levels of these genes were more pronounced in HD-HIV cells when compared to HUT78-HIV. However, there were smaller

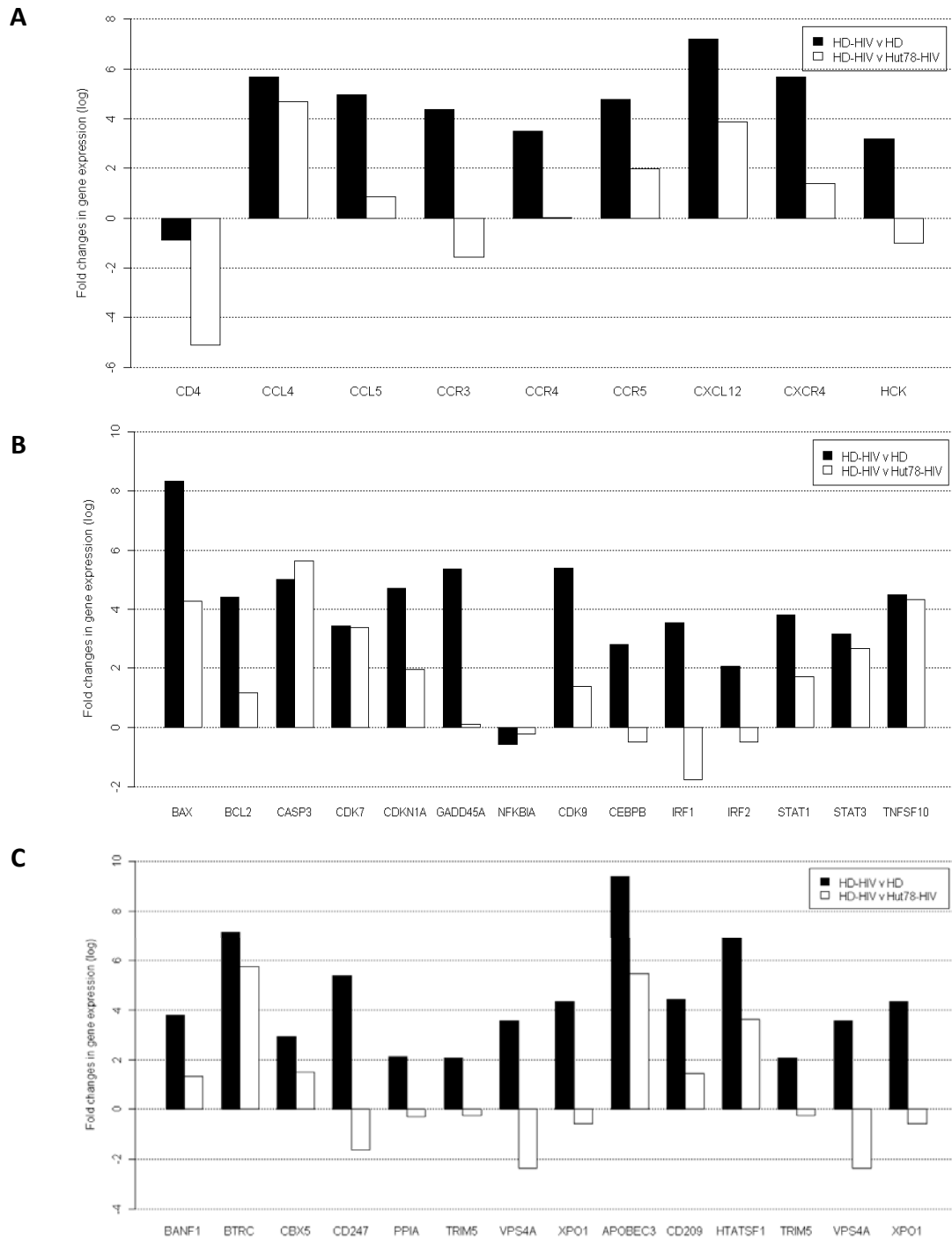


Figure 4 Comparison of the gene expression profiles of HIV-1 infected HD and HUT78 cells. Genes that were found to be differentially expressed in HD-HIV vs. HD cells in one set and HD-HIV vs. HUT78-HIV cells in another set were then grouped according to functional categories including genes encoding for HIV-1 receptors and ligands (A), cell cycle and apoptosis (B), and cellular factors involved in HIV-1 infection (C). A fold change was applied to select genes ($P < 0.05$). All values are normalized to either ASCs or HD cells (X axis).

differences in the expression levels of *Caspase 3*, *NFκBIA*, *TNSF10*, *STAT1*, and *STAT3* (Figure 4B).

HIV-1 infection caused significant changes in the expression of cellular factors involved in HIV-1 infection such as *BANF1*, *CD247*, *TRIM5*, *VPS4A*, *XPO1*, *CD209* and to a lesser extent, changed the expression levels of a β-transducin repeat containing (*BTRC*), *CBX5*, and *HTATSFI*. HD cells showed enhanced expression of genes coding for factors known to restrict HIV-1 replication such as *CD209*, *APOBEC3F*, Tat specific factor 1 (*TAT-SF1*), and tripartite motif-containing 5 (*TRIM5*) (Figure 4C).

Immunocytochemistry was employed to analyze the expression of CCR4, CCR5, NOS2 and CXCR4 proteins in HD-HIV cells. As shown in Figure 5, these markers could be readily detected in approximately all cells. However, the expression of CD4 was in undetectable levels by immunohistochemistry

Productive infection is not seen in undifferentiated ASCs

Undifferentiated ASCs exposed to HIV-1 resulted in no significant productive infection up to 5 days. In addition, viral exposure did not cause noticeable effects on the viability of ASCs. Exposure to low MOI (0.1) of the virus did not show any significant effect on the expression of *CD4*, *CD14*, *CD68*, *MSR1*, *TNFα* and *MRC1* in ASCs. However, exposure to HIV-1 resulted in a provisional up-regulation of *c-Kit* (6.4 ± 1.4 fold, $p \leq 0.05$), *IL10* (188.9 ± 1.6 fold, $p \leq 0.01$) and *MMD2* (65 ± 1.1 fold, $p \leq 0.01$) by day 3 post-exposure. By day 5, the expression of these genes decreased, however, the levels were still higher than in the un-exposed control ASCs (*IL10* = 67.5 ± 1.5 , $p \leq 0.01$; *MMD2* = 24.3 ± 1.3 , $p \leq 0.01$; and *c-Kit* = 4.1 ± 1.9 , $p \geq 0.05$). The decline in the expression of *MMD2* on day 5 as compared to day 3 was significant ($p \leq 0.01$) (Figure 6). Our observations indicate that the HIV-1 exposed ASCs showed significantly lower adipogenic, osteogenic potential. However, HIV exposure seems to expedite the generation of HD cells to less than 5 days (from the normal 8 days), when placed in hematopoietic differentiation media. The generated HD cells from HIV-1 exposed ASCs did not exhibit any evidence of productive infection.

The possible integration of HIV-1 in an exposed ASC genome was examined by repetitive-sampling *Alu-gag* PCR technique described earlier [29]. Briefly, on a nested based PCR technique, the regions of varying length between genomic *Alu* repeats and the HIV *gag* were amplified from the DNA of exposed ASCs to 0.1 MOI of HIV-1 for 24 h. Following this, the second PCR was performed on specific regions of the HIV-1 genome. No evidence of HIV-1 integration was observed in exposed ASCs.

Discussion

In postnatal and adult life, macrophages differentiate from progenitor cells through various pathways. Macrophages are known to be one of the most important targets for HIV-1 infection and play a crucial role in both viral latency and recrudescence. The CD34⁺ hematopoietic progenitor cells are commonly known to generate macrophages. Furthermore, the ability of embryonic stem cells to generate HIV-1 susceptible macrophages has been reported [30]. For the first time we showed that a clonally expanded CD90⁺, CD105⁺, CD44⁺, CD4⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD11b⁻, CD68⁻ subset of ASCs could also generate cells with macrophage attributes [25]. In the present study, we show that the generated HD cells support productive HIV-1 infection. We show the expression of several HIV-1 susceptibility genes as well as several immune response genes in HD cells. A number of such newly expressed genes may possibly be involved in increasing the susceptibility of HD cells to HIV-1 infection.

Previously we showed that early in differentiation, HD cells develop CD4, a T-lymphocyte marker [25]. Since we utilized the HTLV-III_B strain which is a T-tropic virus, the infectivity in HD cells as compared to the newly infected HUT78 cells can be explained by utilizing CD4 as one of the most important HIV-1 receptors. Furthermore, as a result of differentiation, expression of other common cellular ligands essential for HIV-1 infection, such as *CXCR4*, *CCR4*, and *CCR5*, distinctly increased. In addition, the expression of markers associated with activated immune cells, such as the serine protease inhibitor *SERPIN-A1*; the cell surface markers such as *CCL8*, *CD69*; as well as the expression of interleukins such as *IL-2*, *IL-8*, *IL-10*, and *IL-16*, were markedly increased in the HD cells. These observations clearly indicated that these mesenchymal origin cells acquired the attributes of hematopoietic cells.

Our current findings clearly demonstrate a profound increase in the susceptibility of HD cells to HIV-1 infection. Interestingly, higher levels of p24 expression were observed in 8-HD compared to 5-HD cells. This is suggestive that 8-HD cells develop even more cellular receptors for viral entry and are prone for replication. The negligible amount of p24 in ASCs-HIV might be associated with a residual amount of virus floating in the media. Compared to HUT78 cells, the HD cells supported a highly productive HIV-1 infection as evident from the significantly higher levels of *gag* and *Tat* expression in both cell types post HIV-1 exposure. The *gag* expression level decreased in HD-HIV on day-5 post infection which was due to considerable cytotoxicity associated with the HIV infection (Figure 3B).

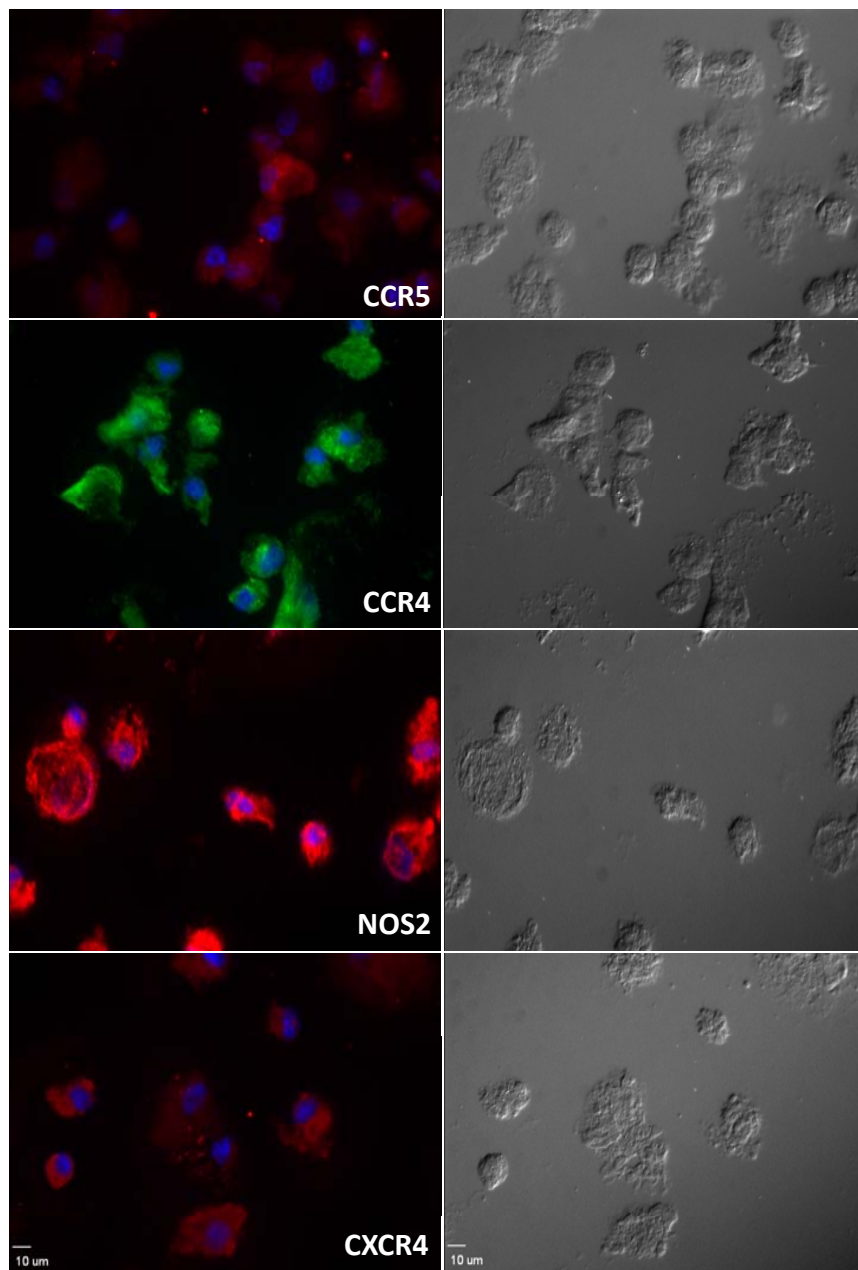
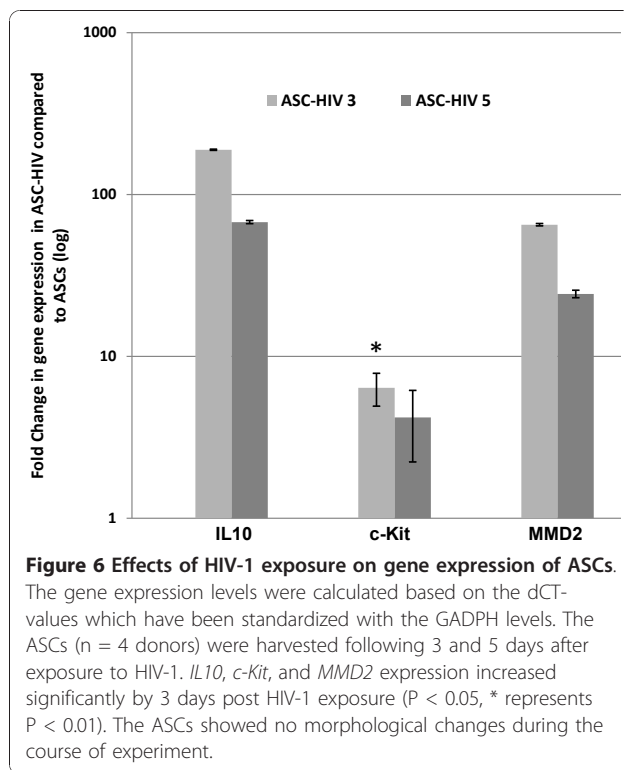


Figure 5 Expression of hematopoietic markers in HD cells following HIV infection. Immunohistochemistry of HD-HIV cells, fluorescent images indicate the expression of CCR5, CCR4, NOS2, and CXCR4. Right panel shows the DIC images of identical fields. Images were obtained with Leica TCS SP-2 confocal microscope. Scale bar 10 μ m.

In order to demonstrate the infectivity of HD cells, we exposed them to very low levels of the virus (0.1 MOI). Indeed, similar to the high level of infectivity observed in the HUT78 cells, the HD cells showed increasing levels of p24 in the supernatants on both day-3 and day-5 post infection, suggesting a possible and crucial role *in vivo* in providing infectable cells.

Interestingly, HIV-1 exposed cells showed a significant decrease in expression of *CD4*. Significant increases in

the expression of HIV-1 co-receptors, both CCR5, and CXCR4 were observed in the HD-HIV cells in both gene and protein levels. Although we have not carried out studies using an M-tropic virus, our findings point towards virus infection that enables HD cells to be susceptible to both of R5 and X4 viruses. Previous reports determined that the HIV-1 Tat protein alters co-receptor expression in lymphoid and myeloid cells [31,32]. Studies from our laboratory on the HPC cell line, K562



had also indicated that Tat can differentially regulate both CXCR4 and CCR5 expression in erythroid or megakaryocytic cells [33]. Although we have not measured Tat expression in the HD-HIV cells, the level of productive infection clearly suggests high levels of Tat protein which may be directly involved in changes in HIV-1 receptor expression observed in these cells.

As compared to the newly infected HUT78-HIV cells, the HD-HIV cells showed significantly higher level of expression of several chemokines such as *CXCL12*, *CCL4* and *CCL5*. *CCL4* (MIP-1 β) is a major HIV-suppressive factor produced by CD8⁺ T cells [34]. It has also been documented that MIP-1 α and RANTES, as ligands for CCR5, may suppress HIV-1 infection as well [35]. An increase in *CXCL12* (SDF-1 α) in lymphocytes has also been associated with decreased infectivity of HPCs via the X4-tropic strains of HIV-1 [32]. In HD-HIV cells, the increased expression of several chemokines may thus suggest that the cells are combating to inhibit virus infection by producing these ligands which compete for HIV-1 binding to cells. In addition, this may also suggest that by secreting these chemokines the HD-HIV cells may enhance the recruitment of virus infectable cells to the microenvironments *in vivo*. Although we have not measured the levels of these chemokines produced from the HD-HIV cells, an increase in their gene expressions of almost over 10 fold indicates their protein levels may also be augmented and

may therefore play a crucial role in the development of HIV-1 reservoirs.

Although the levels of productive infection (both p24 protein, *gag* and *Tat* mRNA levels) were almost similar in the HD-HIV and HUT78-HIV cells, there were several other salient differences in the gene expression profiles following HIV-1 infection. In addition to the differences in chemokine and their receptor expressions (Figure 4A), significant differences were seen in several apoptotic markers (Figure 4B) and in several lineage specific transcription factors (Figure 4C). In the HD cells, HIV-1 infection altered the expression of genes associated with apoptosis such as *BAX*, *BCL2*, *CASP3* and *GADD45 α* . HD cells also exhibited elevated levels of *BCL11B*, a transcription factor expressed in T-cells [36]. Interestingly, *BCL11B* has been found to repress HIV-1 transcription from the 5' long terminal repeat [37]. Genes associated with cell cycle regulation, such as *CDKN1A*, *CDK7* and most importantly *CDK9*, were also up regulated in the HD-HIV cells, as compared to uninfected HD as well as HUT78-HIV cells. Since, *CDK9* plays a crucial role in HIV-1 Tat protein mediated transactivation, a possible role of increased Tat function in the productive infection may also be considered likely. Indeed, the expression of several other transcription factors that are also known to regulate HIV-1 promoter activity, e.g. *CEBP- β* and both *STAT1* and *STAT3* genes, were also up regulated in HD-HIV cells, as compared to uninfected HD as well as HUT78-HIV cells. Interestingly, the mRNA expression of *NF κ BIA*, the p65 subunit of the transcription factor NF κ B which also regulates HIV-1 gene expression in stimulated lymphocytes, was not decisively altered in these cells. However, several cell surface receptors that regulate intracellular NF κ B activity, such as TNFSF10 and both IRF1 and IRF2 were higher.

The up-regulation of *Bax*, which results in a loss of mitochondrial membrane polarization and release of pro-apoptotic factors culminating in caspase activation and apoptosis, has been documented [38]. Andersen and coworkers have reported that the expression of *GADD45A* was increased following stressful growth arrest conditions as a result of HIV-1 infection [39]. HIV-1 has also been shown to regulate the expression of *CDK9* [40]. It has been shown that *STAT3* promotes the initiation of transcription and regulates chromatin remodeling and transcription elongation through its interaction with *CDK9* [41].

We also found that the expression of several genes such as *BANF1*, *BTRC*, *CD209*, *APOBEC3F*, and *TAT-SF1* increased in HD-HIV cells. *BANF1* is known for its ability to protect retroviruses from intra-molecular integration and there by promoting intermolecular integration into the host cell genome [42]. *BTRC*

interacts with HIV-1 viral protein U (Vpu) and connects CD4 to the proteolytic machinery [43]. *CD209* expression has been reported in association with HIV-1 infection [44]. APOBEC3F potently restricts HIV-1 replication, and is neutralized by the viral protein Vif [45]. Increased *TAT-SFI* expression in HD-HIV cells was significant and since it has been shown that *TAT-SFI* is required for maintaining the ratios of different classes of HIV-1 transcripts [46]. These findings suggest that pathways that facilitate productive infection in T-cells may also be induced in the HD-HIV cells, as is clearly evident from the levels of p24 and *gag* and *Tat* expression in both cell types.

In the present studies for the first time, the infective property of HIV-1 on cells derived from ASCs is reported. It has been reported that HIV-1 stimulates the secretion of the adipocyte-derived hormone adiponectin, however no evidence of infectivity of the virus on adipocytes were shown [47]. Our studies show that ASCs respond to HIV-1 exposure by increasing expression of *IL-10*, *c-Kit*, and *MMD2*. Although these effects do not ultimately result in productive infection, data revealed that HIV-1 exposure increases the hematopoietic lineage commitment of ASCs. The enhanced hematopoietic capacity of HIV-1 exposed ASCs was concurrent with decline in their adipogenic and osteogenic potential. Recently, it has been reported that chronic exposure of CD4⁺, CXCR4⁺, and CCR5⁺ mesenchymal stem cells with high viral load sera enhanced the adipogenesis [48]. While the treatment of cells with low viral load did not alter differentiation potential of those cells, the ASC clones used in this study were negative for *CD4*, *CXCR4*, and *CCR5*. In addition, our data suggest no HIV-1 integration into the ASC genome. These results of the present study shed light on the effect of HIV-1 on tissue resident stem cells paving way for additional studies to explore the mechanistic insights for understanding and management of the disease process.

Conclusion

Based on the observations reported, it is now feasible to study the effect of anti-HIV treatments on ASC derived HD cells. The presence of phenomenal numbers of ASCs in adipose tissue, and these novel findings which indicate that HIV-1 exposure may facilitate their macrophage type commitment, demonstrates that these cells may have importance in generating systemic viral reservoirs. Further, the utility of ASC as well as the ASC derived HD cells as a possible tool for future gene therapy against HIV-1 seems to be promising and merits additional investigation.

Methods

Cell culture and Hematopoietic Differentiation

All human tissue sample collection protocols were reviewed and approved by Institutional Review Board (IRB) of Tulane University. Human ASCs were isolated from adipose tissue of healthy donors (n = 14) based on the methods described earlier [49]. ASCs clones were isolated and expanded in α -MEM (CellGro, Manassas, VA) based media, supplemented with 20% fetal bovine serum (Atlanta Biologicals, Lawrenceville, GA), 1% L-Glutamine (CellGro, Manassas, VA) and 1% penicillin/streptomycin (CellGro, Manassas, VA) at 37°C in 5% CO₂. Then clones were cultured in differentiation media according to a previously described method [25]. Briefly, clonally expanded ASCs were plated at a density of 5000 cells/cm² on either cell culture dishes or chamber slides (Nalgene, Nunc, Rochester, NY). The differentiation media consisted of α -MEM, 10% FBS, 0.1 μ l/ml 1-monothioglycerol (MTG) (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis, MO), supplemented with 100 U/ml IL-1 β , 500 U/ml IL-3, and 20 U/ml M-CSF (Prospec Bio, Rehovot, Israel) as stimulating substances. 30% of the primary volume was augmented with fresh media every 2 days for 12 days. Cultures of ASC clones in growth media containing 10% FBS served as control undifferentiated cells.

HIV-1 Infection

The uninfected T4-lymphocyte line HUT78, and HUT78 cells persistently infected with HTLV-III_B strain of HIV-1 (from the AIDS Research & Reference Reagent Program, Bethesda, MD) were cultured in RPMI medium, supplemented with 10% FBS and antibiotics (penicillin & streptomycin). Cell-free viral stocks were obtained from the supernatants of HTLV-III_B infected cell line grown to 50-60% confluency. The viral titers were determined by measuring HIV-1 p24 levels using an ELISA kit as per the manufacturer's protocol (ZeptoMetrix, Buffalo, NY). For ASC infection studies, cells were cultured in differentiation media for either 5 (5-HD) or 8 (8-HD) days, and subsequently exposed to cell free virus for 24 hr. For HUT-78 cell infection, uninfected cells growing in the logarithmic phase were exposed to cell free virus for 24 hrs. All HIV-1 exposure studies were performed using a viral stock of ~100 pg/ml of p24 [10³-10⁴ transducing units (TU)/ml]. Each viral stock was freshly prepared before exposure of ASCs or uninfected HUT78 cells. For controls, un-differentiated ASCs and HUT78 cells were exposed to the same number of viral particles. Following 24 hrs of virus exposure, cells were washed several times using fresh media to remove the unattached viral particles and cultured for 3 or 5 days post exposure. Prior to viral infection, ASCs

were cultured in differentiation media for either 5 or 8 days, and subsequently exposed to HIV-1 in cell free viral media. Viral p24 levels were analyzed at each time point to monitor the viral replication in un-differentiated, HD, and HUT78 cells. A graphical representation of p24 level (pg/ml) vs time point (days) was carried out. Values with $p < 0.0001$ were considered significant.

Alu-gag PCR

The genomic DNA from exposed HIV-1 ASCs was subjected to two step *Alu-gag* PCR technique described by Liszewski *et al.* [29]. In the first step the *Alu-gag* regions were amplified using following primers: 1. *Alu* (Forward): 5' GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G-3'; HIV *gag* (Reverse): nucleotides (nt) 1505-1486 5' GTT CCT GCT ATG TCA CTT CC-3'. On the second step, RU5 region in *gag* was detected using the following primers: RU5 (R Forward): nt 518-539 5'-TTA AGC CTC AAT AAA GCT TGC C-3'; RU5 (U5 Reverse): nt 647-628 5'-GTT CGG GCG CCA CTG CTA GA-3'; 5. RU5wildtype Probe: nt 584-559 5'-CCA GAG TCA CAC AAC AGA CGG GCA CA-3'; RU5degenerate1 Probe: nt 584-559 5'-CCA GAG TCA CAT AAC AGA CGG GCA CA-3'; and RU5degenerate2 Probe: nt 584-559 5'-CCA GAG TCA CAC AAC AGA TGG GCA CA-3'. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

RT² qPCR gene expression analysis

Using total cellular RNA the gene expression was carried out on PCR array kits (SABiosciences, Frederick, MD) which profiles the expression of 84 genes involved in susceptibility to HIV-1, infection and related immune response. The cellular RNAs from un-differentiated ASCs, HD, and HIV-1 infected HD cells (HD-HIV) (n = 3 donors) with HIV-1 infected HUT78 (HUT78-HIV) (serving as positive controls) were used. Data were analyzed using software provided by SABiosciences <http://www.sabiosciences.com>. Differential gene expression was evaluated for statistical significance ($p < 0.05$). A cut off of 2 for fold change for up-regulated and 0.5 for down regulated genes was applied, so as to only consider genes whose expression was perturbed in magnitude as well as in a significant manner.

RT-PCR and Real-Time RT-PCR

Real-Time RT-PCR was performed using SYBR Green Master mix (Invitrogen, Carlsbad, CA) in a 2-step protocol (50 cycles of 10 sec at 90°C and 45 sec at T_m). The following primers were used to assess the gene expressions. *CD4*: 5'-GTA GTA GCC CCT CAG TGC AA-3', 5'-AAA GCT AGC ACC ACG ATG TC-3'; *CD14*: 5'-ACA GGA CTT GCA CTT TCC AG-3', 5'-TCC AGG

ATT GTC AGA CAG GT-3'; *CD68*: 5'-CAA CTG CCA CTC ACA GTC CT-3', 5'-CAA TGG TCT CCT TGG AGG TT-3'; *IL10*: 5'-AAG CCT GAC CAC GCT TTC TA-3', 5'-ATG AAG TGG TTG GGG AAT GA-3'; *ITGAM*: 5'-ACG GAT GGA GAA AAG TTT GG-3', 5'-CAA AGA TCT TCT CCC GAA GC-3'; *c-KIT*: 5'-CCG TGG TAG ACC ATT CTG TG-3', 5'-GTG CCC ACT ATC CTG GAG TT-3'; *MMD2*: 5'-GCA GAC CAA GGT GTC CAA AT-3', 5'-CTG GCT GTC ACC AGA AGT CA-3'; *MRC1*: 5'-GGC GGT GAC CTC ACA AGT AT-3', 5'-ACG AAG CCA TTT GGT AAA CG-3'; *MSR1*: 5'-TCC TCG TGT TTG CAG TTC TC-3', 5'-CAT GTT GCT CAT GTG TTC CA-3'; *TNF*: 5'-TCC TTC AGA CAC CCT CAA CC-3', 5'-AGG CCC CAG TTT GAA TTC TT-3'; *gag*: 5'-ATA ATC CAC CTA TCC CAG TAG GAG AAA T-3', 5'-TTT GGT CCT TGT CTT ATG TCC AGA ATG C-3'; *Tat*: 5'-GGA ATT CAC CAT GGA GCC AGT AGA TCC T-3', 5'-CGG GAT CCC TAT TCC TTC GGG CCT GT-3'; *GAPDH* 5'-CGA GAT CCC TCCA AAA TCA A-3' and 5'-GGT GCT AAG CAG TTG GTG GT-3'. The data were generated using an iCycler MyiQ (Biorad) and analyzed using the iQ5 V2.0 (Bio-Rad). The RT-PCR products were analyzed using agarose gel electrophoresis (1% agarose gel) and stained in 10 µg/ml ethidium bromid (Sigma) for visualization. For real-time RT-PCR, the equation $2^{-\Delta\Delta CT}$ was used for calculating fold changes. A threshold cycle of 35 was chosen as the cut-off for non-detectable genes, thus genes with CT values above 35 were considered not expressed.

Immunocytochemistry

HD cells were prepared and infected with HIV, the fixed, permeabilized, and incubated with human specific primary antibodies for CCR4, CCR5, CXCR4, and NOS2 at a final concentration of 0.02-0.04 mg/ml, then incubated with 0.002 mg/ml of the matching secondary antibody. The signal was detected with a Leica TCS SP-2 confocal microscope equipped with Argon (457-477 nm; 488 nm, 514 nm) and HeNe lasers (543 nm; 633 nm) at a magnification of HCX PL APO 63×/1.4 at 21°C. Data were processed with Leica confocal software.

Osteogenic and Adipogenic Differentiation

Adipogenic differentiation was determined in cultures of ASCs following HIV exposure using previously described methods [16]. Adipogenic potentials were evaluated by oil red O staining. Osteogenic differentiation was induced as previously described [50]. Differentiated cells were either fixed and stained with Alizarin Red (Diagnostic BioSystems) or quantified for alkaline phosphatase activity (ALP) using the SensoLyte™ pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit (AnaSpec, San Jose, CA). All analyzes were carried out in triplicates.

Statistical analysis

All data relating to this study were summarized using descriptive statistics such as mean, standard deviation and standard error. The analysis of variance method was used to compare the mean differences. Where meaningful, the results were presented graphically. The study hypotheses were tested at 5% level of significance throughout the analysis. Estimates of means and their 95% confidence intervals were calculated. R-computing software was used to plot the graphs.

Abbreviations

MSCs: mesenchymal stem cells; ASCs: adipose tissue derived mesenchymal stem cells; HD: hematopoietic differentiated cells; AIDS: acquired immune deficiency syndrome; HAART: highly active anti-retroviral therapy; HPCs: hematopoietic progenitor cells; LTBMC: long-term bone marrow cultures; HD-5: differentiate into HD cells for 5 days; HD-8: differentiate into HD cells for 8 days; MOI: multiplicity of infection; HD-HIV: infected HD cells with HIV-1; HUT78-HIV: infected HUT78 cells with HIV-1; ASCs-HIV: exposed ASCs to HIV-1; TRIM5: tripartite motif-containing 5; TAT-SF1: Tat specific factor 1; BTRC: b-transducin repeat containing.

Acknowledgements

This work was supported by funds from the Alliance of Cardiovascular Researchers, and from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID; NIH; #R21-AI-064048). We would also like to give special thanks and express our gratitude to Drs. Edward Newsome, Douglas Slakey, Subramanyam Murthy, and Kaushik Parsha for their valuable contributions to this study. In addition, we would also like to acknowledge Tulane's Cancer Center for providing us with the flowcytometry facilities.

Author details

¹Applied Stem Cell Laboratory, Heart and Vascular Institute, Department of Medicine, Tulane University Health Science Center; New Orleans, Louisiana, USA. ²Department of Pharmacology, Tulane University Health Sciences Center, New Orleans, Louisiana, USA. ³Department of Surgery, Tulane University Health Science Center; New Orleans, Louisiana, USA. ⁴Department of Biostatistics, Tulane University School of Public Health and Tropical Medicine, New Orleans, LA, USA. ⁵Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Louisiana Health Sciences Center, Louisiana State University; New Orleans, Louisiana, USA.

Authors' contributions

EF was responsible to cell cloning and cultures. EF, TN, and CS conducted differentiations. UR and CB were responsible for HIV-1 infection studies. AC and CD were responsible for tissue collections. RI, DM, and EA were responsible for experimental design. RI and EA were responsible for the overall experimental design and implementation of the project and contributed equally to this work.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 20 August 2010 Accepted: 12 January 2011

Published: 12 January 2011

References

1. Perelson AS, Essunger P, Ho DD: Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo. *AIDS* 1997, **11**(Suppl A):S17-24.
2. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Moss P, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, McMichael AJ, Nixon DF: Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *J Virol* 1999, **73**:797-800.
3. Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA: The CCR5 and CXCR4 coreceptors—central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004, **20**:111-126.
4. Zaitseva M, Peden K, Golding H: HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 2003, **1614**:51-61.
5. Ruiz ME, Cicala C, Arthos J, Kinter A, Catanzaro AT, Adelsberger J, Holmes KL, Cohen OJ, Fauci AS: Peripheral blood-derived CD34+ progenitor cells: CXCR4 chemokine receptor 4 and CC chemokine receptor 5 expression and infection by HIV. *J Immunol* 1998, **161**:4169-4176.
6. Chelucci C, Casella I, Federico M, Testa U, Macioce G, Pelosi E, Guerriero R, Mariani G, Giampaolo A, Hassan HJ, Peschle C: Lineage-specific expression of human immunodeficiency virus (HIV) receptor/coreceptors in differentiating hematopoietic precursors: correlation with susceptibility to T- and M-tropic HIV and chemokine-mediated HIV resistance. *Blood* 1999, **94**:1590-1600.
7. Bagnara GP, Zauli G, Giovannini M, Re MC, Furlini G, La Placa M: Early loss of circulating hemopoietic progenitors in HIV-1-infected subjects. *Exp Hematol* 1990, **18**:426-430.
8. Re MC, Zauli G, Gibellini D, Furlini G, Ramazzotti E, Monari P, Ranieri S, Capitani S, La Placa M: Uninfected haematopoietic progenitor (CD34+) cells purified from the bone marrow of AIDS patients are committed to apoptotic cell death in culture. *AIDS* 1993, **7**:1049-1055.
9. Koka PS, Jamieson BD, Brooks DG, Zack JA: Human immunodeficiency virus type 1-induced hematopoietic inhibition is independent of productive infection of progenitor cells in vivo. *J Virol* 1999, **73**:9089-9097.
10. Neal TF, Holland HK, Baum CM, Villinger F, Ansari AA, Saral R, Wingard JR, Fleming WH: CD34+ progenitor cells from asymptomatic patients are not a major reservoir for human immunodeficiency virus-1. *Blood* 1995, **86**:1749-1756.
11. Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, Gimble JM: Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 2006, **206**:229-237.
12. Fukuda K: Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *C R Biol* 2002, **325**:1027-1038.
13. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002, **13**:4279-4295.
14. Woodbury D, Reynolds K, Black IB: Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* 2002, **69**:908-917.
15. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD: Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002, **105**:93-98.
16. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA: Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2006, **99**:1285-97.
17. Canque B, Marandin A, Rosenzweig M, Louache F, Vainchenker W, Gluckman JC: Susceptibility of human bone marrow stromal cells to human immunodeficiency virus (HIV). *Virology* 1995, **208**:779-783.
18. Scadden DT, Zeira M, Woon A, Wang Z, Schieve L, Ikeuchi K, Lim B, Groopman JE: Human immunodeficiency virus infection of human bone marrow stromal fibroblasts. *Blood* 1990, **76**:317-322.
19. Moses AV, Williams S, Heneveld ML, Strussenberg J, Rarick M, Loveless M, Bagby G, Nelson JA: Human immunodeficiency virus infection of bone marrow endothelium reduces induction of stromal hematopoietic growth factors. *Blood* 1996, **87**:919-925.
20. Gill V, Shattock RJ, Scopes J, Hayes P, Freedman AR, Griffin GE, Gordon-Smith EC, Gibson FM: Human immunodeficiency virus infection impairs hemopoiesis in long-term bone marrow cultures: nonreversal by nucleoside analogues. *J Infect Dis* 1997, **176**:1510-1516.
21. Sloan EM, Young NS, Sato T, Kumar P, Kim S, Weichold FF, Maciejewski JP: Secondary colony formation after long-term bone marrow culture using peripheral blood and bone marrow of HIV-infected patients. *AIDS* 1997, **11**:1547-1553.
22. Bahner I, Kearns K, Coutinho S, Leonard EH, Kohn DB: Infection of human marrow stroma by human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) is both required and sufficient for HIV-1-induced hematopoietic suppression in vitro: demonstration by gene modification of primary human stroma. *Blood* 1997, **90**:1787-1798.
23. Wang L, Mondal D, La Russa VF, Agrawal KC: Suppression of clonogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by HIV

- type 1: putative role of HIV type 1 tat protein and inflammatory cytokines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002, **18**:917-931.
24. Lawrence DM, Durham LC, Schwartz L, Seth P, Maric D, Major EO: Human immunodeficiency virus type 1 infection of human brain-derived progenitor cells. *J Virol* 2004, **78**:7319-7328.
 25. Freisinger E, Cramer C, Xia X, Murthy SN, Slakey DP, Chiu E, Newsome ER, Alt EU, Izadpanah R: Characterization of hematopoietic potential of mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2010, **225**:888-97.
 26. Gorry PR, Churchill M, Crowe SM, Cunningham AL, Gabuzda D: Pathogenesis of macrophage tropic HIV-1. *Curr HIV Res* 2005, **3**:53-60.
 27. Kedzierska K, Crowe SM: The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr Med Chem* 2002, **9**:1893-1903.
 28. Cassol E, Alfano M, Biswas P, Poli G: Monocyte-derived macrophages and myeloid cell lines as targets of HIV-1 replication and persistence. *J Leukoc Biol* 2006, **80**:1018-1030.
 29. Liszewski MK, Yu JJ, O'Doherty U: Detecting HIV-1 integration by repetitive-sampling Alu-gag PCR. *Methods* 2009, **47**:254-260.
 30. Anderson JS, Bandi S, Kaufman DS, Akkina R: Derivation of normal macrophages from human embryonic stem (hES) cells for applications in HIV gene therapy. *Retrovirology* 2006, **3**:24.
 31. Gibellini D, Re MC, Vitone F, Rizzo N, Maldini C, La Placa M, Zauli G: Selective up-regulation of functional CXCR4 expression in erythroid cells by HIV-1 Tat protein. *Clin Exp Immunol* 2003, **131**:428-435.
 32. Xiao H, Neuveut C, Tiffany HL, Benkirane M, Rich EA, Murphy PM, Jeang KT: Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:11466-11471.
 33. Mondal D, Williams CA, Ali M, Eilers M, Agrawal KC: The HIV-1 Tat protein selectively enhances CXCR4 and inhibits CCR5 expression in megakaryocytic K562 cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005, **230**:631-644.
 34. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P: Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995, **270**:1811-1815.
 35. Majka M, Rozmyslowicz T, Lee B, Murphy SL, Pietrzkowski Z, Gaulton GN, Silberstein L, Ratajczak MZ: Bone marrow CD34(+) cells and megakaryoblasts secrete beta-chemokines that block infection of hematopoietic cells by M-tropic R5 HIV. *J Clin Invest* 1999, **104**:1739-1749.
 36. Li P, Burke S, Wang J, Chen X, Ortiz M, Lee SC, Lu D, Campos L, Goulding D, Ng BL, Dougan G, Huntly B, Gottgens B, Jenkins NA, Copeland NG, Colucci F, Liu P: Reprogramming of T Cells to Natural Killer-Like Cells upon Bcl11b Deletion. *Science* 2010, **329**:85-9.
 37. Marban C, Suzanne S, Dequiedt F, de Walque S, Redel L, Van Lint C, Aunis D, Rohr O: Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J* 2007, **26**:412-423.
 38. Muthumani K, Choo AY, Premkumar A, Hwang DS, Thieu KP, Desai BM, Weiner DB: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism. *Cell Death Differ* 2005, **12**(Suppl 1):962-970.
 39. Andersen JL, Zimmerman ES, DeHart JL, Murala S, Ardon O, Blackett J, Chen J, Planelles V: ATR and GADD45alpha mediate HIV-1 Vpr-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2005, **12**:326-334.
 40. Sedore SC, Byers SA, Biglione S, Price JP, Maury WJ, Price DH: Manipulation of P-TEFb control machinery by HIV: recruitment of P-TEFb from the large form by Tat and binding of HEXIM1 to TAR. *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:4347-4358.
 41. Giraud S, Hurlstone A, Avril S, Coqueret O: Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the p21waf1 gene. *Oncogene* 2004, **23**:7391-7398.
 42. Mansharamani M, Graham DR, Monie D, Lee KK, Hildreth JE, Siliciano RF, Wilson KL: Barrier-to-autointegration factor BAF binds p55 Gag and matrix and is a host component of human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* 2003, **77**:13084-13092.
 43. Christodoulopoulos I, Droniou-Bonzom ME, Oldenburg JE, Cannon PM: Vpu-dependent block to incorporation of GaLV Env into lentiviral vectors. *Retrovirology* 2010, **7**:4.
 44. Serrano-Gomez D, Sierra-Filardi E, Martinez-Nunez RT, Caparros E, Delgado R, Munoz-Fernandez MA, Abad MA, Jimenez-Barbero J, Leal M, Corbi AL: Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. *J Biol Chem* 2008, **283**:3889-3903.
 45. Dang Y, Davis RW, York IA, Zheng YH: Identification of 81LGxGxxlxW89 and 171EDRW174 domains from human immunodeficiency virus type 1 Vif that regulate APOBEC3G and APOBEC3F neutralizing activity. *J Virol* 2010, **84**:5741-5750.
 46. Miller HB, Saunders KO, Tomaras GD, Garcia-Blanco MA: Tat-SF1 is not required for Tat transactivation but does regulate the relative levels of unspliced and spliced HIV-1 RNAs. *PLoS One* 2009, **4**:e5710.
 47. Sankale JL, Tong Q, Hadigan CM, Tan G, Grinspoon SK, Kanki PJ, Hotamisligil GS: Regulation of adiponectin in adipocytes upon exposure to HIV-1. *HIV Med* 2006, **7**:268-274.
 48. Cotter EJ, Chew N, Powderly WG, Doran PP: HIV Type 1 Alters Mesenchymal Stem Cell Differentiation Potential and Cell Phenotype ex Vivo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010.
 49. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001, **7**:211-228.
 50. Izadpanah R, Joswig T, Tsien F, Dufour J, Kirijan JC, Bunnell BA: Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells Dev* 2005, **14**:440-451.

doi:10.1186/1742-4690-8-3

Cite this article as: Nazari-Shafti *et al.*: Mesenchymal stem cell derived hematopoietic cells are permissive to HIV-1 infection. *Retrovirology* 2011 **8**:3.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

