

2. Material

2.1. Charakterisierung von Patienten und Kontrollpersonen

Von zehn HIV-infizierten Patienten wurden vor Beginn einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) und im Verlauf der Therapie peripher-venöses Blut und endoskopisch Sigmabiopsien gewonnen. Die HIV-Patienten waren zwischen 28 und 53 Jahre alt. Es wurden neun homosexuelle Männer und eine Frau mit intravenösem Drogengebrauch als Risikofaktor für HIV untersucht. Alle Patienten hatten eine nachweisbare Viruslast, sieben Patienten hatten AIDS-definierende Erkrankungen, eine Patientin war im Stadium der Serokonversion und zu Studienbeginn waren alle Patienten mit Blick auf die Medikamentenanamnese Protease-Inhibitor-naiv. Während der Studie begannen die Patienten mit der Einnahme einer hochaktiven antiretroviralen Dreifachkombinationstherapie (HAART) bestehend aus zwei nukleosidalen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) und einem Protease-Inhibitor (PI) (Tab. 01). Als Kontrolle dienten Sigmabiopsien von sieben Personen ohne HIV-Infektion und ohne entzündliche oder tumoröse Darmerkrankung, die im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung einmalig endoskopiert worden sind.

Tabelle 01: Charakterisierung der Studienteilnehmer

	Alter [Jahre]	Geschlecht	CDC- Stadium	CD4 ⁺ T-Zellzahl / µl Blut	Viruslast / ml Blut	Medikation [HAART]
P1	28	w	A1	1.217	1.071.519	AZT, IDV; 3TC nach 4 Wo. zu D4T
P2	49	m	B2	403	113.500	D4T, DDI, NFV
P3	44	m	C3	24	400.000	AZT, 3TC, IDV
P4	30	m	C3	23	42.000	AZT, DDC, IDV
P5	50	m	C3	45	2.100.000	AZT, DDC, IDV
P6	52	m	C3	159	9.600	AZT, DDC, IDV
P7	34	m	C3	41	48.550	AZT, 3TC, IDV
P8	40	m	A3	224	9.600	AZT, DDC, NFV
P9	53	m	C3	45	1.656	AZT, 3TC, IDV
P10	27	m	C3	175	750.000	AZT, 3TC, IDV
Median	42	-	-	102	81.025	-

P HIV-Patient; m männlich; w weiblich; AZT Zidovudin; 3TC Lamivudin; D4T Stavudin; DDI Didanosin; DDC Zalcitabin; IDV Indinavir; NFV Nelfinavir

Bei allen HIV-Patienten erfolgte die Abnahme der ersten Proben vor Therapiebeginn und weitere Abnahmen jeweils einen Monat (Median 28 Tage), vier Monate (Median 111 Tage) und neun Monate (Median 284 Tage) nach Therapiebeginn. Bei jeder Abnahme wurden 7 Biopsien entnommen. Ein Biopsat wurde pathologisch begutachtet mit der Frage nach spezifischen Entzündungen oder tumorösen Veränderungen, ein weiteres wurde mikrobiologisch auf Kryptosporidien, Mikrosporidien und Zytomegalievirusinfektion untersucht, drei Proben dienten zur mukosalen CD4⁺T-Zellzahlbestimmung, eine weitere zur Viruslastbestimmung und eine für die Zytokin-mRNA Quantifizierung. Die Biopsien für diese Untersuchung wurden sofort nach der endoskopischen Entnahme in physiologische Kochsalzlösung überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Alle Patienten wurden über die Studie aufgeklärt und stimmten der Teilnahme schriftlich zu. Die Genehmigung für die Durchführung der Untersuchungen durch die örtliche Ethikkommission lag vor.

2.2. HIV-Beladung und CD4⁺T-Zellzahl

Um Veränderungen in der Zytokin-mRNA-Expression den Auswirkungen der HAART zuordnen zu können, musste der Therapieerfolg dokumentiert werden. Daher waren im Vorfeld zu meiner Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe die HIV-Beladung und die CD4⁺T-Zellzahl sowohl im peripheren Blut als auch in der intestinalen Mukosa bei den Patienten bestimmt worden.

2.2.1. HIV-Beladung im Blut und in der intestinalen Mukosa unter HAART

Die HIV-RNA-Beladung nahm unter HAART im peripheren Blut als auch in der intestinalen Mukosa deutlich ab.

Im Blut fiel die HIV-RNA-Kopienzahl pro Milliliter (K / ml) von im Median 42000 (4200-1071500) vor Therapie um eine log-Stufe auf im Median 3050 (102-6545) nach einem Monat HAART. Nach weiteren vier Monaten war sie auf 500 (47-11000) K / ml und nach 9 Monaten Therapie auf 300 (113-5990) K / ml gefallen.

Auch die HIV-RNA-Beladung in der Mukosa HIV-infizierter Patienten sank während hochaktiver antiretroviraler Therapie. Sie betrug im Median vor HAART 91000 (17500-3265000) HIV-RNA-Kopien pro 100000 Zellen (K / 10⁵ Zellen) in der Biopsie. Nach einem Monat Therapie war sie um eine log-Stufe auf im Median 5000 (100-29000) K / 10⁵ Zellen und nach vier Monaten Therapiedauer um eine weitere log-Stufe auf im Median 250 (100-5000) K / 10⁵ Zellen abgefallen.

2.2.2. CD4⁺T-Zellzahlen im Blut und in der intestinalen Mukosa unter HAART

Unter HAART kam es zu einem Anstieg der CD4⁺T-Zellzahlen sowohl im Blut als auch in der intestinalen Mukosa.

Vor HAART lag die CD4⁺T-Zellzahl pro Mikroliter Blut (Zellen / μ l) im Median bei 159 (23-1217). Nach einem Monat Therapie stieg sie auf im Median 229 (103-1009) Zellen / μ l und nach vier Monaten weiter auf im Median 254 (160-670) Zellen / μ l. Nach 9 Monaten Therapiedauer waren im Median 251 (98-1214) Zellen / μ l erreicht.

Die CD4⁺T-Zellzahl pro Milligramm Biopsie in der Mukosa lag vor HAART im Median bei 26 (1-38). Nach einem Monat HAART war sie um 1-2 log-Stufen auf 477 (42-2065) CD4⁺T-Zellen pro mg Biopsie angestiegen.

2.3. Chemikalien und Reagenzien

Agarose	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diethyl-Pyrocabonat (DEPC)	Sigma, Steinheim, Deutschland
DMF	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNTP's	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycerin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Isoamylalkohol	Sigma, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Low DNA Mass TM Leiter	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
Luria Agar	Sigma, Steinheim, Deutschland
Luria Broth Base	Sigma, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
Natriumacetat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland

Oligo-d(T) ₁₆ Primer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Phenol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Poly A	Pharmacia, Erlangen, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Fluka, Buchs, Deutschland
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIzol [®] LS Reagent (Total RNA Isolation Reagent for Liquid Samples)	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
x-Gal	Promega, Mannheim, Deutschland
Zufalls-Oligonukleotidhexamere	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
100 bp DNA Leiter (1 µg / µl) in TE-Puffer	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland

2.4. Kits

LightCycler-DNA Master SYBR Green I; Roche, Mannheim, Deutschland

Reaktionsmix (10-fach konzentriert): Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs (mit dUTP anstelle von dTTP), SYBR Green I, 10 mM MgCl₂

MgCl₂, 25 mM

steriles Wasser

LightCycler-DNA Master Hybridization Probes; Roche, Mannheim, Deutschland

Reaktionsmix (10-fach konzentriert): Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP's (mit dUTP anstelle von dTTP), 10 mM MgCl₂

MgCl₂, 25 mM

steriles Wasser

LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes; Roche, Deutschland

FastStart Taq DNA

Reaktionsmix (10-fach konzentriert): Reaktionspuffer, dNTP's (mit dUTP anstelle von dTTP), 10 mM MgCl₂

MgCl₂, 25 mM

steriles Wasser

Omniscript™ Reverse Transcriptase; Qiagen, Hilden, Deutschland

Omniscript-Reverse-Transcriptase

RT-Puffer 10x

dNTP-Mix (je 5 mM)

RNase-freies Wasser

QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland

Puffer QG: enthält Farbindikator (gelb bei pH ~7,5)

Puffer PE: enthält Ethanol

Puffer EB: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

QIAprep Midi-Plasmidextraction-Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland

Puffer P1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 und RNase A (100 µg / ml)
in Aqua destillata

Puffer P2: 200 mM NaOH und 1 % SDS in Aqua destillata

Puffer P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5 in Aqua destillata

Puffer QC: enthält chaotrope Salze

Puffer QF: enthält Ethanol

Puffer QTB: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

TA Cloning Kit; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

SOC-Medium (ad 6 ml Aqua destillata)

2 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glucose

Das Plasmid besitzt die Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin sowie das LacZ-Gen.

2.5. Enzyme mit Puffern

DNase I Amplification Grade mit

10x DNase I-Puffer	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
SuperscriptRNase H	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
Taq DNA-Polymerase	Pharmacia, Erlangen, Deutschland
10x Taq DNA-Polymerase PCR Puffer	Pharmacia, Erlangen, Deutschland

Eco R I, 10 U/ μ l in:	20 mM Tris-HCl pH 7,5	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
	100 mM NaCl	
	1 mM EDTA	
	10 mM 2-Mercaptoethanol	
	0,01% (v/v) Triton X-100	
	50% (v/v) Glycerin	

REACT3-Puffer (für Eco R I)	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
	50 mM Tris-HCl pH 7,5
	50 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂

Xba I, 10 U/ μ l in:	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
	20 mM Tris-HCl pH 7,5
	100 mM NaCl
	1 mM EDTA
	10 mM 2-Mercaptoethanol
	0,01 % (v/v) Triton X-100
	50 % (v/v) Glycerin

Hind III, 10 U/ μ l in:	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
	10 mM Tris-HCl pH 7,5
	250 mM NaCl
	0,1 mM EDTA

REACT2-Puffer (für Xba I und Hind III): GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland

50 mM Tris-HCl pH 8,0

50 mM NaCl

10 mM MgCl₂

2.6. Primer und Hybridisierungs sonden

Alle Primer und Hybridisierungs sonden wurden HPLC-gereinigt von der Firma Tibmolbiol, Berlin, Deutschland bezogen.

Tabelle 02: Ziel-spezifische Sequenzen der Primer und Hybridisierungs sonden

Ziel		Sequence (5' → 3')	Acc. no.	Position (bp)
GAPDH	Sense Primer	AACAgCgACACCCACTCCTC	M33197	919 - 938
	Antisense Primer	ggAggggAgATTCAgTgTggT		1176 - 1156
	FL	CATggCCTCCAAggAgTAAgACCCCT		1059 - 1075
	RED705	ACCACCAgCCCCAgCAAgAgCA		1078 - 1099
IL-2	Sense Primer	CACAgCTACAActggAgCATTTAC	U25676	145 - 168
	Antisense Primer	TgCTgATTAAgTCCCTgggTC		387 - 358
	FL	TCCCAAActCACCAGgATgCTCACA		215 - 239
	RED640	TAAgTTTTACATgCCCAAgAAggCCAC		242 - 268
IL-4	Sense Primer	TgCCTCCAAgAACACAActgA	M13982	237 - 257
	Antisense Primer	CCAACgTACTCTggTTggCTT		463 - 443
	FL	CCTTCTCATggTggCTgTAgAACTgCC		319 - 293
	RED640	AgCACAgTCgCAgCCCTgCagAAg		290 - 267
IL-6	Sense Primer	CTTTTggAgTTTgAggTATACCTAg	M29150	390 - 414
	Antisense Primer	gCTgCgCAgAATgAgATgAgTTgTC		626 - 602
	FL	AgATgCAATAACCACCCTgACCCAA		518 - 543
	RED640	CACAAATgCCAgCCTgCTgACgAA		545 - 568
IL-10	Sense Primer	TgAgAACCAAgACCCAgACA	M57627	324 - 343
	Antisense Primer	TCATggCTTTgTAgATgCCT		505 - 486
	FL	CggCgCTgTCATCgATTTCTTCCCT		400 - 424
	RED640	TgAAAACAAGAgCAAggCCgTggAgC		426 - 451

Tabelle 02: Fortsetzung

Ziel		Sequence (5' → 3')	Acc. no.	Position (bp)
IL-16	Sense Primer	gCAAgtCTCTCAAggggACC	U82972	1577 - 1596
	Antisense Primer	CCTTCCAaggCTgAAgCCCAgC		1826 - 1806
	FL	CCCAgCCCTgCCgACATCTTCT		1811 - 1790
	RED640	CAGTgTCACCgTgCAGACTgTggC		1788 - 1765
IFN- γ	Sense Primer	gCATCCAAAAGAgTgTggAg	X13274	371 - 390
	Antisense Primer	gCAggCAggACAACCATTAC		625 - 606
	FL	TCCAACgCAAAgCAATACATgAACTC		491 - 516
	RED640	TCCAAGTgATggCTgAACTgTCg		518 - 540
TNF- α	Sense Primer	gAgTgACAAgCCTgTAgC	M10988	337 - 354
	Antisense Primer	CCCTTCTCCAgtgAAg		699 - 682
	FL	gCATTggCCCggCggTTC		417 - 400
	RED640	CCACTggAgCTgCCCCTCAgCT		397 - 376
CCL3	Sense Primer	gCAACCAgTTCTCTgCATCACTT	M23452	136 - 158
	Antisense Primer	CAGCTCCAaggTCgTgACAT		353 - 334
	FL	gTgTCATCTTCTAACCAAgCgAAgCC		265 - 291
	RED640	TTgTCTgTgCTgACCCCAgTgAggAg		(295) - 320
CCL5	Sense Primer	CACgCCTCgCTgTCATCCTCA	M21121	43 - 63
	Antisense Primer	TTggCggTTCTTTTcgggTgAC		239 - 219
	FL	gCTgCTTTgCCTACATTgCCCgC		124 - 146
	RED640	CACTgCCCCgTgCCCACATCAA		148 - 169

FL, Hybridisierungssonde mit Fluorescein; RED, Hybridisierungssonde, die Licht der Wellenlänge 640 oder 705 nm emittiert; Acc. no., Acquisitionsnummer des Gens im NCBL

2.7. Zellen

Bei den für die Klonierung verwendeten *Escherichia coli*, TOP10 One Shot Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) handelt es sich um käufliche, kompetente Zellen, die vom *E. coli*-Stamm K12 abstammen. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich im Medium nur in Anwesenheit von Thymidin teilen können. Weiterhin weisen sie im LacZ-Gen die Deletion M15 auf mit der Folge, dass das dadurch kodierte verkürzte Enzym β -Galactosidase inaktiv ist.

2.8. Puffer und Stammlösungen

Probenpuffer für Gelelektrophorese, 6x:

Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM

EDTA 2 mM

Glycerin in Wasser 30 % (w/v)

Bromphenol-Blau 0,1 % (w/v)

TAE-Puffer, 50x:

242 g Trisbase

57,1 ml Essigsäure (100 %)

100 ml EDTA (pH 8,0) 0,5 M

ad 1000 ml Aqua destillata

EDTA (0,5 M; pH 8,0):

93,1 g EDTA

400 ml Aqua destillata

Natrium-Hydroxid Plätzchen

Natriumlauge

ad 500 ml Aqua destillata

DEPC-Wasser:

Aqua destillata

0,1 % DEPC (Diethyl-Pyrocarbonat)

zwei Stunden rühren und zum Entweichen des DEPC autoklavieren

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)

1 mM EDTA (pH (8,0)

Tris-HCl (1,0 M, pH 8,0):

800 ml Aqua destillata

121,14 g Tris

pH-Einstellung mit HCl

auf 1l mit Aqua destillata einstellen, autoklavieren

Poly A-Lösung:

10 mg Poly A / ml in Tris Puffer (10 mM, pH 7,4)

Ampicillin-Stammlösung:

100 mg Ampicillin / ml in Aqua destillata, Lagerung bei -20 °C

x-Gal-Stammlösung:

200 mg x-Gal / ml in Dimethylformamid, Lagerung bei -20 °C

2.9. Kulturmedien

LB (Luria Bertani) - Medium:

In einen 2000 ml Erlenmeyerkolben werden 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt und 10 g NaCl eingewogen und mit Aqua destillata auf 950 ml aufgefüllt. Anschließend wird die Lösung autoklaviert. Wenn die Lösung auf 50 °C abgekühlt ist, werden 500 µl der Ampicillin-Stammlösung (100 mg / ml) zugegeben. Dieses Medium ist im Kühlschrank für einige Tage lagerbar.

LB-Agar-Platten:

Für 250 ml Kulturmedium werden 10 g Luria-Agar in einen 1000 ml Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 250 ml Aqua destillata aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren, wenn die Lösung auf etwa 50 - 60 °C abgekühlt ist, werden 125 µl der Ampicillin-Stammlösung (100 mg / ml) hinzupipettiert. Nach guter Durchmischung wird der noch flüssige Agar steril in Petrischalen mit einer Schichtdicke von etwa 5 mm gegossen. Die so präparierten Platten sind bei 4 °C über zwei Wochen lagerbar. Vor dem Auftragen der Transformationslösung werden die Agar-Platten mit 80 µl einer x-Gal-Lösung (20 mg / ml in DMF) beschichtet.

2.10. Geräte

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gel-Elektrophoresekammer	Bio-RAD, München, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Homogenisator UW70 mit Sonoplus HD70 Steuereinheit	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Metallblockthermostat	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Inkubationsschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlschrank (4 °C)	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Kühlzentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge SS-34	Sorvall, Hanau, Deutschland
LightCycler	Roche, Mannheim, Deutschland
Mikrowelle	Phillips, München, Deutschland
Pipetten 10 µl, 100 µl und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
GeneAmp 9600	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Schüttler MTS 4	IKA, Barnstaple, Großbritannien
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transluminator TI3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortexer MS1 Minishaker	IKA, Barnstaple, Großbritannien
Waage BL 610	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad 1083	GFL, Adligenwil, Schweiz
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.11. Verbrauchsmaterialien

Einmalpinzetten	Weinholz, Gevelsberg, Deutschland
Einmalskalpelle	Feather, Tokyo, Japan
Eppendorf Gefäße 1,5 und 2,0 ml safe-lock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim, Deutschland
PCR-Gefäße 0,2 ml safe-lock	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Video Printer Film UPP-110HD	Sony, Tokyo, Japan
Uvetten (2 x 10mm Küvette)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland