

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Untersuchungen zur Bedeutung der
akzessorischen Gene *nef* und *vpr* des
Affen-Immundefizienz-Virus bei der
Immunpathogenese in infizierten Makaken**

von Antonina Klippert

aus Kanew, Ukraine

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Lehrstuhl für Virologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. med.
vet. Dr. habil. Gerd Sutter

Angefertigt in der Abteilung Infektionsmodelle des Deutschen
Primatenzentrums Göttingen

Mentorin: Dr. med. vet. Christiane Stahl-Hennig

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Korreferent/in: Priv.-Doz. Dr. Stefan Bauersachs

Tag der Promotion: 06.Februar 2016

Für Thomas

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	11
2. Literaturübersicht	13
2.1 HIV und AIDS	13
2.1.1 Entdeckung	13
2.1.2 Klassifikation und Vergleich von HIV-1 und HIV-2	14
2.1.3 Weltweite Verbreitung	16
2.1.4 Übertragung	16
2.1.5 Klinik und Pathogenese.....	17
2.1.6 Therapie	18
2.1.7 Impfstoffentwicklung.....	19
2.2 SIV und das SIV-Makakenmodell als Modell für die HIV-Infektion des Menschen	20
2.3 Struktur von HIV und SIV	22
2.3.1 Morphologie.....	22
2.3.2 Genomische Organisation.....	23
2.3.3 Vpr und Nef	24
2.3.4 Replikationszyklus.....	27
2.4 Das Immunsystem	29
2.4.1 Zellvermittelte Immunantwort	29
2.4.2 Humorale Immunantwort.....	31
2.4.3 B-Zellen	31
2.4.4 Antikörper	33
2.5 Auswirkungen von HIV/SIV auf das Immunsystem und Immunantworten	35
2.5.1 Auswirkungen der HIV/SIV-Infektion auf T-Zellen und die zellvermittelte Immunantwort.....	35
2.5.2 Auswirkungen der HIV/SIV-Infektion auf B-Zellen und die humorale Immunantwort	36
2.6 Ziele dieser Arbeit	38
3. Material und Methoden	40
3.1 Versuchstiere	42
3.1.1 Narkotisierung	45
3.1.2 Infektion mit SIV	45
3.1.3 Blutentnahme	46

3.1.4 Beckenkammpunktion	46
3.1.5 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	47
3.1.6 Lymphknotenextirpation	48
3.1.7 Lymphknoten-Feinnadelaspiration (LN-FNA).....	48
3.1.8 Colonbiopsien (CB)	49
3.1.9 Euthanasie und Sektion	49
3.2 Isolierung von mononukleären Zellen	50
3.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut.....	50
3.2.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus der BAL.....	50
3.2.3 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Lymphknoten.....	51
3.2.4 Isolierung von mononukleären Zellen aus Lymphknoten-Feinnadelaspiraten	51
3.2.5 Isolierung von mononukleären Zellen aus Colonbiopsien.....	51
3.2.6 Isolierung von mononukleären Zellen aus Milz, Knochenmark aus dem Femur und Darm aus der Sektion.....	52
3.3 Zellzahlbestimmung.....	53
3.4 Kryokonservierung von Probenmaterial.....	53
3.4.1 Einfrieren von PBMCs und MNCs	53
3.4.2 Einfrieren von Plasma und Serum.....	54
3.4.3 Auftauen von PBMCs und MNCs	54
3.4.4 Auftauen von Plasma und Serum.....	54
3.5 Methoden	54
3.5.1 Bestimmung der Viruslast im Plasma mittels qRT-PCR.....	54
3.5.2 SIV-ELISA	56
3.5.3 B-Zell-ELISpot	57
3.5.4 Magnetische Zellseparation	59
3.5.5 Polychromatische Durchflusszytometrie	60
3.5.5.1 Färbung mit direkt Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern.....	62
3.5.5.2 Färbung mit indirekt Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern.....	62
3.5.5.3 Intrazelluläre Färbung	62
3.5.5.4 Färbung mit TruCOUNT™-Röhrchen	63
3.5.5.6 Auflistung der verwendeten Antikörper	64
3.6 Neopterinmessung im Urin	67
3.7 Statistische Auswertung	68
4. Ergebnisse	69

4.1 Vergleichende phänotypische und funktionelle Charakterisierung von B-Zellpopulationen und Plasmazellen in frischen und tiefgefrorenen Proben von PBMCs und MNCs aus Knochenmark, Milz, Lymphknoten und Darm.....	69
4.1.1 Gating-Strategie der B-Zellpopulationen	70
4.1.2 Vergleich der prozentualen Anteile von B-Zellen und Subpopulationen in frischen und kryokonservierten Proben von Blut und verschiedenen Organen	74
Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass CD20 ⁺ B-Zellen in PBMCs nach Kryokonservierung stabil blieben, jedoch prozentual in allen anderen Organen anstiegen. Bezüglich der Expression des Markers CD27 war in PBMCs und allen Organen ein Verlust nach Kryokonservierung zu beobachten, der somit zu einem prozentualen Verlust aller Populationen führte, die CD27 auf der Oberfläche exprimierten.....	76
4.1.3 Gating-Strategie der Plasmazellen.....	76
4.1.4 Vergleich der prozentualen Anteile von Plasmazellen in frischen und kryokonservierten Proben von PBMCs und KM	77
4.1.5 Funktioneller Vergleich zwischen frischen und tiefgefrorenen PBMCs	80
4.2 Analyse von CD138 als möglichem Marker zur Charakterisierung von Plasmazellen von Rhesusmakaken.....	81
4.3 Pathogenesestudie mit einer SIV-<i>nef</i>-Mutante und einer SIV-<i>vpr</i>-Deletionsmutante im Rhesusaffenmodell.....	84
4.3.1 Krankheitsprogression und AIDS	85
4.3.2 Viruslast im Plasma	87
4.3.3 Neopterinbestimmung im Urin.....	89
4.3.4 Durchflusszytometrische Analyse der T- und B-Zellpopulationen und Plasmazellen	91
4.3.4.1 Gating-Strategie der T-Zellen.....	91
4.3.4.2 Etablierung der LN-FNA und Gating-Strategie der folliculären T-Helferzellen.....	92
4.3.4.3 CD4-Zellzahlen im Vollblut und lymphoidem sowie mukosalem Gewebe	96
4.3.4.4 T _{FH} -Zellzahlen und IL-21 ⁺ T _{FH} -Zellzahlen in lymphoidem Gewebe	102
4.3.4.5 Immunaktivierung der T-Zellen	104
4.3.4.6 Prozentzahlen der zentralen und Effektor-Gedächtnis-CD4 ⁺ T-Zellen im Vollblut...	106
4.3.4.7 Gating-Strategie der B-Zellen	108
4.3.4.8 CD20-Zellzahlen im Vollblut und KM	109
4.3.4.9 Prozentzahlen der aktivierten Gedächtnis-B-Zellen im Vollblut	110

4.3.4.10 Immunaktivierung der B-Zellen	112
4.3.5 Humorale Immunantwort.....	113
4.3.5.1 Bindende Antikörper gegen p27.....	113
4.3.5.2 Bindende Antikörper gegen gp130.....	114
4.3.5.3 Anzahl der Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen.....	115
4.3.5.4 Prozentzahlen der gp130-spezifischen Antikörper-sezernierenden Zellen.....	116
4.3.5.5 Etablierung der Stimulation zur quantitativen Bestimmung der gp130-spezifischen Antikörper-sezernierenden Gedächtnis-B-Zellen	117
4.3.5.6 Prozentzahlen der gp130-spezifischen Antikörper-sezernierenden Gedächtnis-B-Zellen	118
4.3.6 Korrelationen zwischen humoralen Immunantworten und B-Zell-Subpopulationen	119
5. Diskussion	122
5.1 Kryokonservierte mononukleäre Zellen aus Blut und verschiedenen lymphoiden und nicht lymphoiden Organen sind im Vergleich zu frischen Proben signifikant verändert.....	122
5.2 CD138 ist ein geeigneter Marker zur Charakterisierung von Plasmazellen im Rhesusaffen.....	126
5.3 Die LN-FNA stellt eine geeignete Methode zur longitudinalen Analyse von T-Zell- Populationen im Lymphknoten dar und ist mit der klassischen Methode der kompletten Exstirpation eines Lymphknotens vergleichbar.....	128
5.4 Die Nef-vermittelte Herabregulierung des TCR-CD3 Komplexes begünstigt möglicherweise die Aufrechterhaltung einer effizienten Virusreplikation von SIV in Rhesusaffen.....	131
5.5 Die SIVmac239 vpr Deletionsmutante ist in Rhesusaffen attenuiert.	137
6. Zusammenfassung.....	143
7. Summary	146
8. Abkürzungsverzeichnis	149
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	154
10. Literaturverzeichnis	158

Danksagung 186

1. Einleitung

Selbst Jahrzehnte nach der Entdeckung des Humanen Immundefizienz-Virus (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV) sterben noch immer weltweit jährlich fast zwei Millionen Menschen an den Folgen des erworbenen Immunschwächesyndroms (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) [1].

Dank der heutzutage verfügbaren antiretroviralen Medikamente ist die Diagnose HIV kein sofortiges Todesurteil der Betroffenen mehr. Jedoch gibt es bis heute keine Heilung oder einen Impfstoff. Dies wäre vor allem in ärmeren Ländern der Erde wichtig, in denen eine lebenslange antiretrovirale Behandlung nicht selbstverständlich ist. Insofern ist die weitere Erforschung dieser Erkrankung unerlässlich.

Asiatische Rhesusmakaken (*Macaca mulatta*, RM) stellen die wichtigsten Modelltiere zur Erforschung der HIV-Erkrankung des Menschen dar, da sie sich experimentell mit dem Affen-Immundefizienz-Virus (engl. *simian immunodeficiency virus*, SIV) infizieren lassen [2].

Viele Kennzeichen des Krankheitsverlaufs und der Immunreaktion sind ähnlich zwischen HIV und SIV, jedoch ist die Krankheitsdauer bei Makaken bis zum Ausbruch von AIDS wesentlich kürzer. Durch jahrzehntelange Forschung mit diesem Modell konnten unzählige Erkenntnisse über die HIV-Infektion gewonnen werden und die Medikamentenentwicklung vorangetrieben werden. Eine gute Charakterisierung des Makakenmodells und weitere Forschung in verschiedenen Bereichen sind dabei essentiell, um Erkenntnisse besser auf die menschliche HIV-Infektion übertragen zu können.

In dieser Dissertation soll eine umfassende phänotypische und funktionelle Charakterisierung von B-Zellpopulationen und Plasmazellen longitudinal im Verlauf einer SIV-Studie durchgeführt werden. Diese Untersuchungen zu B-Zellen sind wichtig, da es während der HIV-Infektion nicht nur bei T-Zellen zu zahlreichen Defekten kommt [3]. Die Schädigung der B-Zellen resultiert in einer ineffektiven humoralen Immunantwort. Dies erschwert auch die Herstellung eines effizienten Impfstoffs, weshalb ein tiefgreifendes Verständnis der B-Zell-Dysfunktionen notwendig ist.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit analysierte Studie befasst sich mit der Bedeutung der akzessorischen Gene *nef* und *vpr*. Dabei sollen RM mit verschiedenen SIV-Mutanten infiziert werden und die Auswirkungen auf die *in vivo* Pathogenese sowie die virale Kinetik und Immunaktivierung sollen untersucht werden. Zusätzlich zu der gründlichen phänotypischen und funktionellen Analyse der B-Zellen sollen zusätzlich T-Zellen berücksichtigt werden. Das schließt die Kinetik der CD4⁺ T-Zellen im Blut und in verschiedenen Organen im Allgemeinen sowie spezieller Populationen wie follikulärer T-Helferzellen (T_{FH}-Zellen) im Lymphknoten (LN) ein.

Bereits vorhandene Untersuchungen offenbarten die essentielle Rolle der akzessorischen Gene für die virale Replikation und Pathogenese von HIV/SIV. Unterschiede bezüglich dieser können die unterschiedliche Pathogenität von HIV-1 und HIV-2/SIV bedingen, was die Forschung in diesem Gebiet unerlässlich macht.

2. Literaturübersicht

2.1 HIV und AIDS

2.1.1 Entdeckung

Im Jahre 1981 häuften sich in den USA Berichte über eine neue erworbene Immunschwäche bei vorher gesunden, homosexuellen Männern sowie bei Drogenabhängigen, die klinisch durch mukosale Candidiosen, *Pneumocystis carinii*-Pneumonien (aktuelle Nomenklatur: *Pneumocystis jirovecii*), multiple virale Infektionen und durch die Entwicklung von Kaposi-Sarkomen auffielen [4-6]. Zu dem Zeitpunkt wurde bereits vermutet, dass der Ausbildung der Immunschwäche eine Erniedrigung der Lymphozytenzahl, besonders der CD4⁺ T-Helferzellen (engl. *cluster of differentiation*, Differenzierungsgruppen) zugrunde liegt.

In den nächsten Jahren offenbarten wöchentliche Berichte des Zentrums für Krankheitskontrolle und Prävention (engl. *Center for Disease Control and Prevention*, CDC) immer neue Fälle von AIDS [7], doch erst 1983 wurde die Ursache für diese Erkrankung entdeckt. Es wurde ein sich auf T-Zelllinien vermehrendes T-lymphotropes Virus identifiziert und wiederholt aus Patienten im Vor-AIDS- und AIDS-Stadium isoliert [8, 9]. Zunächst als humanes T-lymphotropes Virus-III (HTLV-III) oder Lymphadenopathie-assoziiertes AIDS Virus (LAV) bezeichnet [8, 10], wurde 1986 eine Umbenennung des Erregers in HIV [11] vorgeschlagen, die dann auch offiziell vom Internationalen Komitee für die Taxonomie von Viren (engl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) angenommen wurde.

1986 wurde in einem senegalesischen Patienten ein neues HI-Virus isoliert [12], zunächst LAV II benannt und später vom ICTV in HIV-2 umbenannt. HIV wurde analog hierzu in HIV-1 umgetauft.

Für die Entdeckung von HIV als auslösendes Agens für AIDS bekamen Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi 2008 den Nobelpreis für Medizin verliehen.

2.1.2 Klassifikation und Vergleich von HIV-1 und HIV-2

HIV-1 wird aufgrund phylogenetischer Kriterien in vier Gruppen unterteilt (Abbildung 1): M (Abkürzung für engl. *Main* oder *Major*, Haupt-), O (Abkürzung für engl. *Outlier*, Sonderfall) [13, 14], N (Abkürzung für engl. *New* oder *non M-non O*, neu oder nicht M-nicht O) [15] und P [16]. Letztere wurde P benannt, da die Nomenklatur bei der Entdeckung neuer Gruppen alphabetisch fortgeführt werden sollte [17].

Während die Hauptgruppe M dominiert und die Ursache der weltweiten Pandemie ist, kommen die Gruppen O, N und P nur sehr sporadisch vor [18]. Die Gruppe M wird weiterhin aufgrund der genetischen Diversität und der geographischen Verteilung in die Stämme A-K unterteilt, wobei HIV-1C v.a. in Indien, China und der Subsahara vorkommt und der am häufigsten vertretende Stamm weltweit ist. HIV-1B ist dagegen v.a. in Nordamerika und Europa verbreitet. HIV-2 wird in die Subtypen A-H unterteilt.

Der Ursprung von HIV-1 und HIV-2 wird stark diskutiert. Hierbei steht die Theorie im Vordergrund, dass beide auf verschiedene SIV-Stämme als Vorläufer zurückzuführen sind, die als Zoonose von Affen auf den Menschen übertragen worden sind und sich an den menschlichen Wirt adaptiert haben. Unklar ist, wie genau diese Begebenheiten stattgefunden haben. Ursachen könnten der Verzehr von Affenfleisch (v.a. in Afrika) gewesen sein, wodurch sowohl SIV von Affen auf den Menschenaffen als auch auf den Menschen übertragen wurde. SIV der Rauchmangaben (engl. *Sooty manglebey*, *Cercocebus atys*, SIVsm) gilt als gesicherter Vorläufer von HIV-2 [19]. Hierfür sprechen die identische Genomstruktur (auch das Vorhandensein des *vpx* Gens), die enge phylogenetische Verwandtschaft, die geographische Koinzidenz zwischen dem natürlichen Habitat von mit SIVsm infizierten Rauchmangaben und den Gebieten, in denen HIV-2 endemisch vorkommt sowie plausible Transmissionsrouten wie der Verzehr von Affenfleisch oder das Halten von Affen als Haustieren. Für HIV-1 gilt SIV der Schimpansen (engl. *Chimpanzee*, *Pan troglodytes*, SIVcpz) als gesicherter Vorläufer [20].

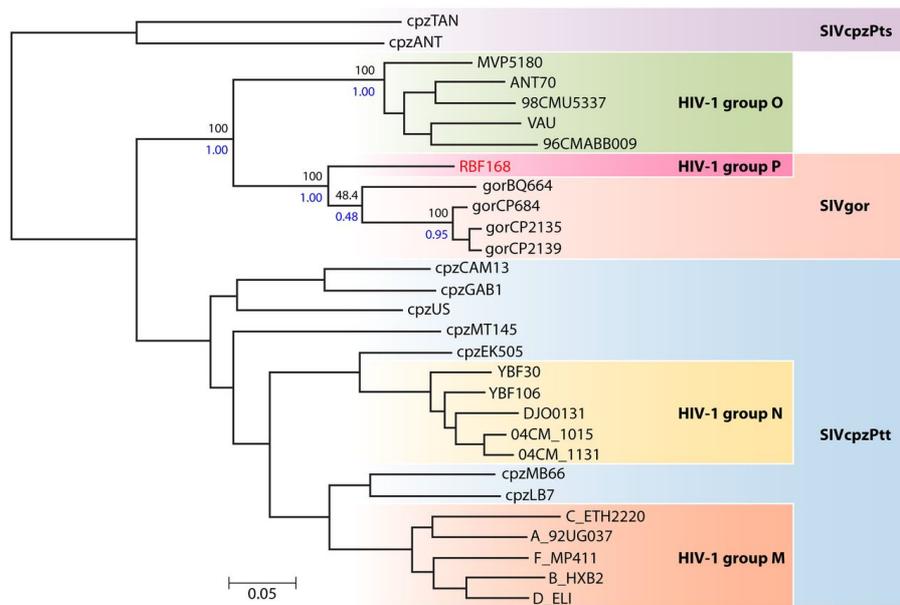


Abbildung 1: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen HIV-1, SIVcpz und SIVgor. Dargestellt ist ein phylogenetischer Baum, der die evolutionären Beziehungen zwischen den Gruppen von HIV-1 und den dazugehörigen SIV-Stämmen veranschaulicht. gor, Gorilla; cpz, Schimpanse (Plantier 2009).

HIV-1 und HIV-2 teilen die meisten strukturellen und biologischen Eigenschaften, wie z.B. den Tropismus für CD4 exprimierende Zellen und die Fähigkeit AIDS auszulösen, unterscheiden sich jedoch stark in ihren genetischen Komponenten bezüglich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen mit lediglich 42% Homologie [21].

HIV-2 ist weniger pathogen als HIV-1. Bei einer Infektion mit HIV-2 kommt es im Vergleich zu einer Infektion mit HIV-1 zu einem verzögerten Ausbrechen von AIDS und damit zu einer verlängerten Lebensdauer [22, 23]. Dieses hat verschiedene Ursachen; eine davon ist die geringere Viruslast im Blut und in Körperflüssigkeiten nach Infektion mit HIV-2 im Vergleich zu der mit HIV-1 [24, 25]. Dieses erklärt ebenfalls die in epidemiologischen und mathematischen Studien gezeigte niedrigere Übertragungsrate von HIV-2 [26] und seine geringere Replikationsrate in infizierten Zellen [27]. Eine stärkere Immunantwort des Wirts, wie sie sich v.a. in der vermehrten Produktion von neutralisierenden Antikörpern und der effizienteren T-Zell-Helfer-Antwort widerspiegelt, trägt zur effektiven Kontrolle der HIV-2 Replikation bei [28].

2.1.3 Weltweite Verbreitung

Laut dem 2013 veröffentlichten Bericht des Gemeinsamen Programms der Vereinten Nationen zu HIV/AIDS (engl. *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*, UNAIDS) über die weltweite Verbreitung von AIDS [1] gab es 2012 35,3 Millionen Erwachsene und Kinder mit HIV. Das sind einige Millionen mehr als noch 2001. Dieses ist jedoch kein Zeichen von einem Anstieg an Neuinfektionen, sondern einer verlängerten Lebensdauer trotz HIV-Infektion aufgrund deutlich verbesserter antiretroviraler Therapiemöglichkeiten. Die Zahl der neu infizierten Personen weltweit sank von 3,4 Millionen im Jahr 2001 auf 2,3 Millionen in 2012. Auch die Anzahl der Todesfälle aufgrund von AIDS sank von 2,3 Millionen im Jahr 2005 auf 1,6 Millionen im Jahr 2012.

2.1.4 Übertragung

Die ersten epidemiologischen Studien in den Achtzigerjahren offenbarten, dass die meisten HIV-Infizierten zu einer oder mehreren der folgenden Risikogruppen gehören: Homosexuelle/Bisexuelle, Drogenabhängige und Hämophilie-Patienten [29]. Dieses zeigt, dass die Hauptübertragungswege für HIV sexueller Kontakt und Blut sind. Am häufigsten wird HIV über die Schleimhaut durch ungeschützten Geschlechtsverkehr übertragen, bei dem in Samen- oder Vaginalflüssigkeit befindliches Virus über die Schleimhaut der Geschlechtsorgane oder des Rektums der Individuen ausgetauscht wird. Zu Anfang nahm man an, dass nur homosexuelle Männer betroffen seien, doch schnell wurde klar, dass die Übertragung auch bei heterosexuellem Geschlechtsverkehr möglich ist [30, 31].

Auch über Blut und Blutprodukte, v.a. im Rahmen von Bluttransfusionen ist eine Infektion möglich [32]. Hiervon waren besonders die Patienten mit Hämophilie vor 1985 betroffen, als das Donorblut noch nicht routinemäßig auf HIV-1 getestet worden ist. Ab 1989 werden Blutspenden auch auf HIV-2 untersucht. Drogenabhängige, die sich dieselben Spritzen

teilen, infizieren sich auch über Blutkontamination der Nadeln mit HIV, da Drogen wie z.B. Heroin intravenös verabreicht werden [33].

Eine weitere mögliche Transmissionsroute ist die vertikale Übertragung von der Mutter auf das Neugeborene. Dieses kann während der Schwangerschaft über die Plazenta, im Verlauf der Geburt über Blut oder während der Stillzeit über die Milch erfolgen [34-36]. Im alltäglichen Umgang wird das Virus nicht übertragen [37].

2.1.5 Klinik und Pathogenese

Die HIV-Infektion verläuft ohne Behandlung klassisch dreiphasig (Abbildung 2) [38]. Nach einigen Tagen bis wenigen Wochen nach der Infektion kommt es in den meisten Fällen zu einer akuten Krankheitsphase, die bis zu vier Wochen anhalten kann und in der es zu grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit, Lymphadenopathien, Gewichtsverlust und Myalgien kommen kann [39]. Sie ist gekennzeichnet durch eine generelle Immunaktivierung und hohe Viruslast mit Erreichen der Spitzenvirämie (engl. *peak viremia*). Zudem kommt es zu einem massiven Verlust von CD4⁺ T-Zellen, v.a. in der Mukosa des Darms, was zuerst im SIV-Modell an Rhesusaffen gezeigt wurde [40, 41] und für HIV bestätigt wurde [42-44]. Anschließend folgt die chronische Phase, die weitgehend symptomfrei verläuft und sich über mehr als 10 Jahre hinziehen kann. Die CD4-Zellzahlen steigen im Blut wieder an und erreichen eine Plateauphase unter dem Ausgangswert, wohingegen die CD4-Zellen im Darm sich nicht wieder erholen. Die Viruslast sinkt ab und bleibt stabil, ist aber weiterhin messbar. Die Immunaktivierung bleibt chronisch erhöht.

Die Infektion mündet schließlich in das AIDS-Stadium, das geprägt ist von AIDS-definierenden opportunistischen Erkrankungen wie *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonien, Enteritiden, Parasitosen, mukosalen Candidosen und malignen Tumoren, die nach wenigen Wochen bis Monaten zum Tode führen. Durch die chronische Immunaktivierung ist das Immunsystem erschöpft, CD4-Zellzahlen fallen im Blut massiv ab und auch die Viruslast steigt wieder an.

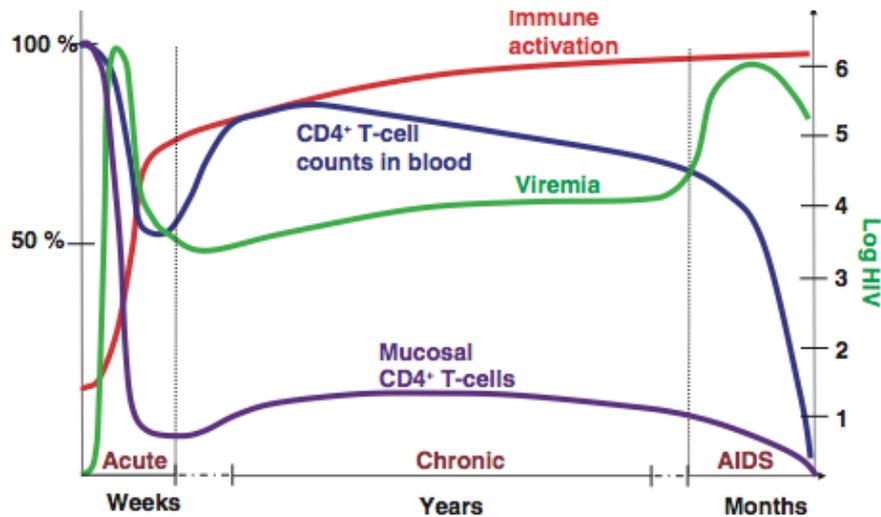


Abbildung 2: Klassischer dreiphasiger Verlauf der HIV-Infektion. Auf der x-Achse ist die Zeit nach der Infektion aufgetragen und auf der y-Achse die Veränderungen der Viruslast im Plasma, der CD4⁺ T-Zellen im Blut sowie mukosalen Geweben und des Grades der Immunaktivierung im Verlauf der HIV-Infektion (Grossman 2006).

2.1.6 Therapie

Eine lebenslange Kontrolle von HIV ist dank der 1995 eingeführten antiretroviralen Therapie basierend auf der Kombination verschiedener Medikamente (engl. *combined antiretroviral therapy*, cART) möglich, die in den letzten Jahrzehnten zahlreichen Veränderungen und Optimierungen unterworfen war und erfolgreicher als eine Monotherapie ist [45-48].

Die verschiedenen Substanzklassen sind nach der jeweiligen Struktur benannt, gegen die sie im Replikationszyklus gerichtet sind. So gibt es die Reverse-Transkriptase (RT)-Inhibitoren (nicht-nukleosidisch und nukleosidisch), die das Enzym für die Reverse Transkription von RNA in DNA blockieren, Proteaseinhibitoren, die verhindern, dass das Gag-Pol-Polyprotein gespalten wird und somit infektiöse Viruspartikel entstehen und Viruseintritt-Inhibitoren, die an verschiedenen Zeitpunkten der Infektion das Virus am Eintritt in die Zelle hindern. Neuere Substanzklassen sind die Integrasehemmer, die den Einbau des Virus in das Genom der Zielzelle hemmen und CCR5-Antagonisten (engl. *C-C Chemokine*

Receptor, CC-Motiv-Rezeptoren), die den essentiellen Korezeptor zum Eintritt in die Zielzellen blockieren.

Unter erfolgreicher cART gelangt die Viruslast unter die Nachweisgrenze und der Patient erreicht im besten Fall eine fast vollständige Immunrekonstitution ohne das Auftreten opportunistischer Infektionen. Jedoch sind diverse unerwünschte Wirkungen, wie z.B. gastrointestinale Nebenwirkungen oder Lipodystrophie bei einer lebenslangen Therapie bekannt [49] und auch das Auftreten von Resistenzen, v.a. bei ungenügender Kompliance des Patienten erschwert die Effektivität der Behandlung. Obwohl man durch die antiretrovirale Therapie nahezu die gleiche Lebenserwartung hat wie ein gesunder Mensch, ist eine vollständige Eradikation des Virus aus dem Körper kaum möglich. Hierfür gibt es nur das Beispiel des „Berliner Patienten“, das jedoch eine Ausnahme bildet [50].

2.1.7 Impfstoffentwicklung

Eine der größten Herausforderungen der HIV-Forschung liegt in der Entwicklung einer effizienten Vakzine. Hierbei gibt es verschiedene Ansatzmöglichkeiten, die entweder die humorale Immunantwort und hier speziell neutralisierende Antikörper oder die zelluläre Immunantwort basierend auf zytotoxischen Gedächtnis-T-Zellen stimulieren.

Viele Hindernisse stehen einer erfolgreichen optimalen prophylaktischen Vakzine im Weg, die vor einer Infektion schützen würde. Daraus resultierend könnte ein möglicher Ansatz sein, eine suboptimale Vakzine zu entwickeln, die zwar nicht vor der Infektion schützt, aber die es schafft, eine lebenslange Immunkontrolle des Virus *post infectionem* (nach Infektion, pi) zu erreichen [51]. Die weltweit hohe Diversität von HIV-1, seine Fähigkeit sich der Immunabwehr zu entziehen und sich in der proviralen Form latent in schwer zugänglichen Reservoiren zu verbergen sowie das Unvermögen des Wirtskörpers effektive neutralisierende Antikörper zu produzieren, werden es auch in der Zukunft schwer machen, einen wirksamen Impfstoff zu entwickeln und auf den Markt zu bringen.

2.2 SIV und das SIV-Makakenmodell als Modell für die HIV-Infektion des Menschen

Die SIV-Infektion der RM stellt das wichtigste Tiermodell für die Erforschung der HIV-Infektion des Menschen dar [2].

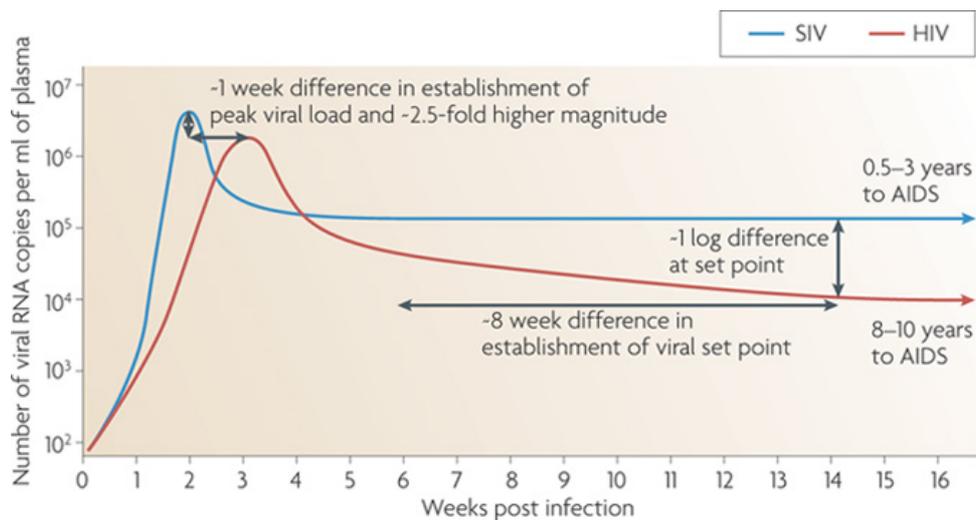
Erste Berichte von Makaken mit schweren Immundefizienzen gab es Anfang der Achtzigerjahre in einer Zuchtgruppe im *New England Regional Primate Research Center* [52]. 1985 wurde dann von dort das ursächliche Agens isoliert und ähnlich der damaligen Nomenklatur für das menschliche Virus als Affen-T-Lymphotropes Virus Typ III (engl. *simian T-lymphotropic virus*, STLV-III) deklariert [53]. Später wurde es analog zu HIV in SIV umbenannt [11].

Spezies-spezifische SIV konnten bis heute aus 41 verschiedenen afrikanischen Primatenspezies isoliert werden [54]. Dabei werden diese Spezies als natürliche Wirte angesehen, da sie in den Individuen nur in den seltensten Fällen AIDS verursachen, ungeachtet der Tatsache, dass z.T. hohe Viruslasten im Blut nachgewiesen werden können [55]. Jüngere Forschungsergebnisse zeigten jedoch eine erhöhte Anzahl von pathogenen Verläufen bei freilebenden, mit SIVcpz infizierten Schimpansen. Symptome sind hier eine gestiegene Mortalität und Jungtiersterblichkeit sowie eine verringerte Fruchtbarkeit bei Weibchen [56].

Kommt es zu einer Übertragung von einem SIV-Stamm einer Primatenspezies auf eine andere, so kann es zu pathogenen Verläufen kommen. Bei asiatischen Primatenspezies wie z.B. dem RM kommt eine natürliche SIV-Infektion nicht vor. Experimentell lassen sich RM jedoch infizieren und aufgrund des infektiionsbedingten Krankheitsbildes, das dem der menschlichen HIV-Infektion sehr ähnlich ist, stellen sie ein geeignetes Modell zur Erforschung des HIV dar.

Die ersten Versuche einer erfolgreichen experimentellen Infektion von Makaken mit SIV gab es 1985 im *New England Regional Primate Research Center* [57].

Einige Aspekte im zeitlichen Verlauf sind jedoch unterschiedlich bei der HIV-Infektion des Menschen und der SIV-Infektion der RM (Abbildung 3). Bei SIV-infizierten Makaken, ist die Gesamtdauer der Infektion kürzer. Es kommt bereits eine Woche früher zur Spitzenvirämie als bei HIV-infizierten Menschen und auch die Viruslast ist im Schnitt 2.5-fach höher [58]. Ein entscheidender Unterschied ist auch die Dauer der chronischen Phase bis zum Ausbruch von AIDS; diese beläuft sich bei SIV auf ca. ein bis drei Jahre, beim Menschen dagegen auf acht bis zehn Jahre [58].



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 3: Virale Kinetik von SIV und HIV im Vergleich. Auf der x-Achse sind die Wochen nach HIV-/ und SIV-Infektion aufgetragen und auf der y-Achse die Anzahl der viralen Kopien/ml Plasma (Shedlock 2009).

2.3 Struktur von HIV und SIV

2.3.1 Morphologie

Der Durchmesser eines HIV- bzw. SIV-Viruspartikels beträgt ca. 130nm. Eine Lipiddoppelmembran umgibt das zylindrisch geformte Kapsidprotein p24 (bei SIV p27) [59], das die RNA als zwei identische Kopien enthält. Eine schematische Darstellung des HIV-Virions ist in Abbildung 4 gezeigt. In der Lipiddoppelmembran, die sich das Virus bei dem Vorgang der Knospung beim Virusaustritt von der Wirtszelle aneignet, befindet sich das 10nm große Glykoprotein gp160, welches proteolytisch in den extrazellulären Teil gp120 (bei SIV gp130) und den transmembranen Teil gp41 gespalten wird. Das p17-Matrixprotein ist an der Innenseite der Virushülle verankert [59]. Die RNA liegt gebunden an das Nukleoprotein p7 und die Reverse Transkriptase p66 vor. Weitere wichtige Enzyme sind p32, die Integrase und p11, die Protease.

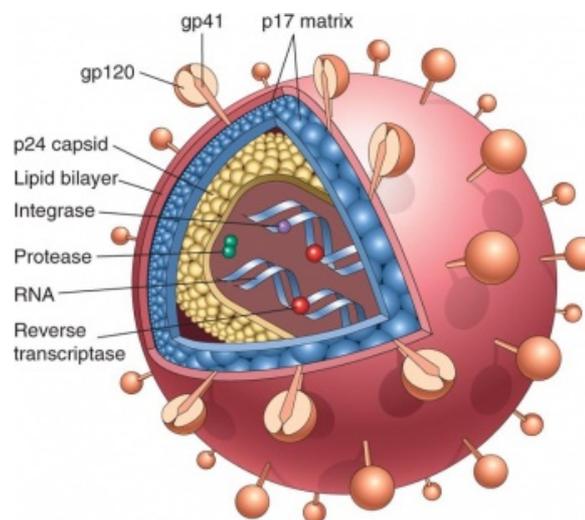


Abbildung 4: Morphologie von HIV. Dargestellt ist der Aufbau eines infektiösen HIV-Virions. Eine Lipiddoppelmembran umgibt das p17 Matrixprotein, das p24 Kapsidprotein, die RNA und die Enzyme Integrase, Protease und Reverse Transkriptase. Das externe Glykoprotein gp120 und das transmembran verankerte Glykoprotein gp41 befinden sich auf der Virushülle. p, Protein; gp, Glykoprotein (Kumar 2007).

2.3.2 Genomische Organisation

Im Vergleich zu anderen Retroviren ist das Genom der Lentiviren sehr komplex. Neben den Genen *gag* (engl. *group-antigen*), das für Matrix- und Nukleokapsidproteine kodiert, *pol* (engl. *polymerase*), das für die Polymerase kodiert und *env* (engl. *envelope*), welches für die Hüllproteine kodiert, haben sie zusätzlich fünf bis sechs akzessorische Gene (Abbildung 5).

Diese sind *tat* (engl. *transactivator of transcription*), *rev* (engl. *regulator of expression of viral proteins*), *vif* (engl. *virion infectivity factor*), *vpu* (engl. *viral protein u*), *vpx* (engl. *viral protein x*), *nef* (engl. *HIV-1 negative factor*) und *vpr* (engl. *viral protein r*). HIV-1, HIV-2 und SIVmac besitzen *tat*, *rev*, *vif*, *vpr* und *nef*. Das *vpx*-Gen besitzen HIV-2 und SIVmac, wohingegen HIV-1 über *vpu* verfügt.

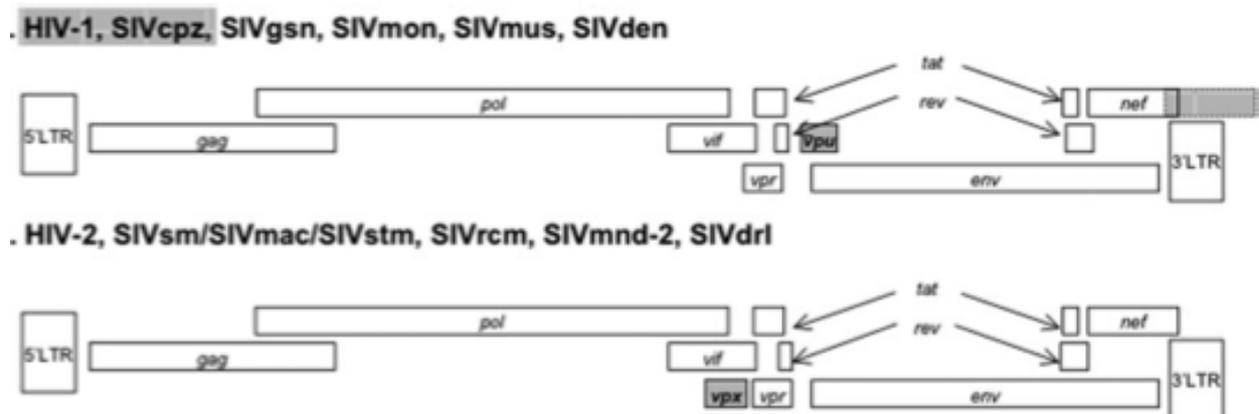


Abbildung 5: Genomische Organisation der verschiedenen HIV- und SIV-Stämme. In der oberen Abbildung ist die genomische Organisation von HIV-1 und eng verwandten SIV-Stämmen gezeigt, wohingegen die untere Abbildung der genomischen Organisation von HIV-2 und verwandten SIV-Stämmen gewidmet ist. LTR, *Long Terminal Repeat*; cpz, Schimpanse; gsn, *Greater Spot-nosed monkey*; mon, *Mona monkey*; mus, *Mustached Guenon*; den, *Dent's Mona monkey*; sm, Graue Halsbandmangaben; mac, Rhesusmakaken; stm, *Stump-tailed macaque*; rcm, Rotkappen Mangaben; mnd-2, Mandrill; drl, *Drill* (Van de Woude 2006).

2.3.3 Vpr und Nef

Das **vpr** Gen kodiert für das virale Protein R (Vpr), das 14kDa (kiloDalton) groß ist und aus 96 Aminosäuren besteht. Die Funktionen von Vpr sind in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Vpr ist wichtig für die Replikation in Makrophagen [60] und wird spezifisch in reife Virionen inkorporiert, sodass es schon früh in der Infektion eine Rolle spielt. Zu den Aufgaben gehört der Import von viraler DNA in Form des Präintegrationskomplexes in den Zellkern [61], wo das virale Genom dann in das zelluläre Genom integriert wird. Zudem beeinflusst es die Genauigkeit des Prozesses der Reversen Transkription; in Abwesenheit von Vpr ist die Mutationsrate bei der Reversen Transkription bis zu vierfach erhöht [62]. Weiterhin ist Vpr wichtig für die Zellzyklus-Arretierung in der G2/M-Phase [63]. Dieses geschieht durch die Aktivierung des SLX4-Komplexes, was dazu führt, dass akkumulierte virale DNA prozessiert wird, was wiederum zu einer Vermeidung des Aufspürens durch die angeborene Immunantwort führt und letztlich Typ I Interferon-Antworten unterdrückt [64]. Frühere Infektionsexperimente mit SIV *vpr*-Mutanten in RM lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Gibbs *et al.* demonstrierten, dass es keine Unterschiede hinsichtlich der Virusbeladung, CD4-Zellverlust oder der Progression zu AIDS zwischen SIVmac239 Wildtyp-infizierten RM und RM, die mit *vpr*-Deletionsmutanten infiziert worden sind, gab [65]. In anderen Studien schienen *vpr*-Mutanten in infizierten RM teilweise zu einer niedrigeren Viruslast und einer langsameren Progression zu AIDS zu führen [66, 67].

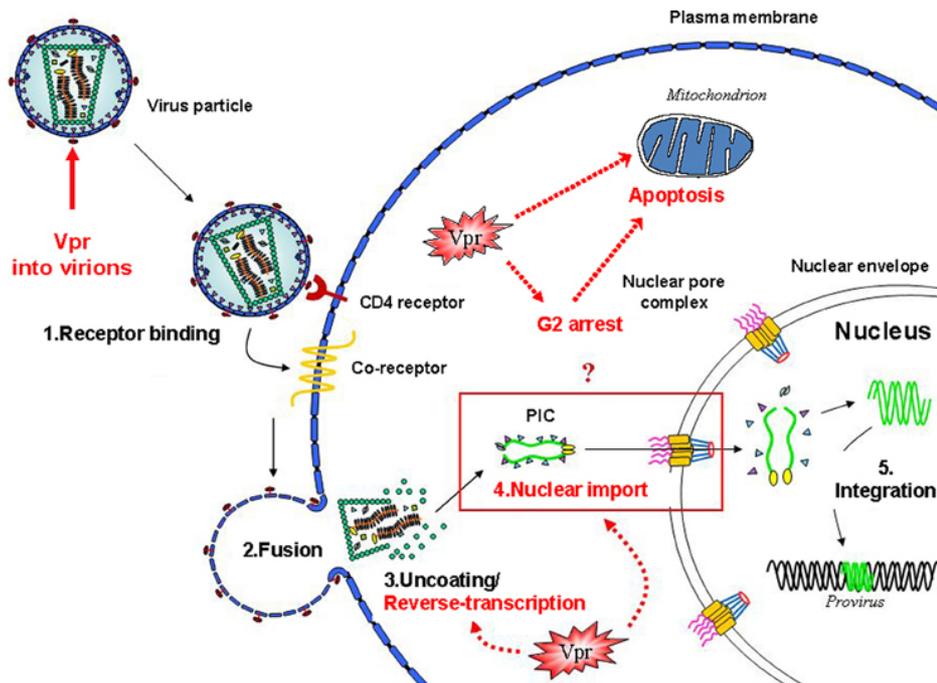


Abbildung 6: Funktionen von Vpr im viralen Lebenszyklus. Schematisch in rot hervorgehoben sind die verschiedenen Funktionen von Vpr im viralen Lebenszyklus. PIC, Präintegrationskomplex (Günzel 2014).

Das *nef* Gen kodiert für das gleichnamige Protein. Dieses ist bei SIVmac 34kDa groß und ist essentiell für die Aufrechterhaltung von hohen Viruslasten und der Ausbildung der vollen Pathogenität, was zuerst im Rhesusaffen-Modell gezeigt wurde [68]. Dass Nef wichtig für die Pathogenese und Krankheitsprogression ist, ließ sich auch bei Menschen beweisen, die mit *nef*-defekten Formen von HIV-1 infiziert waren. Sie entwickelten nur langsam oder gar nicht AIDS [69, 70].

Nef übt zahlreiche komplexe Funktionen aus, die von der Modulation von verschiedenen Oberflächenproteinen über die Manipulation der Antigenpräsentation und der Signaltransduktion reichen. Viele Funktionen von Nef dienen dazu, dass virusinfizierte Zellen später oder gar nicht vom Immunsystem erkannt werden und somit für das Virus ein Umfeld geschaffen wird, in dem effizient weitere infektiöse Virionen produziert und verbreitet werden können. Dazu gehört v.a. die Modulation der Zelloberflächenexpression verschiedener Moleküle. Als wichtigstes hierzu zählt die Herabregulierung von CD4 [71, 72], die dazu führt,

dass infizierte Zellen vor einer Superinfektion geschützt sind [73, 74]. Zudem wird die Antigenpräsentation durch Herabregulierung von MHC (engl. *major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex) -Klasse-I-Molekülen gestört, was die infizierte Zelle vor der Erkennung und Eliminierung durch zytotoxische T-Zellen bewahrt [75, 76].

Ebenfalls eingegriffen wird in die Regulation des mit CD3 komplexierten TCR, der ebenfalls herabreguliert wird [77]. Das Nef Protein von Virus-Stämmen wie HIV-1 und eng verwandten SIVs (SIVcpz, SIVgsn, SIVmus, SIVmon), die im Laufe der Evolution *vpu* erworben haben, haben jedoch diese spezifische Fähigkeit verloren [78]. Das führt zu dem Unvermögen, die T-Zell-Aktivierung zu blockieren und somit möglicherweise zu einer erhöhten Immunaktivierung und daraus resultierendem Zelltod (AICD, engl. *activation induced cell death*). Es wird angenommen, dass dieser Defekt die gesteigerte Pathogenität von HIV-1 im Vergleich zu HIV-2 bedingt. Zudem ist zu diskutieren, ob dies dem direkten Vorläufer von HIV-1 zu einer erhöhten Virulenz verholfen hat und diesen dazu prädisponiert hat, auf den Menschen übertragen zu werden [78]. Das gleiche Muster lässt sich auch für CD28 anwenden [77, 79], das als Rezeptor für das essentielle kostimulierende Signal durch Bindung an CD80 auf Antigen-präsentierenden B-Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APC) dient und somit ebenfalls naive T-Zellen aktiviert. Auch hier ist bei einer fehlenden Herabregulierung bei HIV-1 und verwandten SIVs eine Verstärkung der T-Zellaktivierung zu beobachten [78].

Bei natürlichen, nicht-pathogenen SIV-Infektionen, wie z.B. bei SIVagm der Afrikanischen Grünen Meerkatzen (AGM) kann Nef effizient TCR-CD3 herunterregulieren. Dieses führt (neben anderen Mechanismen) auch dazu, dass ihre Ansprechbarkeit auf Aktivierung und somit die chronische Immunaktivierung und AICD ausbleibt. Somit wird eine kontinuierliche Virusreplikation und Persistenz gewährleistet, bei der Virus und Wirt im Gleichgewicht koexistieren. Bei Tieren, die trotz der natürlichen SIV-Infektion nur niedrige CD4-Zellzahlen aufwiesen, wurde gezeigt, dass diese auch eine ineffiziente TCR-CD3 Herabregulierung hatten [78]. Letzteres korreliert mit dem Verlust von CD4-Zellen [80] und der erhöhten Immunaktivierung [81].

Das pathogene SIVmac-Rhesusaffenmodell unterscheidet sich von der natürlichen SIV-Infektion, obwohl beide die Fähigkeit besitzen, durch Nef die T-Zell-Aktivierung zu hemmen. Die Infektion der RM resultiert jedoch in einer chronischen Immunaktivierung und AIDS, was bedeutet, dass die TCR-CD3 Herabregulierung nicht allein ausreicht eine Krankheit zu verhindern. Eine effiziente TCR-CD3 Herabregulierung schützt somit nicht generell vor einer Progression zu AIDS, was in SIVmac-infizierten RM [68] und HIV-2-infizierten Menschen gezeigt wurde [81]. Die Inokulation von Rauchmangaben mit SIVmac (entstanden aus dem natürlichen SIVsm) führte zu keiner pathogenen Infektion [82], was darauf hindeutet, dass die Virulenz eher in der Wirtsspezies begründet liegt als in dem Virusstamm selbst.

Eine Studie, in der eine *nef*-Mutante erzeugt wurde, die TCR-CD3 herabregulieren kann, jedoch nicht mehr CD4 und MHC-Klasse-I-Moleküle, war in infizierten RM stark attenuiert [83].

2.3.4 Replikationszyklus

Ein Schema des viralen Replikationszyklus ist in Abbildung 7 verdeutlicht.

Schon früh wurde gezeigt, dass beim Eintritt von HIV oder SIV in die Zielzelle das Oberflächenprotein CD4, das v.a. auf T-Lymphozyten, aber auch auf Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen vorhanden ist, als primärer Rezeptor fungiert [84, 85]. Dieser reicht jedoch für eine effiziente Infektion der Zelle nicht aus; weitere Experimente identifizierten CXCR4 (CXC-Motiv-Rezeptor) [86] und CCR5 [87-89] als notwendige Korezeptoren. Dabei dominieren in Dendritischen Zellen und Makrophagen CCR5 und in aktivierten T-Zellen CXCR4, was u.a. den jeweiligen Zelltropismus bedingt. Individuen mit einem homozygoten *CCR5*-Gendefekt sind resistent gegenüber M-tropen Immundefizienzviren [90].

Gp120 bindet beim Eintritt an CD4 und verursacht Konformationsänderungen im Glykoprotein, die eine Interaktion mit den jeweiligen Korezeptoren ermöglichen. Dieses ist die Voraussetzung für die nachfolgende Fusion der Virusmembran mit der

Wirtszellmembran, bei der gp41 eine zentrale Rolle spielt [91]. So gelangt das Viruskapsid ins Innere der Wirtszelle und nach dem Entleeren des viralen Genoms (engl. *Uncoating*) in das Zytoplasma findet die Reverse Transkription statt. Dabei wird die virale einsträngige RNA zunächst in doppelsträngige provirale DNA umgeschrieben, die in nicht-integrierter Form vorliegt. Erst nach einer Aktivierung der Zelle wird diese dann in den Zellkern transportiert und in die DNA der Wirtszelle integriert. In diesem Stadium kann es zu einer latenten Infektion kommen, die über Jahre verdeckt vorliegen kann. Es kann aber auch zu einer produktiven Infektion mit Transkription des proviralen Genoms und anschließender Translation in die einzelnen Virusproteine und der Produktion neuer Virionen kommen, die sich anschließend von der Wirtsmembran abschnüren (engl. *Budding*) und in die Reifung übergehen.

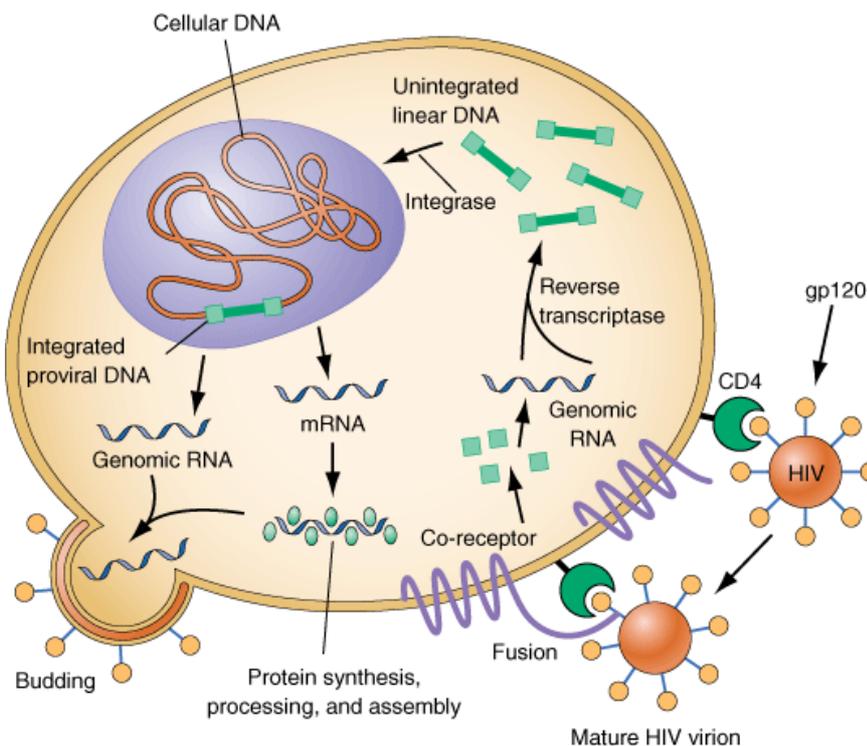


Abbildung 7: Replikationszyklus von HIV. Schematisch dargestellt ist der virale Replikationszyklus von HIV. mRNA, messenger RNA (Fauci 2008).

2.4 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist das biologische Abwehrsystem, um den Organismus vor Krankheitserregern oder schädigenden Substanzen zu schützen. Es stellt ein komplexes Zusammenspiel zwischen verschiedenen Zelltypen und Molekülen dar. Man unterscheidet zwischen der angeborenen und der erworbenen/adaptiven Immunantwort.

Die angeborene Immunantwort reagiert sehr schnell auf ankommende Pathogene, ist dabei aber unspezifisch. Das erworbene Immunsystem reagiert hingegen spezifisch und gezielt auf bestimmte Antigene. Beim ersten Kontakt mit einem Antigen dauert die Entwicklung der erworbenen Immunantwort wesentlich länger als die angeborene Immunantwort. Bei einem erneuten Kontakt ist die Reaktion jedoch effizient und schnell, da das Immunsystem auf ein immunologisches Gedächtnis zurückgreifen kann. In vielen Fällen ist sogar eine lebenslange Immunität möglich. Das angeborene und das adaptive Immunsystem umfassen zelluläre Immunantworten, vermittelt durch verschiedene Typen von Leukozyten. Zusätzlich gibt es bei dem erworbenen Immunsystem die humorale Immunantwort, die auf der Bildung von Antikörpern durch B-Zellen basiert.

2.4.1 Zellvermittelte Immunantwort

T-Zellen stellen eine Subpopulation von Lymphozyten dar. Sie sind für die zellvermittelte Immunantwort der adaptiven Immunität verantwortlich. Bei der klonalen Selektion im Thymus wird ein Repertoire von **naiven T-Zellen** gebildet, die eine Vielzahl verschiedener spezifischer Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen, ihrem Antigen aber noch nicht begegnet sind. So stellt das Immunsystem eine Auswahl von T-Zellen, die unterschiedlichste Antigene erkennen können. Trifft eine reife naive T-Zelle auf eine APC, die ihr spezielles Antigen als Peptidfragment über den MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Komplex auf der Oberfläche exprimiert, wird diese T-Zelle aktiviert, vermehrt sich und differenziert zu einer **Effektorzelle**. Dabei wird zwischen zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen unterschieden.

Zytotoxische T-Zellen exprimieren das Oberflächenprotein CD8, erkennen virusinfizierte Zellen und eliminieren diese gezielt. Sie binden über den CD8-Rezeptor an MHC-Klasse-I-Moleküle, an die virale Peptide gebunden sind. Fast alle Zellen exprimieren diesen MHC-Typ. Die Zytotoxizität wird u.a. durch die von den T-Zellen gebildeten Proteine Perforin und Granzym B vermittelt.

Unterteilt werden die Helferzellen in **T_H1-Zellen**, die v.a. Makrophagen aktivieren und **T_H2-Zellen**, die B-Zellen stimulieren, sodass letztere proliferieren und differenzieren, um Antikörper zu produzieren. Der auf der Oberfläche befindliche CD4-Rezeptor bindet dabei an MHC-Klasse-II-Moleküle. Diese sind auf spezialisierten Zellen wie B-Zellen, Dendritischen Zellen und Makrophagen vorhanden. Zytotoxische T-Zellen und T_H1-Zellen produzieren diverse Zytokine, z.B. Interferon (IFN)- γ , das direkt die virale Replikation hemmt und Makrophagen gezielt zu Infektionsherden lenkt [92]. Andere wichtige T-Helferzellen sind Th17-Zellen im Intestinaltrakt und T_{FH}-Zellen in lymphoiden Geweben.

Th17-Zellen sind die wichtigsten Helferzellen in mukosalen Geweben zur Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität. Dieses wird durch die Produktion von Interleukin (IL)-17 vermittelt, das durch Hochregulierung von verschiedenen Claudinen enge Verbindungen ausbildet [93] und durch die Hochregulierung der Expression von β -Defensin mikrobielle Produkte bekämpft [94]. Studien an SIV-infizierten Rhesusaffen haben gezeigt, dass eine Depletion von Th17-Zellen mit einer systemischen Translokation von Bakterien wie Salmonellen durch die Darmbarriere assoziiert ist [95].

T_{FH}-Zellen sind zum ersten Mal im Jahr 2000 als eine CXCR5⁺ T-Zellpopulation in Lymphfollikeln beschrieben worden [96]. Sie sind essentiell für die Bildung von Keimzentren (engl. *germinal centers*, GC) in lymphoiden Organen, in denen sie Hilfe für Antigen-spezifische B-Zellen liefern. Somit sind sie für die Generation von hochaffinen und spezifischen langlebigen Plasmazellen wichtig [97].

2.4.2 Humorale Immunantwort

Die humorale Immunantwort basiert im Gegensatz zu der zellulären Immunantwort auf nicht-zellulären Bestandteilen, die im Blut und extrazellulären Flüssigkeiten zu finden sind. Damit gemeint sind die Antikörper, die von ausdifferenzierten Plasmazellen produziert werden.

2.4.3 B-Zellen

B-Zellen entstehen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks (KM). **Unreife B-Zellen** tragen wie alle lymphoiden unreifen Zellen CD10 auf der Oberfläche [98], sowie die typischen B-Zell-Marker CD19 und CD20 und ein vollständiges Immunglobulin (Ig) Molekül. Sie verlassen das KM und entwickeln sich durch weitere Differenzierungsschritte zu **naiven reifen B-Zellen**, die CD10 verlieren, jetzt jedoch IgM und IgD auf der Oberfläche tragen. Zusätzlich ist CD21 auf der Oberfläche vorhanden und auch CXCR5, das den naiven B-Zellen als Chemokinrezeptor zum Eintritt in lymphoide Gewebe dient. Sie zirkulieren zwischen Blut und lymphoidem Gewebe, v.a. LN bis sie ihr spezifisches Antigen treffen. Ist dieses geschehen, migrieren sie zu GC in lymphoiden Geweben, wo die weiteren Schritte der Proliferation und Affinitätsreifung stattfinden. Das Antigen bindet an den B-Zell-Rezeptorkomplex (engl. *B cell receptor complex*, BCR) und aktiviert die Zelle. Der BCR besteht aus einem Zelloberflächenimmunglobulin (bei der naiven reifen Zelle v.a. IgM), das spezifisch an das Antigen bindet. Damit assoziiert sind eine Ig α - (CD79a) und eine Ig β -Kette (CD79b) [99, 100], die nicht spezifisch für das Antigen sind und als Signalmoleküle fungieren. Zusätzlich wird das Antigen ins Zellinnere befördert, wo es prozessiert und an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden wird, die dann an der Oberfläche präsentiert werden. T_H2-Zellen können dieses erkennen und notwendige kostimulierende Signale liefern, die zur B-Zell-Aktivierung und Proliferation führen. Diese Antigene bezeichnet man als thymusabhängige Antigene, da nur durch die Hilfe der T-Zellen eine B-Zell-Reaktion hervorgerufen wird.

Es gibt jedoch auch thymusunabhängige Antigene, womit v.a. bakterielle Bestandteile wie Polysaccharide und Lipopolysaccharide (LPS) gemeint sind. Sie lösen im Körper eine T-Zell-unabhängige Antikörperreaktion aus. Nach Aktivierung der B-Zellen kommt es zur Proliferation, somatischen Hypermutation und zum Isotyp-/Klassenwechsel. Das führt zu einer höheren Spezifität und Effektorkapazität der Immunglobuline. Beim Isotypwechsel wird die Immunglobulinklasse gewechselt. Statt wie bei naiven B-Zellen IgM und IgD, werden nun IgA, IgG oder IgE exprimiert.

Die **Keimzentrums-B-Zellen** (GC-B-Zellen) entwickeln sich entweder zu Plasmablasten/Plasmazellen oder zu Gedächtnis-B-Zellen. Beide können Antikörper sezernieren, letztere jedoch nur in geringen Mengen. **Plasmablasten** sind im Gegensatz zu Plasmazellen noch teilungsfähig und kurzlebig. Sie differenzieren letztlich zu **Plasmazellen**, die hochspezialisierte Überlebensnischen im KM besetzen. Diese Zellen haben eine sehr lange Lebenszeit und liefern bei Bedarf hochaffine Antikörper. Beide Zelltypen haben den B-Zell-Marker CD20 verloren, exprimieren jedoch die klassischen Plasmazell-Marker CD38 und CD138. **Gedächtnis-B-Zellen** (engl. *memory B cells*) sind hochspezialisierte Zellen des immunologischen Gedächtnisses, die bei einem erneuten Kontakt mit ihrem Antigen sehr schnell reagieren und diese durch eine rasche Entwicklung zu Antikörper-sezernierenden Plasmablasten und Plasmazellen bekämpfen. Gedächtnis-B-Zellen teilen sich, wenn überhaupt, nur sehr langsam und exprimieren vornehmlich IgG oder IgA, sezernieren diese jedoch kaum. Sie haben zudem eine gesteigerte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen, die eine schnelle Präsentation der Antigene an T-Helfer-Zellen gewährleisten.

Sie tragen im Gegensatz zu Plasmazellen CD20 auf ihrer Oberfläche und exprimieren zusätzlich CD27. Es gibt verschiedene Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen; eine genaue phänotypische Charakterisierung dieser Zellen und Plasmablasten/Plasmazellen wird ausführlicher im Ergebnisteil dieser Doktorarbeit erfolgen.

2.4.4 Antikörper

Ein Antikörper (siehe Abbildung 8) ist ein Protein, das spezifisch an sein Antigen binden kann. Alle Antikörper gehören aufgrund ihrer besonderen Struktur zu der Familie der Immunglobuline. Sie können membrangebunden in Form des BCR vorliegen oder von Plasmazellen sezerniert werden. Funktionell besteht ein Antikörper aus einem Antigen-bindenden Teil (variable Region), der die Diversität und Spezifität des Antikörpers bedingt und einem Effektor-vermittelnden Teil (konstante Region). Strukturell besteht jeder Antikörper aus vier gepaarten leichten und schweren Polypeptidketten. Die zwei schweren Ketten sind in der konstanten Region über Disulfidbrücken miteinander verbunden. In der variablen Region bindet jede schwere Kette eine leichte und formt so zwei völlig identische Antigen-Bindungsstellen, die auch zwei Strukturen gleichzeitig binden können.

Es gibt fünf Hauptklassen von Immunglobulinen: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE.

IgM ist der erste gebildete Antikörper während einer Immunreaktion, da er schon auf naiven B-Zellen exprimiert wird und somit kein Klassenwechsel notwendig ist. Seine Affinität ist relativ gering; die Avidität bedingt durch seine Pentamerstruktur jedoch hoch. **IgD** wird während der B-Zellentwicklung zusammen mit IgM exprimiert, jedoch nach Antigenkontakt reduziert. Seine genaue Funktion ist bis heute unbekannt. Es kann IgM bei Bedarf in seiner Funktion ersetzen [101] und spielt eine Rolle bei der Immunabwehr im oberen Respirationstrakt [102]. **IgG** dominiert mengenmäßig im menschlichen Plasma. Diese Immunglobulinklasse ist durch Klassenwechsel entstanden, weist also eine hohe Affinität auf. **IgA** ist v.a. in mukosalen Geweben des Respirations- und Verdauungstraktes vorhanden. Es liegt normalerweise als Monomer vor, beim Transport durch Epithelien formt es sich jedoch zum Dimer. **IgE** ist an allergischen Reaktionen des Körpers beteiligt.

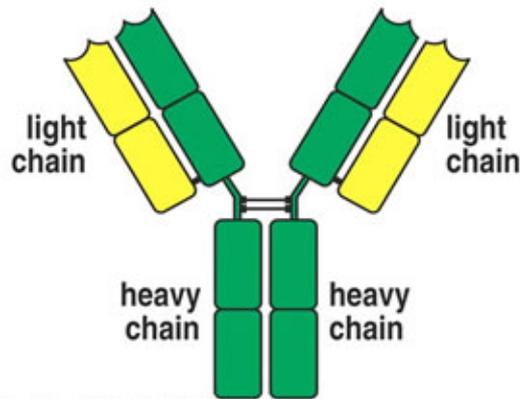


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls. Präsentiert ist eine schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls. In grün sind zwei schweren Ketten und in gelb die zwei leichten Ketten dargestellt (modifiziert nach Janeway, 2005).

Antikörper haben drei verschiedene Hauptaufgaben: Neutralisation, Opsonierung und Aktivierung des Komplementsystems.

Bei der **Neutralisation** binden Antikörper direkt an das Antigen, meistens bakterielle Toxine oder Viren, und schützen diese so vor schädlichen Wechselwirkungen mit den Zellen des Wirts. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird von Makrophagen aufgenommen und eliminiert. Die **Opsonierung** ist das Markieren von Antigenen durch Antikörper als körperfremd, um es Makrophagen zu ermöglichen, diese zu phagozytieren. Das ist bei vielen Bakterien von Bedeutung, die der direkten Erkennung durch Makrophagen entgehen. Durch die Opsonierung erkennen die Makrophagen nun die konstante Region des Antikörpers. Die dritte Funktion ermöglicht es bestimmten Plasmaproteinen des **Komplementsystems** an Antikörper zu binden, die an Antigene komplexiert sind, und somit diese direkt zu lysieren oder die Phagozytose durch Makrophagen zu stimulieren.

2.5 Auswirkungen von HIV/SIV auf das Immunsystem und Immunantworten

2.5.1 Auswirkungen der HIV/SIV-Infektion auf T-Zellen und die zellvermittelte Immunantwort

Die schwerwiegendsten Veränderungen nach HIV- bzw. SIV-Infektion beruhen auf der Depletion von Gedächtnis-CCR5⁺CD4⁺ T-Zellen. Diese tritt bereits in der akuten Phase auf und ist am deutlichsten im mukosalen Gewebe des Intestinaltraktes ausgeprägt [40-44]. Diese Depletion ist auf eine Infektion dieser Zellpopulation und daraus resultierender Zerstörung zurückzuführen [103]. Im peripheren Blut kommt es auch zu einem Verlust dieser Zellpopulation; dieser ist jedoch weniger ausgeprägt und die Prozentzahlen erholen sich in der chronischen Phase. Ausgangswerte werden jedoch nicht erreicht, da die Verluste nur teilweise ausgeglichen werden können [104]. Im Darm sind die Veränderungen oft irreversibel. Von den Gedächtnis-CCR5⁺CD4⁺ T-Zellen werden hauptsächlich die in der Mukosa des Darms befindlichen Th17-Zellen depletiert [95], was zu einer Schädigung der Darmbarriere, systemischer Translokation von mikrobiellen Produkten und letztlich zu einer persistierenden chronischen Immunaktivierung führt [105]. Die chronische Immunaktivierung gilt als ein zentrales Merkmal der progressiven HIV-/SIV-Infektion und besitzt eine hohe Aussagekraft für den Krankheitsverlauf.

Virusspezifische zytotoxische CD8⁺ T-Zellen proliferieren schon früh nach Infektion und die Expansion dieser Population korreliert mit dem Abfall der Viruslast, den man zu Beginn in der chronischen Phase beobachten kann [106]. In Depletionsversuchen im SIV-Modell konnte die wichtige Rolle der zellvermittelten Immunantwort bewiesen werden [107]. Wenn CD8⁺ T-Zellen noch vor der Infektion mit SIV depletiert werden, kommt es zu einer schnellen Krankheitsprogression ohne Abfall der Viruslast. Eine Depletion in der chronischen Phase bewirkt einen raschen Anstieg der Virusbelastung und bei einer erneuten Präsenz dieser Zellen einen Abfall der Viruslast.

T_{FH}-Zellen akkumulieren in der chronischen Phase der HIV- und SIV-Infektion [108, 109]. Diese Erhöhung korreliert mit erhöhten Serum-IgG und trägt potentiell zu der bei HIV und SIV beschriebenen Hypergammaglobulinämie bei [109].

2.5.2 Auswirkungen der HIV/SIV-Infektion auf B-Zellen und die humorale Immunantwort

Die Auswirkungen der HIV-/SIV-Infektion auf B-Zellen lassen sich in direkte, durch das Virus ausgelöste Schäden und indirekte Schäden durch die gesamte Dysregulation des Immunsystems aufteilen. Es ist bekannt, dass das HI-Virus direkt mit B-Zellen interagiert, was in einer polyklonalen Stimulierung *in vitro* resultiert [110]; es gibt jedoch kaum Hinweise, dass das HI-Virus *in vivo* in B-Zellen replizieren kann. Der Mechanismus der Interaktion erfolgt über den Komplementrezeptor CD21 [111]. Diese Immunkomplexe, die zwar hochinfektios sind und der Zell-zu-Zell-Übertragung des Virus dienen [112], sind jedoch nur zu einem geringen Prozentsatz vorhanden, was auf andere bedeutendere Mechanismen bei der Dysregulation des humoralen Immunsystems hindeutet.

Die chronische Immunaktivierung ist ein zentrales Merkmal der HIV-/SIV-Infektion. Auch B-Zellen sind davon betroffen, was zu einer polyklonalen B-Zell-Aktivierung mit Hypergammaglobulinämie [113-115], erhöhter Expression von Aktivierungsmarkern wie z.B. CD80 [116], erhöhter Differenzierung zu Plasmablasten [117] und erhöhtem Auftreten von B-Zell-Malignitäten [118] führt. Die genauen Mechanismen der B-Zell-Aktivierung sind noch nicht abschließend geklärt, beinhalten aber zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren wie TNF (engl. *tumor necrosis factor*), IL-10, CD40L (Ligand) und BAFF (engl. *B cell activating factor*) [119-121].

Eine weitere Veränderung der B-Zellen bei der HIV-/SIV-Infektion ist das erhöhte Auftreten von atypischen Populationen im peripheren Blut. Damit gemeint sind unreife CD10⁺ Übergangs-B-Zellen als Folge der Virus-induzierten T-Zell-Lymphopenie [116, 122] und erschöpfte B-Zellen. Letztere werden Gewebe-ähnliche Gedächtnis-B-Zellen (engl. *tissue-*

like memory B cells) genannt und weisen einen CD21⁺CD27⁻ Phänotyp auf [123]. Sie haben durch die chronische Immunaktivierung und der daraus resultierenden permanenten Belastung ihre Funktion verloren.

Eine weitere wichtige Veränderung der B-Zellen während der Infektion betrifft die Gedächtnis-B-Zellen und das serologische Gedächtnis. Bereits in der akuten Phase kommt es zu einem Verlust an Gedächtnis-B-Zellen, der dann in der dauerhaften Schädigung des immunologischen Gedächtnisses resultiert [124-126]. Die humorale Immunantwort gegen HIV/SIV ist extrem ineffektiv und durch die zahlreichen oben gelisteten Veränderungen gestört. Schon einige Wochen nach erfolgter Infektion lassen sich erste Antikörper gegen HIV/SIV nachweisen, die im Verlauf ansteigen. Die früh gebildeten neutralisierenden Antikörper üben einen Selektionsdruck auf das Virus aus, der zur Evolution von Fluchtmutanten (engl. *escape mutants*) führt, die der Neutralisation entkommen können [127]. Zudem ist nur ein kleiner Anteil der Antikörper-produzierenden Plasmablasten spezifisch für das Virus [128]. Dieses steht im klaren Gegensatz zu anderen Infektionen wie z.B. der Infektion mit dem Influenzavirus, bei denen ein hoher Prozentsatz von virusspezifischen Antikörper-sezernierenden Zellen (engl. *antibody secreting cells*, ASC) nachgewiesen werden kann [129]. Virusspezifische Gedächtnis-B-Zellen können ebenfalls zu einem geringen Prozentsatz nachgewiesen werden und sind meistens vom IgG-Typ [130]. Der Beitrag von IgA zu der virusspezifischen Antwort in mukosalen Regionen ist im Gegensatz zu IgG reduziert [131].

2.6 Ziele dieser Arbeit

Ebenso wie Untersuchungen zu T-Zellen sind auch solche zu B-Zellen essentiell, da diese ebenfalls durch die HIV-/SIV-Infektion von zahlreichen Defekten betroffen sind. Ein grundlegendes Verständnis der B-Zell-Dysfunktionen ist somit notwendig. Ziel dieser Arbeit war es, die Verteilung und die Anzahl unterschiedlicher B-Zell-Populationen sowie der Plasmazellen im Blut und in verschiedenen Organen von SIV-infizierten Rhesusaffen mittels polychromatischer durchflusszytometrischer Analyse zu bestimmen und anschließend Ak-produzierende Zellen im Blut mithilfe des B-Zell-ELISpots zu quantifizieren. Ursprünglich sollte für diese Analysen bereits asserviertes Sektionsmaterial (Milz, KM, Colon, Jejunum, Duodenum und LN verschiedener Lokalisationen) von SIV-infizierten RM aus unterschiedlichen Infektionsstudien herangezogen werden. Um Plasmazellen in RM adäquat zu charakterisieren, musste im Vorfeld jedoch untersucht werden, welchen Phänotyp diese Population im RM aufweist. Diese Ergebnisse sollten in einer funktionellen Analyse bestätigt werden.

Im Verlauf der Doktorarbeit wurde ersichtlich, dass sich kryokonserviertes Material durchflusszytometrisch von frischem Material unterscheidet, was v.a. im KM deutlich wurde. Dies betraf hauptsächlich den Marker CD27, der auf Gedächtnis-B-Zellen vorhanden ist und durch Kryokonservierung beeinträchtigt wird. Für die durchflusszytometrische Analyse von T-Zellen in eingefrorenem Material gibt es bereits Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich des Nutzens von kryokonserviertem Material und die durch das Einfrieren induzierten Veränderungen [132-139]. Vergleichbare Studien über kryokonserviertes Material und dessen Nutzen in der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung von B-Zellen existieren jedoch weder mit menschlichen Proben noch solchen von RM, weshalb daraufhin der Fokus verlegt und eine systematische direkte Vergleichsstudie zwischen eingefrorenem und frischem Organmaterial abgeschlossen wurde, um Effekte der Kryokonservierung auf B-Zellen genauer zu untersuchen.

Aufgrund der Ergebnisse der eingeschränkten Nutzbarkeit der kryokonservierten Proben sollte daraufhin die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Immunzellen im Blut und in verschiedenen Organkompartimenten im Rahmen einer SIV-Pathogenesestudie longitudinal analysiert werden. Diese Studie stellt das Kernstück dieser Doktorarbeit dar. Sie befasst sich mit der Bedeutung der akzessorischen Gene *nef* und *vpr* *in vivo* bei einer SIV-Infektion. Dabei sollten zwei Gruppen mit jeweils drei RM mit bestimmten SIV-Mutanten infiziert werden und zu einer SIVmac239 Wildtyp-Virus Infektion verglichen werden. Eine SIV-Mutante weist dabei eine komplette Deletion von *vpr* auf, wohingegen die andere Mutante Punktmutationen im *nef* Gen aufweist, sodass spezifisch die TCR-CD3 Herabregulierung ausgeschaltet ist.

Ein Grund für die Initiierung dieser Studie waren aktuelle Untersuchungen, die zeigen, dass Vpr den Zellzyklus über die Aktivierung des SLX4-Komplexes arretiert und resultierend daraus die Induktion von Typ I Interferon inhibiert [64]. Somit könnte Vpr die angeborene antivirale Immunantwort hemmen und möglicherweise die Etablierung der Infektion behindern.

Die Bedeutung der Nef-vermittelten TCR-CD3 Herabregulierung ist insofern interessant, als dass HIV-1 diese Funktion verloren hat und dies möglicherweise zu der gesteigerten Pathogenität mit massiver T-Zellaktivierung und chronischer Erschöpfung des Immunsystems beiträgt [78]. Im Rahmen dieser Dissertation soll hier v.a. auch die Immunaktivierung untersucht werden. Bislang sind die Auswirkungen dieses Defekts nicht in einem *in vivo* SIV-Makakenmodell untersucht worden.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation sollten von einer umfassenden phänotypischen und funktionellen Charakterisierung von Immunzellen im Blut und lymphoiden sowie mukosalen Organen zu der Analyse der viralen Kinetik, Immunaktivierung und Krankheitsprogression reichen. Somit sollte ein umfassendes und detailliertes Bild der Auswirkungen der Mutationen der akzessorischen Gene auf die *in vivo* Pathogenese im SIV-Makakenmodell geschaffen werden.

3. Material und Methoden

Tabelle 1: Tabellarische Auflistung der verwendeten Medien und Lösungen.

Medium/Lösung	Ansatz
Collagenasemedium 500ml	475ml LPL-Medium (siehe Tabelle) + 15ml Collagenaselösung (10mg/ml Collagenase III, Fa. Biochrom) + 5ml Trypsininhibitorlösung (10mg/ml; Fa. Sigma) + 5ml DNaselösung (10mg/ml; Fa. Roche)
DTT-Stock	10ml PBS (Fa. PAN-Biotech) + 15mg DTT (Dithiothreitol; Fa. Merck)
EDTA-Lösung	442,5ml PBS + 12,5ml Hepes (Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure; Fa. Pan-Biotech) + 5ml Penicillin/Streptomycin (Fa. PAN-Biotech) + 25ml Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i> , FCS; Fa. PAA) + 5ml Amphotericin (Fa. PAN-Biotech) + 10ml EDTA 100mM (Fa. Sigma)
Einfriermedium	70% FCS + 20% DMSO (Dimethylsulfoxid, Fa. Merck) + 10% RPMI 1640 Medium (Fa. PAN-Biotech) kompl.
ELISA-Blockierungspuffer	PBS + 5% Milchpulver (Fa. Roth)
ELISA-Carbonat-Coatingpuffer	500ml <i>Aqua bidest.</i> + 2,65g Na ₂ CO ₃ (Fa. Merck) + 2,1g NaHCO ₃ (Fa. Merck) + 0,5g NaN ₃ (Fa. Merck) pH 9.6
ELISA-Stopplösung	930,5ml <i>Aqua bidest.</i> + 69,5ml konzentrierte H ₂ SO ₄ (Fa. Merck)
ELISA-Waschpuffer	PBS + 0,05% Tween20 (Fa. Sigma)

Fix/Lyse-Puffer	Erythrozyten-Lyse (Fa. BioLegend), 10x, mit destilliertem Wasser auf 1x verdünnt
Fix/Perm-Puffer	FOXP3 Fix/Perm-Puffer (Fa. BioLegend), 4x, mit PBS auf 1x verdünnt
LPL-Medium	500ml RPMI 1640 Medium (+ Glutamin; + 2,0g/L NaHCO ₃ + 25mM Hepes) + 5ml Penicillin/Streptomycin + 5ml Amphotericin + 50ml FCS + 500µl β-Mercapthoethanol (Fa. Sigma)
MACS-Puffer	PBS + 0,5% BSA (Fa. PAN-Biotech) + EDTA 2mM
Pancoll	Lymphozytenseparationsmedium, Dichte 1,077g/ml (Fa. PAN-Biotech)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl. phosphate buffered saline, PBS</i>) pH 7,2
PBS/0,5% FCS	PBS + 0,5% FCS
PBS/0,5%BSA	PBS + 0,5% BSA
PBS/5% FCS	PBS + 0,5% FCS
Percoll 30%	Basis 450ml Percoll (Fa. Amersham Biosciences) + 50ml 10xPBS, daraus 30% Percoll mit HBSS + Phenolrot (<i>engl. Hank's Balanced Salt Solution; Fa. PAN-Biotech</i>) ansetzen
Percoll 70%	Basis 450ml Percoll + 50ml 10xPBS, daraus 70% Percoll mit HBSS ohne Phenolrot (Fa. PAN-Biotech) ansetzen
Perm-Puffer	FOXP3 Perm-Puffer (Fa. BioLegend), 10x, mit PBS auf 1x verdünnt
RPMI 1640 Medium kompl.	RPMI 1640 (+ Glutamin + 2,0g/L NaHCO ₃) + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten subadulte bis adulte Rhesusaffen verschiedenen Geschlechts, die in der Abteilung Infektionsmodelle und in der Primatenhaltung des Deutschen Primatenzentrums (DPZ) gehalten wurden. Sie wurden im DPZ zu Versuchszwecken gezüchtet und in Übereinstimmung mit §§7-9 des Deutschen Tierschutzgesetzes, das eine direkte Umsetzung der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlamentes und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendete Tiere darstellt, gehalten und verwendet. Die Affen wurden gemäß den Versuchsanforderungen in Einzel- oder Kleingruppenhaltung in Tiereinheiten der biologischen und gentechnischen Sicherheitsstufe 2 gehalten. Sie wurden täglich von erfahrenen Tierpflegern oder Tierärzten des DPZ begutachtet. Im Falle von Schmerzen oder Leiden der Tiere wurde ein im Vorfeld angefertigtes Bewertungssystem angewendet und bei Überschreiten der Punktzahl die Euthanasie durchgeführt. Details zu den verwendeten Tiere sind den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

Tabelle 2: Analysierte SIV-infizierte Tiere

Tiernummer	Geschlecht	Alter	Virus	Route	Immunisierung	Zeitraum der US	Infektionsstatus	FACS	B-Zell-ESP	ELISA	VL	MACS
14892	w	5	SIVmac239	i.v.	nein	0-52	P	x	x	x	x	-
14893	m	5	SIVmac239	i.v.	nein	0-50	P	x	x	x	x	-
15226	m	4	SIVmac239	i.v.	nein	0-35	P	x	x	x	x	-
2503	w	5	SIVmac239	i.v.	nein	0-52	P	x	x	x	x	-
2583	m	4	SIVmac239	i.v.	nein	0-45	P	x	x	x	x	-
14875	w	5	SIVmac239	i.v.	nein	0-52	K	x	x	x	x	-
2617	m	4	SIVmac239	i.v.	nein	0-52	P	x	x	x	x	-
14847	w	5	SIVmac239	i.v.	nein	0-52	K	x	x	x	x	-
15216	m	4	SIVmac239	i.v.	nein	0-52	P	x	x	x	x	-
2139	m	12	SIVmac239	tonsillär	ja	440	LTNP	x	x	-	x	-
2153	m	12	SIVmac239	tonsillär	ja	430	LTNP	x	x	-	x	x
2155	m	12	SIVmac239	tonsillär	ja	400; 445	LTNP	x	x	-	x	x
2172	m	12	SIVmac239	tonsillär	ja	450	LTNP	x	x	-	x	-
8644	m	18	SIVmac251	tonsillär	ja	716	LTNP	x	x	-	x	x
13906	m	9	SIVmac251	i.r.	ja	145	LTNP	x	x	-	x	x
13907	m	9	SIVmac251	i.r.	ja	140; 190	LTNP	x	x	-	x	x
13913	m	9	SIVmac251	i.r.	ja	150; 185	LTNP	x	x	-	x	x

US, Untersuchung; FACS, fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrische Analyse; B-Zell-ESP, B-Zell-ELISpot; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; VL, Viruslast im Plasma; MACS, magnetic-activated cell sorting, magnetische Zellsortierung; m, männlich; w, weiblich; i.v., intravenös; i.r., intrarektal; LTNP, Longterm-Nonprogressor; P, Progressor; K, Viruslast kontrollierende Tiere

Tabelle 3: Analysierte SIV-negative Tiere

Tiernummer	Geschlecht	Alter	Virus	Route	Immunisierung	Zeitraum der US	Infektionsstatus	FACS	B-Zell-ESP	ELISA	VL	MACS
2415	m	6	-	-	-	Sektion	-	X	-	-	-	-
2453	m	5	-	-	-	Sektion	-	X	-	-	-	-
2469	m	5,5	-	-	-	Sektion	-	X	-	-	-	-
2475	m	5	-	-	-	Sektion	-	X	-	-	-	-
2485	m	5	-	-	-	Sektion	-	X	-	-	-	-
2497	w	4,5	-	-	-	Sektion	-	X	-	-	-	-
2502	m	4,5	-	-	-	Sektion	-	X	-	-	-	-
2526	m	4,5	-	-	-	Sektion	-	X	-	-	-	-
2530	m	4	-	-	-	Sektion	-	X	-	-	-	-
2531	m	4	-	-	-	Sektion	-	X	-	-	-	-
2545	m	4	-	-	-	Sektion	-	X	-	-	-	-
14876	m	4	-	-	-	Sektion	-	X	-	-	-	-
2209	m	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2363	m	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2232	m	11	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
2564	m	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2522	m	5	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
9406	w	19	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
2612	m	4	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
14954	m	5	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-

US, Untersuchung; FACS, fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrische Analyse; B-Zell-ESP, B-Zell-ELISpot; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; VL, Viruslast im Plasma; MACS, magnetic-activated cell sorting, magnetische Zellsortierung; m, männlich; w, weiblich; i.v., intravenös; i.r., intrarektal

3.1.1 Narkotisierung

Alle Proben wurden aus Gründen des Arbeits- und Tierschutzes nur von narkotisierten Tieren entnommen. Der Käfig ist so konstruiert, dass die Rückwand vorgezogen werden kann, um dem Tier das Anästhetikum intramuskulär zu applizieren. Dazu diente bei leichteren, weitestgehend schmerzfreien Eingriffen wie z.B. der Blutentnahme 0,10-0,15 ml/kg Körpergewicht (KGW) Ketavet® (Wirkstoff: Ketamin; Fa. Pfizer). Bei schmerzhafteren Eingriffen, bei denen auch eine tiefere und längere Narkose der Tiere notwendig war, wurde 0,15-0,2 ml/kg KGW der Göttinger Mischung II (GMII) eingesetzt. 1ml GMII enthält 5% Ketavet®, 1% Rompun (Wirkstoff: Xylazin, Fa. Bayer) und 0,1% Atropinsulfat-Lösung (Fa. Dr. Franz Köhler Chemie GmbH) auf der Basis von isotonischer Kochsalzlösung (Fa. B.Braun).

3.1.2 Infektion mit SIV

Das Hauptexperiment dieser Doktorarbeit, das sich mit der Rolle der Proteine Vpr und Nef auf die SIV-Pathogenese befasst, besteht aus neun Tieren, die mit 500TCID₅₀ (engl. *tissue culture infectious dose*) bzw. ca. 1000ng p27 SIVmac239 einmalig intravenös inokuliert worden sind. Drei Tiere fungierten hier als Kontrolltiere, die mit SIVmac239 Wildtypvirus inokuliert wurden und drei Tiere erhielten die SIVmac239 Δ vpr-Deletionsmutante [140], die uns von Prof. Dr. Frank Kirchhoff aus der Abteilung Molekulare Virologie der Universität Ulm zur Verfügung gestellt worden ist. Ebenfalls von dort wurde die SIVmac239 nef-Mutante bezogen, mit der die drei restlichen Tiere inokuliert wurden. Bei dieser wurden drei spezifische Punktmutationen (davon zwei mit funktioneller Relevanz) eingeführt, sodass die Funktion der TCR-CD3 Herabregulierung ausgeschaltet ist. Wie in der Einleitung beschrieben, ist dieses natürlicherweise bei HIV-1 und eng verwandten SIV-Stämmen der Fall, was die gesteigerte Pathogenität durch massive T-Zellaktivierung und chronische Erschöpfung des Immunsystems bedingt.

Zusätzlich zu diesen Tieren wurden auch Langzeit-SIV-infizierte Rhesusaffen, sogenannte Longterm-Nonprogressors (LTNPs) analysiert. Diese Tiergruppe ist bezüglich des verwendeten Virus, der Inokulationsroute und eventuellen vorherigen Immunisierungen sehr heterogen, allen gleich ist aber die erfolgreiche Kontrolle der Infektion über einen längeren Zeitraum. Ebenfalls wurden an SIV-negativen Kontrolltieren zahlreiche Tests durchgeführt. Details sind den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

3.1.3 Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurde das Vacutainer-System mit dazugehörigen Röhrchen (Fa. BD) benutzt. Punktiert wurde die *Vena femoralis* in der Inguinalregion nach Desinfektion des Bereichs mit Sterilium® Virugard (Fa. Bode Science Center). Für die durchflusszytometrische Analyse wurden Röhrchen mit EDTA (Ethylendiamintetraacetat) als Gerinnungshemmer benutzt, für die Aufarbeitung von mononukleären Zellen (engl. *mononuclear cells*, MNCs) aus dem peripheren Blut (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) fanden analog Röhrchen mit Zitrat als Gerinnungshemmer Verwendung. Serum wurde aus speziellen Röhrchen gewonnen, die ein Trenngel enthalten, das sich bei der Zentrifugation zwischen die geronnenen Erythrozyten und das Serum schiebt.

3.1.4 Beckenkammpunktion

Für die Punktion des Beckenkamms wurden die Tiere mit 0,15-0,2ml GMII/kg KGW narkotisiert und in Bauchlage positioniert. Vor der Punktion wurde 0,1ml/kg KGW Metacam® (Wirkstoff Meloxicam, Fa. Boeringer Ingelheim) subkutan zur Analgesie verabreicht.

Der entsprechende Bereich um die *Cristae iliacae* wurde geschoren und mit Sterilium® Virugard und Braunol® (Fa. B.Braun, Melsungen) vorbereitet. Ein steriles OP-Tuch wurde entsprechend platziert. Als Gerinnungshemmer wurde Zitrat aus einem Vacutainerröhrchen in eine 10ml Spritze vorgelegt. Für die Punktion wurde eine 18-Gauge (G)-Nadel verwendet.

Die *Crista iliaca* wurde palpiert, zwischen zwei Fingern fixiert und mit der Kanüle in kranio-kaudaler Richtung in einem ca. 45° Winkel punktiert. Durch Anziehen des Stempels wurde ein negativer Druck erzeugt, der Knochenmark aus dem Beckenkamm in die Spritze aufsaugen ließ (Abbildung 9). Es wurde nicht mehr als 0,5-1ml Aspirat gesammelt, da anderenfalls eine Blutkontamination nicht vermieden werden kann. Nach Herausziehen der Spritze wurde die Punktionsstelle mit einem sterilen Tupfer für fünf Minuten abgedrückt.

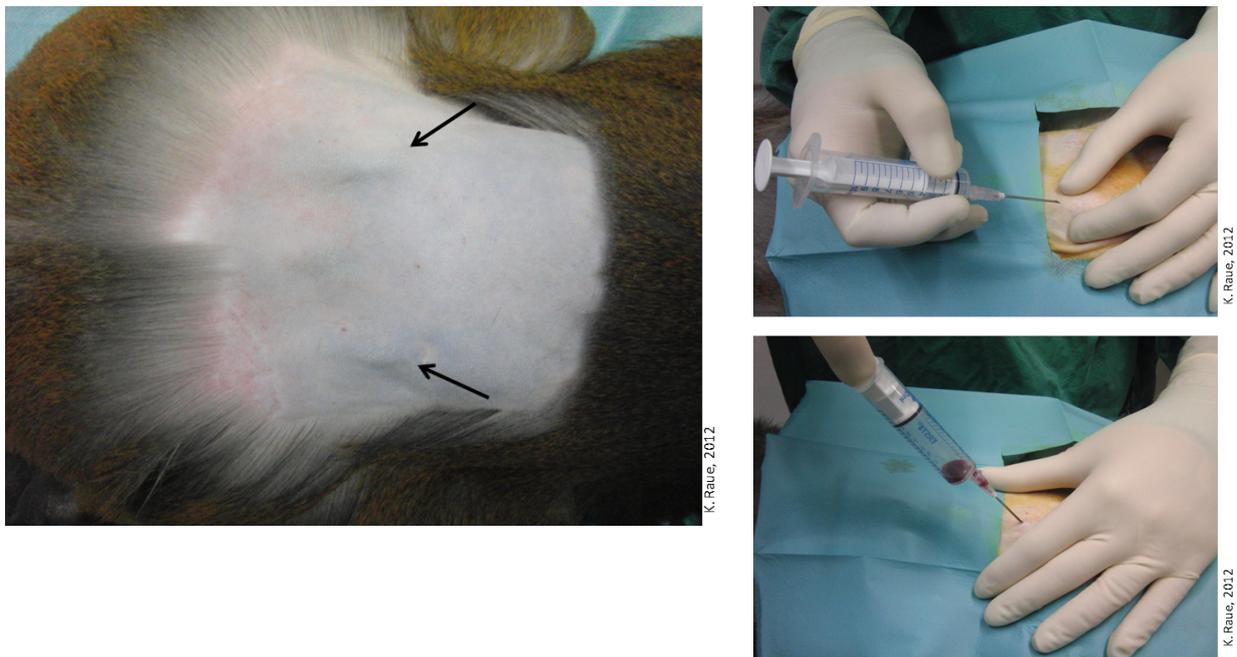


Abbildung 9: Fotos der Beckenkampnpunktion. Das linke Bild veranschaulicht die Erhebungen der *Cristae iliacae* durch Kennzeichnung mit zwei schwarzen Pfeilen. Die Bilder rechts zeigen die adäquate Punktion eines Beckenkammes noch ohne Anzug des Stempels (oben) und mit Aspirat durch Erzeugung des negativen Druckes (unten) (Katharina Raue).

3.1.5 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die Tiere wurden tief mit 0,2ml/kg KGW GMII narkotisiert, um den Hustenreiz möglichst effektiv auszuschalten. Sie wurden in Rückenlage, mit dem Oberkörper und Kopf erhöht, gelagert. Der Kiefer wurde an den Eckzähnen gespreizt und der Kopf überstreckt, um eine

gute Sicht auf den Kehlkopf zu garantieren. Mittels Laryngoskop (Fa. Aesculap) mit integrierter Lichtquelle wurde der Zungengrund heruntergedrückt, so dass die Stimmritzen und der Kehldeckel sichtbar wurden. Das flexible Bronchoskop (Fa. Richard Wolf GmbH) wurde bis zur *Bifurcatio tracheae* vorgeschoben und dann in einen Hauptbronchus weitergeführt. Vorgewärmte Kochsalzlösung wurde als Bolus von 15ml durch den Arbeitskanal eingegeben und anschließend über eine 5ml Spritze sukzessive rückgewonnen. Ein weiterer 15ml Bolus der Kochsalzlösung wurde eingegeben und abgesaugt. Ungefähr 20-25ml konnten insgesamt zurückgewonnen werden. Die Spülflüssigkeit wurde vor der weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt.

3.1.6 Lymphknotenextirpation

Für die komplette chirurgische Entnahme eines peripheren LN wurden die Tiere mit 0,15-0,2ml GMII/kg KGW narkotisiert und in Rückenlage positioniert. Der entsprechende Bereich (inguinal oder axillär) wurde geschoren und chirurgisch mit Sterilium® Virugard und Braunol® vorbereitet. Mit einem Skalpell (Fa. B.Braun) wurde die Haut und Unterhaut ca. 1cm lang eingeschnitten und das darunterliegende Gewebe stumpf präpariert, bis der Lymphknoten frei lag. Die Gefäßversorgung wurde abgeklemmt und der Lymphknoten abgetrennt. Er wurde in 10ml RPMI 1640 Medium kompl. überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt. Die Haut und Unterhaut wurde intrakutan vernäht. Als postoperative Versorgung der Tiere wurde ein Breitbandantibiotikum verabreicht.

3.1.7 Lymphknoten-Feinnadelaspiration (LN-FNA)

Für die LN-FNA wurden die Tiere mit 0,10-0,15ml Ketavet® sediert und in Rückenlage positioniert. Der Bereich um den entsprechenden Inguinallymphknoten wurde geschoren und mit Sterilium® Virugard desinfiziert. Der LN wurde mit zwei Klemmen von beiden Seiten fixiert und mit einer 2ml Spritze, auf die eine 25-G-Kanüle geschoben worden war, punktiert.

Durch Rückziehen des Spritzenstempels wurde ein Vakuum erzeugt, das mononukleäre Zellen aufsaugt. Durch fünfmaliges Passagieren des LN wurde eine ausreichende Zellausbeute garantiert. Der Inhalt der Spritze wurde in 8ml RPMI 1640 kompl. überführt und auf Eis gestellt.

3.1.8 Colonbiopsien (CB)

Zur Entnahme von CB wurden die Affen mit 0,2ml/kg KGW narkotisiert und in Seitenlage positioniert. 24h vor Probenentnahme erfolgte eine Nahrungskarenz, um möglichst wenig störenden Kot im Colon zu haben. Unter Sichtkontrolle wurde ein mit Wasser angefeuchtetes Endoskop (Fa. Fujinon) vorsichtig ca. 10-20cm weit in das *Colon descendens* vorgeschoben. Durch Luft- oder Wassereingabe wurde ein guter Blick auf die Darmschleimhaut gewährleistet und die Wand des Colon gespannt. Wenn das Endoskop korrekt positioniert war, wurde eine spezielle Biopsiezange vom Durchmesser 2,3mm (Fa. Fujinon) durch den Arbeitskanal eingeführt und ca. 10 bis 15 Biopate von verschiedenen Stellen gewonnen. Diese wurden in PBS aufgenommen und auf Eis gelagert.

3.1.9 Euthanasie und Sektion

Nach einer tiefen vorbereitenden Narkose mit 0,2-0,3ml/kg KGW wurden die Tiere in die Sektionshalle der Infektionspathologie des DPZ gebracht. In der *Linea alba* wurde die Bauchhöhle eröffnet. Die Euthanasie fand über eine Kombination von Blutentzug über die Punktion der *Aorta abdominalis* und Überdosis von Narcoren® (Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium; Fa. Merial) statt. Erst dann wurden die Organproben gewonnen.

3.2 Isolierung von mononukleären Zellen

3.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut

Zur Trennung von mononukleären Zellen aus Vollblut wurden spezielle 15ml-Röhrchen (Leucosep™, Fa. Greiner bio-one) benutzt, die eine Trennmembran aufweisen. Unterhalb dieser wurden sie mit 3ml Pancoll befüllt; anschließend wurden maximal 6ml unverdünntes Vollblut auf die Trennmembran gegeben. Nach 25min Zentrifugation bei 800xg wurde eine klare Trennung von Erythrozyten, die sich unterhalb der Trennmembran anlagerten und dem Lymphozytensaum, der oberhalb der Membran zwischen dem Pancoll und dem zellfreien Plasma lag, ersichtlich. Der Saum wurde vorsichtig abgenommen und in 9ml PBS überführt. Nach zwei Waschschritten mit PBS bei 1200rpm für 10min wurde das Zellpellet resuspendiert und eine kleine Menge zur Zellzahlbestimmung abgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in der benötigten Konzentration in RPMI1640 kompl. oder PBS aufgenommen.

3.2.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus der BAL

Das Röhrchen mit der Lavage-Flüssigkeit wurde mit PBS/5%FCS auf 50ml aufgefüllt und für 6min bei 450xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet in 10ml PBS/5%FCS aufgenommen. Dies wurde über ein 70µm Zellsieb (Fa. BD Falcon) gegeben, um größere Partikel zurückzuhalten. Nach Auffüllen mit PBS/5%FCS wurde erneut gewaschen und eine Zählprobe entnommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Probe in einem definierten Volumen PBS aufgenommen.

3.2.3 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Lymphknoten

Der entnommene LN wurde in einem ersten Schritt komplett durch ein 100µm Zellsieb gerieben. Die gewonnenen Zellen wurden in PBS aufgefangen und zweimal für 10min bei 1200rpm gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden sie in einem definierten Volumen in PBS aufgenommen.

3.2.4 Isolierung von mononukleären Zellen aus Lymphknoten-Feinnadelaspiraten

Da durch die LN-FNA schon mononukleäre Zellen gewonnen wurden, musste keine separate Isolierung vorgenommen werden. Die Zellen, die nach der Probenentnahme in RPMI kompl. aufgenommen wurden, wurden mit PBS gewaschen und in ein für die nachfolgenden Tests definiertes Volumen aufgenommen.

3.2.5 Isolierung von mononukleären Zellen aus Colonbiopsien

Zur Isolierung von mononukleären Zellen aus CB war es zuerst nötig diese manuell zu zerkleinern. Sie wurden auf Objektträgern positioniert und mit einem Skalpell grob geschnitten. Danach wurden Objektträger und Skalpell mit Collagenasemedium für den enzymatischen Verdau abgespült. Mit einem Gesamtvolumen von 8ml Collagenasemedium pro Tier wurden die Biopsien drei Stunden bei 37°C im Schüttler Multitron Standard (Fa. Infors HT) inkubiert. Danach wurden die Proben mit einem Spritzenstempel über ein 100µm Zellsieb gerieben. Alles wurde mit PBS/0,5%FCS nachgespült und auf das Gesamtprobenvolumen von 50ml aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation bei 450xg für 6min wurde das Zellpellet in 6ml 30% Percoll-Lösung resuspendiert. Dieses wurde nun vorsichtig auf 5ml 70% Percoll-Lösung geschichtet und 20min bei 1000xg zentrifugiert. Die Lymphozyten befanden sich in der Interphase und wurden vorsichtig abpipettiert, mit PBS/0,5%FCS aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Nach Resuspension in 1ml PBS/0,5%FCS

wurde eine kleine Menge hiervon zur Zählprobe abgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl in einem für die weiteren Tests notwendigen Volumen aufgenommen.

3.2.6 Isolierung von mononukleären Zellen aus Milz, Knochenmark aus dem Femur und Darm aus der Sektion

Gewonnene Resektate aus Milz und KM aus dem Femur wurden in einem ersten Schritt komplett durch ein 100µm Zellsieb gerieben. Da beide Organe einen hohen Anteil an Erythrozyten aufweisen, wurden beide anschließend -ähnlich zu der Isolierung von PBMCs- in speziellen Pancoll-gefüllten Leucosep™ Röhren zentrifugiert. Nach Abnahme des Leukozytensaums und der Überführung in PBS wurde zweimalig mit PBS für 10min bei 1200rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Proben in einem definierten Volumen PBS aufgenommen.

Die Resektate aus Dünn- und Dickdarm wurden zuerst in kleine Stücke zerteilt, vom Peritoneum befreit und in 50ml PBS gegeben. Hierzu wurde 50µl der DTT-Stocklösung zugegeben und für 10min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach einer sechsminütigen Zentrifugation bei 450xg wurde der Überstand verworfen und nochmals mit PBS zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben für 20min in 40ml der EDTA-Lösung bei 37°C im Schüttler inkubiert. Der Überstand mit den bereits gelösten Zellen wurde abgenommen und zentrifugiert. Das daraus resultierende Zellpellet wurde in 5ml PBS/5%FCS resuspendiert und auf Eis gestellt. Das übrige Gewebe wurde mit 40ml Collagenasemedium für 1h im Schüttler bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, zentrifugiert und das Zellpellet in 5ml PBS/0,5%FCS aufgenommen und auf Eis gestellt. Die Inkubation in Collagenasemedium sowie die nachfolgenden Schritte wurden wiederholt. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden über ein 100µm Zellsieb gegeben und anschließend zentrifugiert. Jedes Zellpellet wurde in 25ml 30% Percoll-Lösung resuspendiert und auf 10ml 70% Percoll-Lösung geschichtet. Nach der Zentrifugation für 20min bei 1000xg konnte die Interphase abgenommen werden. Nach zweimaliger Zentrifugation mit PBS wurde eine Zählprobe

entnommen und die Zellzahl auf die für die weiteren Tests erforderliche Konzentration eingestellt.

3.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung fand mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Fa. Marienfeld-Superior) statt. 20µl der zuvor isolierten mononukleären Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau vermischt. Bei der Zählung im Lichtmikroskop (Fa. Zeiss) erschienen tote Lymphozyten blau, da sie den Farbstoff durch die erhöhte Membrandurchlässigkeit aufnahmen.

3.4 Kryokonservierung von Probenmaterial

3.4.1 Einfrieren von PBMCs und MNCs

Die gewünschte Menge an Zellen (üblicherweise 5×10^6 - 1×10^7) wurde nach einer Zentrifugation bei 1200rpm für 10min in 0,9ml kaltes RPMI 1640 kompl. aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen (Fa. ratiolab) überführt, in dem bereits 0,9ml kaltes Einfriermedium vorgelegt waren. Der Inhalt des Röhrchens wurde gut gemischt, dann zügig in eine Einfrierbox (Mr. Frosty™, Fa. Nalgene) gestellt und unverzüglich in einen -80°C-Tiefgefrierschrank überführt, wo eine Abkühlung von 1°C pro Minute auf -80°C stattfand. Dort wurden sie auch final für zwei bis sechs Monate gelagert.

3.4.2 Einfrieren von Plasma und Serum

Anfallendes Plasma bei der Isolierung von PBMCs wurde vorsichtig abgenommen, in 0,5-1ml Röhrchen (Fa. Eppendorf) überführt und bei -20°C eingefroren und gelagert. Serum wurde wie oben beschrieben aus speziellen Nativblutröhrchen gewonnen und ebenfalls bei -20°C gelagert.

3.4.3 Auftauen von PBMCs und MNCs

Die Proben wurden zügig bei 37°C aufgetaut. Der Inhalt wurde in 10ml vorgewärmtes RPMI1640 kompl. überführt. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 1200rpm für 10min wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen in einer definierten Konzentration für die weiteren Tests aufgenommen.

3.4.4 Auftauen von Plasma und Serum

Plasma- und Serumproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut.

3.5 Methoden

3.5.1 Bestimmung der Viruslast im Plasma mittels qRT-PCR

Die Viruslast aus EDTA-Plasma der infizierten Tiere wurde mit der Methode der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) von Dr. Ulrike Sauermann, Abteilung Infektionsmodelle des DPZ analysiert. Hierbei wurden die viralen Kopien quantitativ bestimmt [141]. Hierzu wurde der Rotor-Gene Q (Fa. Qiagen) benutzt. Die Nachweisgrenze lag bei 40 Kopien/ml Plasma.

In einem ersten Schritt musste die virale RNA aus dem Plasma isoliert werden. Dazu wurde das QIAmp Viral RNA Mini Kit (Fa. Qiagen) gemäß den Herstellerangaben benutzt. Die qRT-PCR wurde wie in Tabelle 4 beschrieben angesetzt.

Tabelle 4: Reaktionsansatz der qRT-PCR.

Reagenz	Konzentration/Menge pro Ansatz
Mastermix (Fa. Qiagen)	12,5µl/Ansatz*
Primer Gag sense	10 pmol/µl
Primer Gag antisense	10 pmol/µl
Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sonde	10 pmol/µl
RT-Mix	0,5U/Ansatz
Plasma/RNA	8,5µl/Ansatz
H₂O (RNase- und DNase-frei; Fa. Merck)	ad 25µl

*Konzentration ist durch die Firma nicht angegeben; 12,5µl werden pro Ansatz entnommen!

Die Bedingungen für die Durchführung der PCR im Rotor-Gene Q sind in Tabelle 5 beschrieben. Als Positivkontrolle wurden die RNA-Standards 10, 50, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ RNA-Kopien/ml benutzt. Als Negativkontrolle diente der in der Tabelle 4 beschriebene Ansatz, jedoch mit RNase- und DNase-freiem H₂O statt RNA.

Tabelle 5: Ablauf der PCR im Rotor-Gene Q zur Quantifizierung der viralen Kopien.

Zyklusschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl der Zyklen
Reverse Transkription	50	30	1
Initiale Aktivierung	95	10	1
Denaturierung	95	0,15	45
Annealing	60	0,40	
Elongation	72	0,20	

3.5.2 SIV-ELISA

Der ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) ist eine Methode, die sich der spezifischen Erkennungsreaktion zwischen Antigen und Antikörper bedient und diese durch eine enzymatische Farbreaktion sichtbar und messbar macht.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein ELISA für die SIV-Antigene p27 (Gag-Protein) und gp130 (Env-Protein) durchgeführt. Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden spezielle 96-well-ELISA-Platten mit mittlerer Bindungskapazität (Fa. Greiner bio-one) separat mit den Antigenen p27 und gp130 (Ausgangskonzentration 1mg/ml, Einsatz 1µg/ml, Fa. NIBSC) in Carbonat-Coatingpuffer beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit dem Waschpuffer PBS/0,05% Tween20 wurde zuerst für 1,5h ein Blockierungspuffer auf die Platte gegeben, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurde Plasma in Doppelbestimmungen in einer Verdünnung von 1:200 in Blockierungspuffer für 3h zugegeben. Plasma vom Zeitpunkt 0, d.h. vor der SIV-Infektion wurde 1:50 und 1:100 eingesetzt. Eine adäquate Negativ- und Positivkontrolle (eingefrorenes historisches Material von Rhesusaffen mit bekanntem Antikörperstatus) wurde zur Qualitätskontrolle des Tests ebenfalls auf die Platte gegeben. Bei der Positivkontrolle erfolgte eine Endpunkttitration. In der Inkubationsphase wurden nun die im Plasma befindlichen IgG-Antikörper gegen p27 und gp130 an die Platten-Antigene gebunden. Durch Einsatz des Waschpuffers wurde ungebundenes Material entfernt. Anschließend wurde ein POD (Peroxidase)-gekoppelter Sekundärantikörper gegen IgG (Fa. Jackson Bio-lab) in einer Verdünnung von 1:3000 für 1,5h inkubiert, der an die Antigen-Antikörper-Komplexe band. Durch Einsatz von Tetramethylbenzidin (TMB, Fa. Sigma) als Chromogen wurde eine enzymatische Nachweisreaktion eingeleitet, die durch eine schwefelsäurehaltige Stopplösung unterbrochen wird. Die optische Dichte (OD) wurde anschließend zügig bei 450nm im ELISA-Reader Sunrise™ (Fa. TECAN) gemessen. Eine

positive Reaktion war vorhanden, wenn der gemessene Wert über dem selbst festgelegten Schwellenwert (Mittelwert von drei Werten vor der Infektion multipliziert mit 2) lag.

3.5.3 B-Zell-ELISpot

In Abbildung 10 ist schematisch der B-Zell-ELISpot für die Erfassung von Gesamt-IgG-ASC und Antigen-spezifischen ASC dargestellt.

Der B-Zell-ELISpot dient dem Nachweis von Antikörper-sezernierenden Zellen. Dabei kann sowohl die direkte Antwort der Plasmablasten nach Infektion bzw. Immunisierung gemessen werden als auch die Gedächtnis-B-Zell-Antwort nach einer mehrtägigen Stimulation der Zellen. Hierfür wurde ein kommerzielles Kit für IgG und IgA von Mabtech benutzt, das mit einigen speziellen Reagenzien ergänzt wurde. Für den Assay wurden klare MultiScreen_{HTS} 96-well-Platten mit einer hydrophoben Immobilon-P PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Fa. Merck Millipore) benutzt. Diese wurden zunächst mit 15µl frisch angesetztem 35% Ethanol aktiviert und anschließend mit sterilem *Aqua dest.* fünfmalig gewaschen. Für die Bestimmung des Gehalts an Gesamt-IgG/IgA-sezernierenden Zellen wurde die Platte mit einem Fänger- (engl. *capture*) Antikörper gegen IgG oder IgA bestückt und bei 4°C inkubiert. Für die spezifischen SIV-ASC wurde die Platte mit p27 und gp130 inkubiert. Als Negativkontrolle diente Bovines Serumalbumin (Fa. PAN-Biotech). Alle Ansätze wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Platte zuerst fünfmalig mit sterilem PBS gewaschen und dann für ca. 3h mit RPMI 1640 kompl. bei 37°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. In der Zwischenzeit wurden MNCs aus Vollblut isoliert (siehe **2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut**) und in einer Konzentration von 10⁶ Zellen pro ml RPMI 1640 kompl. aufgenommen. In die Kavitäten für Gesamt-IgG/IgA wurden 100.000 Zellen gegeben, in die Kavitäten zur Bestimmung der SIV-spezifischen ASC und der Negativkontrolle dagegen 200.000 Zellen pro Kavität. In der nun folgenden Inkubationszeit von 20h bei 37°C wurden Antikörper produziert, die an die SIV-Antigene oder den Fänger-IgG/IgA banden.

Zur Bestimmung von Gedächtnis-B-Zellen war es dagegen erforderlich die isolierten PBMCs vorher für drei Tage mit speziellen Reagenzien zu stimulieren. Dieses erfolgte in 48-well-Platten (Fa. Greiner bio-one) in einer Zellkonzentration von 2×10^6 /ml in RPMI1640 kompl. bei Zugabe von $10 \mu\text{g/ml}$ PWM (engl. *pokeweed mitogen*, Fa. Sigma) und $5 \mu\text{g/ml}$ CpG (Cytosin-Phosphat-Guanin) Klasse B ODN 2006 (Fa. InvivoGen). Ersteres ist generell für die Stimulation von Lymphozyten zuständig, wohingegen letzteres ein direkter TLR (*toll-like receptor*)-9-Agonist und starker B-Zell-Aktivator ist. Zusammen initiieren sie die Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmablasten, die aktiv Antikörper sezernieren. Als Vergleichsstimulation wurde eine Kombination von rh (rekombinant human) IL-2 und R848 (Resiquimod) (beide Fa. Mabtech) gewählt. Im Ergebnisteil werde ich genauer auf die Etablierung der Stimulation eingehen. Am Entwicklungstag wurde zunächst alles, was nicht gebunden hat, durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend kam ein Biotin-gekoppelter Detektions-Antikörper zum Einsatz, der an die Antigen-Antikörper- bzw. Antikörper-Antikörper-Komplexe band. Nachfolgend wurde die Streptavidin-Alkaline Phosphatase (ALP) zugegeben, die über Streptavidin an Biotin bindet. Nach Zugabe des chromogenen Substrats BCIP/NBT (Bromchlorindolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) PLUS (Fa. Moss) für maximal 30min im Dunkeln konnte eine Ausbildung von Punkten beobachtet werden. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt und die Platte für drei Tage getrocknet. Anschließend wurden die Punkte mit dem Bioreader 6000-V™ (Fa. BIOSYS) gezählt. Die Anzahl der Gesamt-IgG/IgA ASC wurde auf 10^6 PBMCs nach Subtraktion der Negativkontrolle normiert. Die Anzahl der SIV-ASC nach Subtraktion der Negativkontrolle wurde als prozentualer Anteil an den Gesamt-IgG/IgA ASC dargestellt.

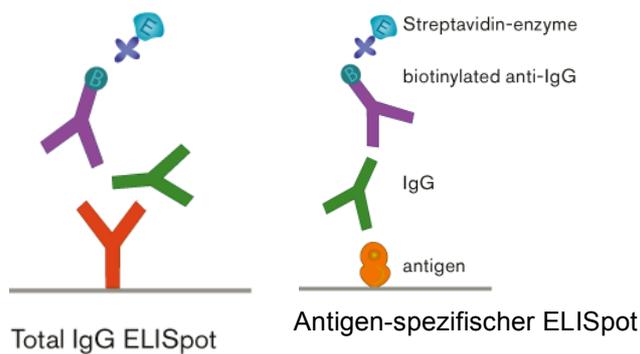


Abbildung 10: Schematische Darstellung des B-Zell-ELISpots. Links dargestellt ist ein B-Zell-ESP zur Erfassung von Gesamt-IgG ASC, rechts dagegen der spezielle B-Zell-ESP zur Quantifizierung von Antigen-spezifischen ASC (Mabtech).

3.5.4 Magnetische Zellseparation

Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 11 gezeigt.

Die magnetische Zellseparation (engl. *magnetic activated cell sorting*, MACS) erfolgte manuell über spezielle Microbeads mit einem OctoMACS™ Separator und speziellen MS-Säulen (beides Fa. Miltenyi Biotec). Dieses System wurde genutzt, um CD138⁺ Plasmablasten/Plasmazellen aus dem Blut aufzureinigen und anschließend im Gesamt-IgG B-Zell-ELISpot einzusetzen. Hiermit sollte der Nachweis erbracht werden, dass phänotypisch charakterisierte CD138⁺ Zellen tatsächlich Plasmablasten/Plasmazellen sind, die spontan IgG sezernieren. Zunächst wurden PBMCs aus dem Vollblut isoliert (siehe **3.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut**). Ein Teil der isolierten PBMCs wurde direkt für den Gesamt-IgG B-Zell-ELISpot und die Durchflusszytometrie eingesetzt, ein anderer Teil wurde für die Aufreinigung von CD138⁺ Zellen genutzt. Letzterer wurde mit 5µl des anti-CD138-FITC Antikörpers (Fa. eBioscience) gefärbt und 30min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen und für 10min bei 1200rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands und Aufnahme der Zellen in 90µl MACS-

Puffer wurden 10µl anti-FITC microbeads dazugegeben, die an die FITC-markierten CD138⁺ Zellen banden. Dieses wurde 15min bei 4°C inkubiert und nach einer erneuten Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes in 500µl MACS-Puffer resuspendiert. Währenddessen wurden die MS-Säulen in den Separator gesetzt und mit MACS-Puffer gespült. Die Säule wurde nun mit der Zellsuspension beladen und dreimalig mit je 500µl MACS-Puffer gespült. Dieser Durchfluss stellte die CD138⁻ Fraktion dar, die ebenfalls im Gesamt-IgG B-Zell-ELISpot und durchflusszytometrisch analysiert wurde. Die CD138⁺ Zellen waren jedoch durch die Microbeads magnetisch markiert und somit in der Säule und dem Magnetfeld des Separators gefangen. Um diese Fraktion zu erhalten, musste die Säule aus dem Separator entfernt werden, auf ein neues Röhrchen gesetzt werden und mit dem MS-Säulen-Stempel aus der Säule gedrückt werden. Diese Fraktion wurde aufgrund der sehr geringen Zellzahl komplett im Gesamt-IgG B-Zell-ELISpot eingesetzt. Somit fand die durchflusszytometrische Überprüfung der Reinheit der Proben indirekt über die CD138⁻ Fraktion im Vergleich zur Fraktion vor der Aufreinigung statt.

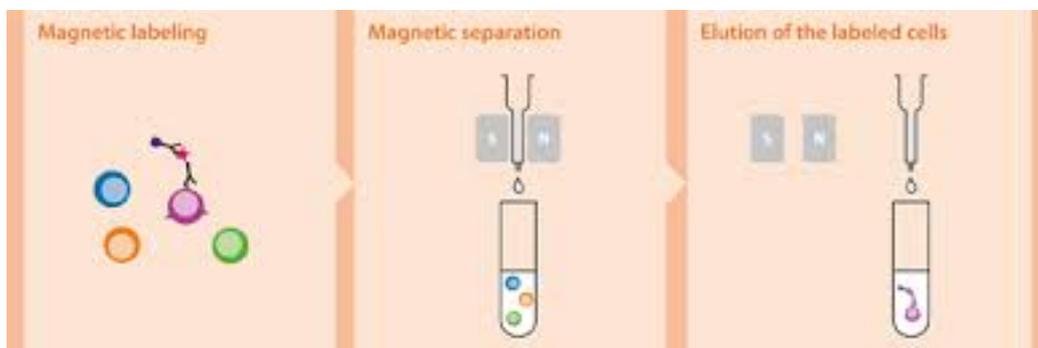


Abbildung 11: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation. (Miltenyi Biotec)

3.5.5 Polychromatische Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von verschiedenen Zelltypen in einer heterogenen Zellsuspension. Dabei werden die Zellen in einer sehr hohen Geschwindigkeit

einzelnen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom durch die Messzelle des Durchflusszytometers (LSR II, Fa. BD) geleitet und mit Laserlicht verschiedener Wellenlängen bestrahlt. Über den Vorwärtsstreulichtdetektor (engl. *Forward Scatter*, FSC) und den Seitwärtsstreulichtdetektor (engl. *Side Scatter*, SSC) können die einzelnen Zellen anhand der unterschiedlichen Intensität des von ihnen gestreuten Lichts bezüglich Größe und Granularität charakterisiert werden. So streuen Granulozyten deutlich mehr Licht als die kleinen glatten Lymphozyten, da sie eine raue Oberfläche besitzen und im Inneren über eine hohe Granularität verfügen.

Eine weitere Form der Charakterisierung erfolgt über Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper (mAk), die an bestimmte Moleküle an der Oberfläche oder im Inneren der Zelle binden. Wenn die Laserstrahlen die Zelle passieren, werden über die Fluorochrome spezifische optische Signale unterschiedlicher Wellenlängen ausgesandt (Emission), die durch Filter aufgeteilt werden und von Detektoren ausgewertet werden. Das LSR II am DPZ verfügt über eine Ausstattung von drei verschiedenen Lasern, einem violetten Laser der Wellenlänge 405nm, einem blauen Laser mit der Wellenlänge 488nm und einem roten Laser der Wellenlänge 633nm. Vor jeder Messung wurde eine adäquate Kompensation mit Beads (Fa. Spherotech) durchgeführt, da es trotz spezifischer Filter für die Wellenlängenbereiche immer noch zu Überlappung der Emissionsspektren kommen kann. Die Aufnahme der Signale erfolgte mit der Software FACS Diva (Fa. BD, Version 6.1.3) und für die Auswertung wurde die Software FlowJo (Fa. Treestar, Version 9.6.4) benutzt.

Für die Markierung von extrazellulären oder intrazellulären Antigenen wurden frisches EDTA-Blut, isolierte PBMCs, Beckenkammaspirat, Lymphknoten-Feinnadelaspirat, isolierte MNCs aus Lymphknoten, Milz, Knochenmark aus dem Femur, BAL und Darm benutzt. Dabei wurden vom Vollblut und Knochenmarkaspirat 50µl pro Färbung eingesetzt. Von dem restlichen Material (frisch oder aufgetaut) wurden nach der Zellzählung ca. 500.000 Zellen in 50µl PBS pro Färbung eingesetzt. Die Färbung fand in speziellen Rundbodenröhrchen (Fa. BD) statt. In Tabelle 6-8 sind alle verwendeten Antikörper aufgelistet.

3.5.5.1 Färbung mit direkt Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern

Zu den 50µl Probe wurde in einem ersten Schritt das Antikörpergemisch zugegeben und für 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur (RTemp) inkubiert. Die Antikörper banden nun an passende Moleküle an der Oberfläche der Zellen. Eine Erythrozytenlyse (Fix/Lyse-Puffer) für 15min wurde angeschlossen. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1200rpm wurde der Überstand verworfen, eine erneute Zentrifugation mit PBS/0,5%BSA angeschlossen und die Probe final in 50µl PBS/0,5%BSA aufgenommen.

3.5.5.2 Färbung mit indirekt Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern

Diese Färbung war ähnlich wie die oben genannte Färbung. Vor dem finalen Schritt fand jedoch noch eine Gegenfärbung mit Streptavidin, an das ein Fluorochrom gekoppelt war, statt. Streptavidin band an den Biotin-gekoppelten Antikörper aus dem Antikörpergemisch des ersten Schrittes. Dies wurde 30min bei RTemp im Dunkeln inkubiert, anschließend mit PBS/0,5%BSA gewaschen und final in 50µl PBS/0,5%BSA aufgenommen.

3.5.5.3 Intrazelluläre Färbung

Die ersten Schritte der intrazellulären Färbung waren die gleichen wie bei den anderen Färbungen. Jedoch war es hier nach der Oberflächenfärbung zusätzlich notwendig, die Zellmembran zu permeabilisieren, damit spezielle Antikörper wie z.B. IL-21 ins Zellinnere gelangen konnten. Dazu wurde ein kombinierter Fixierungs- und Permeabilisierungsschritt mit dem Fix/Perm-Puffer für 20min bei RTemp im Dunkeln durchgeführt. Nach der Zentrifugation für 5min bei 1200rpm wurde eine weitere Waschung und Zentrifugation, diesmal mit einem Perm-Puffer, angeschlossen. In einem nächsten Schritt wurde dieser zur Probe zugegeben und für 15min bei RTemp im Dunkeln inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde der Antikörper, der ins Zellinnere gelangen soll, zugegeben und für

30min inkubiert. Die Probe wurde abschließend mit PBS/0,5%BSA zentrifugiert und final in 50µl PBS/0,5%BSA aufgenommen.

3.5.5.4 Färbung mit TruCOUNT™-Röhrchen

Zur Bestimmung von absoluten Zellzahlen wurden spezielle TruCOUNT™-Röhrchen (Fa. BD) benutzt, die über eine definierte Anzahl fluoreszierender Beads verfügen. Die Probe wurde vorsichtig oberhalb des Edelstahlankers pipettiert und darauf das Antikörpergemisch zugegeben. Dieses wurde für 15min im Dunkeln bei RTemp inkubiert. Anschließend wurde eine Erythrozytenlyse für 15min angeschlossen. Diese Proben mussten unverzüglich gemessen werden. Die Beads im Röhrchen lagen als Lyophilisat vor und wurden durch Zugabe der Probe und des Antikörpergemisches aufgelöst bzw. freigesetzt. Die absolute Zellzahl einer bestimmten Population pro µl in der Probe wurde zu den Beads normalisiert:

$$\frac{\text{Anzahl der aufgenommenen Zellpopulation}}{\text{Anzahl der aufgenommenen beads}} \times \frac{\text{Anzahl der definierten beads}}{\text{Testvolumen}}$$

3.5.5.6 Auflistung der verwendeten Antikörper**Tabelle 6: Verwendete Antikörper für die B-Zellfärbung.**

B-Zellen			
Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
CD3	SP34-2	AF700	BD
CD10	HI10a	APC-Cy7	BL
CD20	L27	PE-Cy7	BD
CD21	B-Ly4	FITC	BD
CD27	M-T271	APC	BD
CD45	TÜ116	PerCP	BD
CD45	D058-1283	V500	BD
CD80	L307.4	PE	BD
IgD-Biotin	polyklonal	BV570	SouthernBiotech
IgD-Biotin	polyklonal	V500	SouthernBiotech
lebend/tot	-	BV570	BL

AF, Alexa Fluor; APC, Allophycocyanin; APC-Cy7, Allophycocyanin-Cyanin7; BD, Becton Dickinson; BL, BioLegend; BV, Brilliant Violet; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PE-Cy7; Phycoerythrin-Cyanin7; PerCP, Peridinin-Chlorophyll-Protein.

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für die T-Zellfärbung.

T-Zellen			
Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
CD3	SP34-2	AF700	BD
CD4	L200	V450	BD
CD4	L 200	PerCP-Cy5.5	BD
CD8	3B5	PO	Invitrogen
CD8	RPA-T8	APC	BL
CD8	SK1	APC-Cy7	BD
CD28	CD28.2	FITC	BD
CD45RA	2H4	ECD	BC
CD69	TP1.55.3	ECD	BC
CD95-Biotin	DX 2	V500	BD
CD95	DX 2	PE-Cy7	BL
CD127	eBioRDR5	FITC	eBioscience
HLA-DR	L243	APC-Cy7	BD
IL-21	3A3-A2	APC	BL
PD-1	EH12.2H7	PE-Cy7	eBioscience

AF, Alexa Fluor; APC, Allophycocyanin; APC-Cy7, Allophycocyanin-Cyanin7; BC, Beckmann Coulter; BD, Becton Dickinson; BL, BioLegend; BV, Brilliant Violet; ECD, Energy Coupled Dye; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PE-Cy7; Phycoerythrin-Cyanin7; PerCP, Peridinin-chlorophyll-protein; PerCP-Cy5.5, Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cyanin5.5; PO, Pacific Orange.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper für die Färbung von Plasmazellen.

Plasmazellen			
Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
CD3	SP34-2	AF700	BD
CD10	HI10a	APC-Cy7	BL
CD19	J3.119	PE	BC
CD20	L27	PE-Cy7	BD
CD38	OKT10	APC	NIH
CD45	D058-1283	V500	BD
CD138	DL-101	FITC	eBioscience
lebend/tot	-	V450	Invitrogen

AF, Alexa Fluor; APC, Allophycocyanin; APC-Cy7, Allophycocyanin-Cyanin7; BC, Beckman Coulter; BD, Becton Dickinson; BL, BioLegend; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; NIH, National Institute of Health; PE, Phycoerythrin; PE-Cy7; Phycoerythrin-Cyanin7.

3.6 Neopterinmessung im Urin

Die Bestimmung von Neopterin im Urin spiegelt den Aktivierungszustand des zellulären Immunsystems wider. Bei viralen Infektionen wie z.B. HIV finden sich erhöhte Neopterinspiegel im Serum und auch im Urin [142], was als Marker in der Überwachung von HIV-Patienten genutzt wird. In einer Immunreaktion wird IFN- γ von aktivierten T-Zellen gebildet und regt seinerseits Makrophagen zur Neopterinproduktion an [143]. Dieses lässt sich dann im Serum und –bei einer intakten Nierenfunktion- im Urin messen. Da das Neopterin photolabil ist, muss es in dunklen Probengefäßen gesammelt werden oder mittels Aluminiumfolie geschützt werden. So wurde für die SIV-Studie an verschiedenen Zeitpunkten vor der Infektion und bis Tag 31 nach der Infektion Morgenurin gesammelt.

Die Analyse der Neopterin-Werte im Urin wurde von der Abteilung für Biologische Chemie von Prof. Dr. Fuchs durchgeführt und die Rohdaten wurden unserer Abteilung zur Verfügung gestellt. Die Analyse erfolgte dort mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) wie zuvor beschrieben [144]. Kurz zusammengefasst wird eine Umkehrphasenchromatographie mit C18-Säulen und Sörensen-Phosphatpuffer (0,015 M, pH = 6.4) als Laufmittel eingesetzt (Flussrate 1,0 ml/min.), dass eine rasche, empfindliche und genaue Messung erlaubt. 100 μ l Urin werden mit 1000 μ l Elutionspuffer gemischt, der 2g/l EDTA enthält, um eventuell vorhandenes Sediment aufzulösen. Neopterin wird durch Fluoreszenzmessung (Anregungsmaximum: 353nm, Emissionsmaximum: 438nm) und Kreatinin durch Messung der UV-Absorption bei 235nm erfasst. Physiologische Konzentrationsschwankungen des Urins werden durch den Bezug auf Kreatinin als internen Standard ausgeglichen. So wird immer der Quotient Neopterin (μ mol) pro Kreatinin (mol) angegeben.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism 5.0f für Mac OS 10.9 durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit dem SEM (Standardfehler um den Mittelwert, engl. *standard error of the mean*) oder der SD (Standardabweichung, engl. *standard deviation*) gezeigt. Für die Ermittlung von signifikanten Unterschieden wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test für nicht verbundene Daten und der gepaarte t-test für verbundene Daten verwandt. Für Korrelationsanalysen wurde die Spearman-Rang-Korrelation genutzt. Testergebnisse wurden als statistisch signifikant definiert, die ein Signifikanzniveau (p -Wert) kleiner als 0,05 hatten.

4. Ergebnisse

4.1 Vergleichende phänotypische und funktionelle Charakterisierung von B-Zellpopulationen und Plasmazellen in frischen und tiefgefrorenen Proben von PBMCs und MNCs aus Knochenmark, Milz, Lymphknoten und Darm

Aufbauend auf den von uns publizierten Ergebnissen zur Charakterisierung von B-Zellen und Plasmazellen in frischen PBMCs, Knochenmark und sekundären lymphatischen Organen mit Hilfe der polychromatischen Durchflusszytometrie [145, 146] sollte in dieser Doktorarbeit anschließend eine Querschnittsanalyse mit einer umfassenden phänotypischen Charakterisierung von B-Zellpopulationen und Plasmazellen in kryokonservierten Proben von SIV-infizierten Rhesusmakaken aus unterschiedlichen Infektionsstudien durchgeführt werden.

Bei den ersten Färbungen und Analysen zeigte sich bei den aufgetauten Proben im Vergleich zu frischem Material jedoch ein deutlicher Unterschied. Dieses betraf v.a. die Gedächtnis-B-Zellpopulationen, bei denen ein Verlust von CD27 auf der Zelloberfläche beobachtet wurde. Daraufhin wurde der Fokus des kryokonservierten Materials verlegt und eine systematische Studie mit einer Kohorte von 12 SIV-negativen Rhesusaffen mit Material aus den Sektionen angeschlossen. Hier sollte die phänotypische Charakterisierung vergleichend zwischen frischem und dazugehörigem kryokonserviertem Material durchgeführt werden, um die Verwendbarkeit von eingefrorenem Material zu evaluieren. Die Ergebnisse haben wir in Teilen schon publiziert [145].

4.1.1 Gating-Strategie der B-Zellpopulationen

Im Bereich der durchflusszytometrischen Analysen ist ein Gate im Folgenden definiert als Region zur Identifizierung einer Teilmenge von Ereignissen (engl. *events*) an einer vorangegangenen Population. Das Gating ist folgerichtig das dazugehörige Schema.

Eine exemplarische Gating-Strategie für jedes untersuchte Organ, mit der die wichtigsten B-Zellpopulationen adäquat erfasst werden, ist in Abbildung 12 gezeigt. Diese Gating-Strategie musste für die tiefgefrorenen Proben in einigen Punkten angepasst werden. So erfolgte bei dieser für die Doktorarbeit verwendeten Vergleichsstudie die Charakterisierung der Lymphozyten nicht über CD45 und einen niedrigen SSC-A, sondern über die Kombination eines niedrigen FSC-A und SSC-A. Beide verfügbaren monoklonalen Antikörper für CD45 lieferten durchflusszytometrisch keine ausreichende Trennung der negativen und positiven Population. Gleiches galt für CD80 als Aktivierungsmarker auf B-Zellen, weshalb dieser bei der späteren Analyse ausgeschlossen wurde.

In einem ersten Schritt des Gatings wurden die Lymphozyten anhand eines niedrigen FSC-A und SSC-A erfasst. Nach Ausschluss der Dubletten zur adäquaten ausschließlichen Erfassung von Einzelzellen (engl. *singlets*) wurden lebende und tote Zellen diskriminiert. Die lebenden Zellen wurden anschließend über CD10 in reife und unreife Zellen unterschieden. Unreife CD10⁺ Zellen wurden weiter auf CD20 Expression analysiert, um unreife B-Zellen prozentual zu erfassen. Reife Zellen haben die CD10 Expression auf der Oberfläche verloren, sind somit CD10⁻. Die Population wurde dann weiterhin nach CD3 und CD20 Expression diskriminiert, wobei ersterer ein typischer T-Zell-Marker und letzterer ein klassischer B-Zell-Marker bei Rhesusaffen ist. Die CD20⁺ B-Zellen wurden dann nach CD21 und CD27 Expression unterschieden. Diese Einteilung erlaubt die Differenzierung zwischen naiven CD21⁺CD27⁻ B-Zellen, ruhenden CD21⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen, aktivierten CD21⁻CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen und Gewebe-ähnlichen CD21⁻CD27⁻ Gedächtnis-B-Zellen [147]. Exemplarische Dot Plots hierzu für frische und kryokonservierte MNCs aus Organen sind in Abbildung 13 dargestellt.

Ebenfalls von B-Zellen ausgehend wurden Zellen identifiziert, die unterschiedliche Klassen von Immunglobulinen sezernieren. Dabei bestehen die $\text{IgD}^- \text{CD27}^+$ Zellen aus den Gedächtnis-B-Zellen, die bereits eine Klassenänderung durchgeführt haben und somit IgG oder IgA-sezernierende B-Zellen darstellen, wohingegen die $\text{IgD}^+ \text{CD27}^+$ Population diejenigen B-Zellen sind, die vornehmlich IgM sezernieren [148, 149]. Exemplarische Dot Plots für kryokonservierte Proben sind ebenfalls in Abbildung 13 gezeigt.

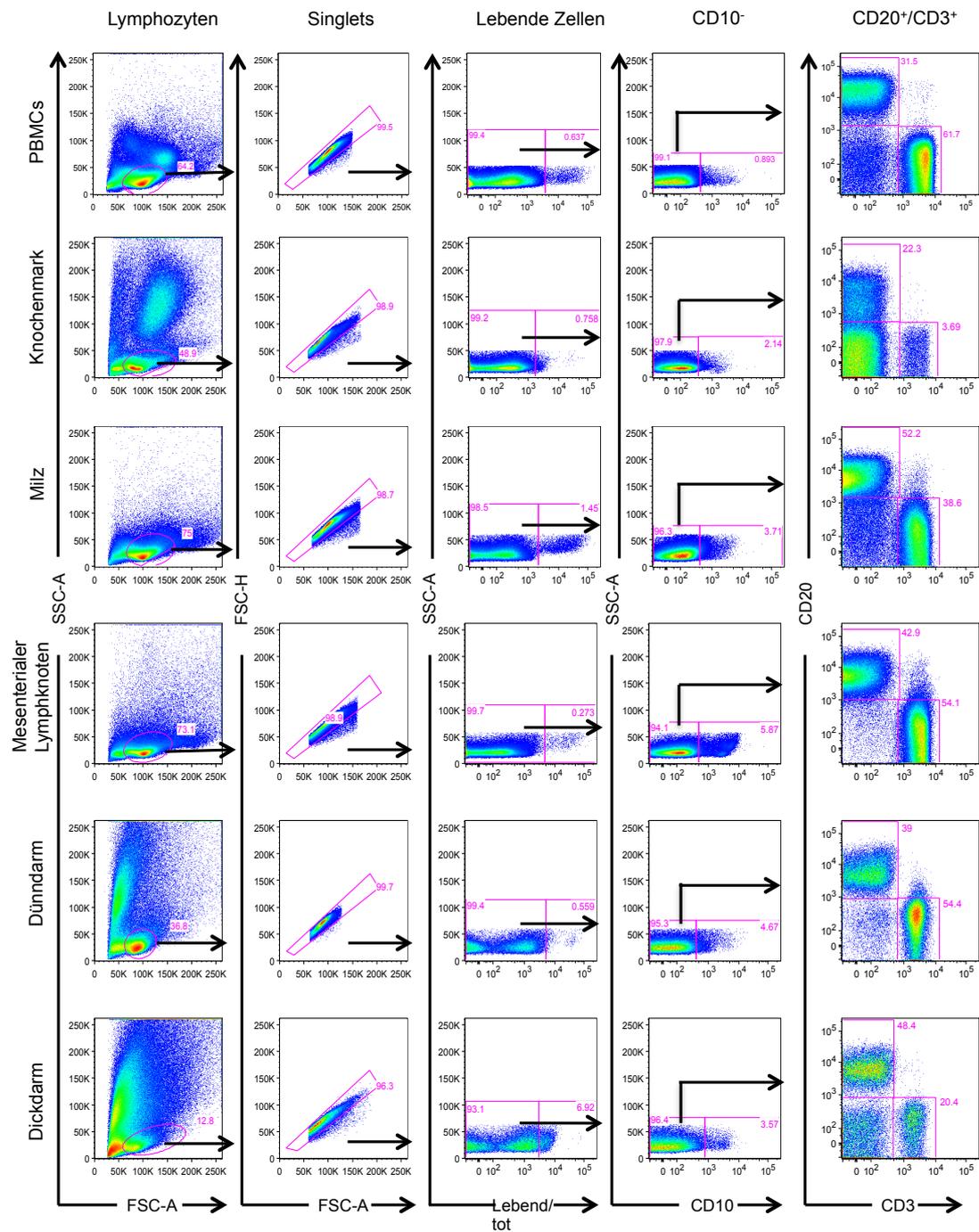


Abbildung 12: Gating-Strategie der B-Zellen in den einzelnen Organen in kryokonservierten Proben. Dargestellt sind exemplarische Dot Plots der verschiedenen Zellpopulationen in PBMCs, Knochenmark, Milz, mesenterialem Lymphknoten, in Dün- und Dickdarm. Rosa Linien markieren ein Gate, die Menge der darin enthaltenden Events ist als prozentualer Anteil an der vorherigen Population angegeben. Identifiziert werden CD3⁺ T-Zellen oder CD20⁺ B-Zellen über eine vorherige Charakterisierung von Lymphozyten, Einzelzellen, lebenden Zellen und CD10⁻ Zellen.

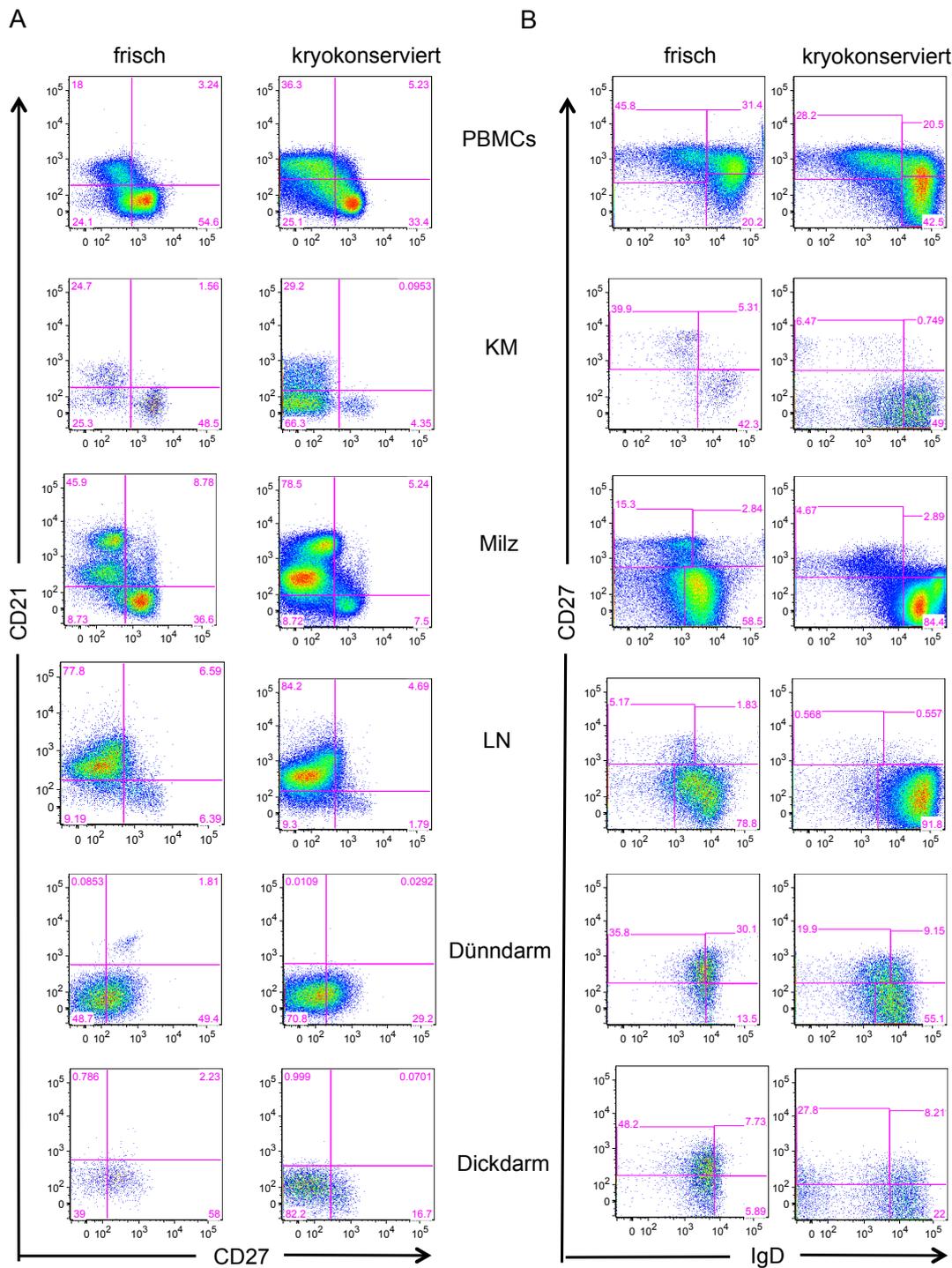


Abbildung 13: Exemplarische Dot Plots zur Unterteilung der CD20⁺ Subpopulationen. Dargestellt sind Dot Plots der verschiedenen Zellpopulationen in PBMCs, Knochenmark, Milz, mesenterialem Lymphknoten, in Dün- und Dickdarm. Rosa Linien markieren ein Gate, die Menge der darin enthaltenen Events ist als prozentualer Anteil an der vorherigen Population angegeben. Von CD20⁺ B-Zellen allgemein werden B-Zell-Populationen nach CD21 und CD27 Expression (A) und nach CD27 und IgD Expression in (B) in frischen und zugehörigen kryokonservierten Proben gezeigt.

4.1.2 Vergleich der prozentualen Anteile von B-Zellen und Subpopulationen in frischen und kryokonservierten Proben von Blut und verschiedenen Organen

Im Folgenden Abschnitt liegt der Fokus auf dem Vergleich der prozentualen Anteile von CD20⁺ B-Zellen generell und speziellen B-Zellpopulationen im Blut und in verschiedenen Organen, die vergleichend zwischen frischem und tiefgefrorenem Material aufgelistet sind (Tabelle 9). So sollen mögliche Veränderungen durch die Kryokonservierung evaluiert werden. Im Folgenden sind die Werte als Mittelwert in Prozent \pm Standardfehler in Prozent dargestellt.

Bei der Analyse der CD20⁺ B-Zellen als prozentualer Anteil an den CD10⁻ reifen Lymphozyten fiel auf, dass es im KM (frisch 8.4% \pm 3.4 vs. tiefgefroren 16.2% \pm 4.7, $p=0.0004$), in der Milz (frisch 30.7% \pm 7.6 vs. tiefgefroren 54.9% \pm 10.3, $p < 0.0001$), im Lymphknoten (frisch 16.2% \pm 7.1 vs. tiefgefroren 33.6% \pm 9.5, $p=0.0003$) und Dickdarm (frisch 11.3% \pm 5.5 vs. tiefgefroren 29.7% \pm 10.0, $p < 0.0001$) zu einem signifikanten Anstieg nach Kryokonservierung gekommen ist. Im Dünndarm kam es auch zu einem prozentualen Anstieg (frisch 25.8% \pm 17.5 vs. gefroren 38.9% \pm 22.4), der jedoch nicht statistisch signifikant war. Im Gegenteil hierzu gab es keinen signifikanten Unterschied der Anteile der B-Zellen zwischen frischen und kryokonservierten PBMCs (frisch 34.4% \pm 8.0 vs. tiefgefroren 38.8% \pm 7.9).

Die unreifen CD10⁺CD20⁺ B Zellen waren im Vergleich zu frischem KM in kryokonserviertem KM fünffach erniedrigt ($p < 0.0001$). In Dün- und Dickdarm waren sie ebenfalls erniedrigt, wenngleich nicht statistisch signifikant. In PBMCs und den sekundären lymphatischen Organen gab es keinen signifikanten Unterschied.

Die deutlichsten Veränderungen nach Kryokonservierung betrafen alle Zellpopulationen, die CD27 auf der Oberfläche tragen. So gab es einen massiven Verlust an aktivierten Gedächtnis B-Zellen in tiefgefrorenen Proben von (am stärksten betroffenen) KM (frisch 46.5% \pm 17.7 vs. tiefgefroren 6.1% \pm 6.2, $p < 0.0001$), PBMCs (frisch 56.3% \pm 11.6 vs. tiefgefroren 34.4% \pm 10.6, $p=0.0006$), Milz (frisch 30.6% \pm 7.5 vs. tiefgefroren 7.8% \pm 3.6, p

<0.0001), LN (frisch 5.2% ± 2.7 vs. tiefgefroren 2.1% ± 1.7, $p=0.0061$), Dünndarm (frisch 56.2% ± 21.3 vs. tiefgefroren 21.5% ± 15.1, $p=0.0070$) und Dickdarm (frisch 58.7% ± 13.6 vs. tiefgefroren 19.1% ± 10.1, $p < 0.0001$).

Das gleiche Phänomen war bei den meisten Organen auch für die ruhenden Gedächtnis-B-Zellen zu beobachten, deren Spiegel (in %) ebenfalls signifikant niedriger in kryokonservierten Proben waren (PBMCs: frisch 3.4% ± 1.1 vs. tiefgefroren 3.6% ± 1.4, $p=0.7950$; KM: frisch 2.1% ± 1.1 vs. tiefgefroren 0.3% ± 0.2, $p=0.0001$; Milz: frisch 10.0% ± 3.1 vs. tiefgefroren 6.1% ± 3.0, $p=0.0073$; Dünndarm: frisch 1.9% ± 1.9 vs. tiefgefroren 0.1% ± 0.1, $p=0.0111$; Dickdarm: frisch 6.1% ± 9.7 vs. tiefgefroren 0.2% ± 0.1, $p < 0.0001$; LN: frisch 9.1% ± 5.7 vs. tiefgefroren 5.5% ± 3.3, $p=0.1259$, keine statistische Signifikanz).

Die Proportion der Gewebe-ähnlichen Gedächtnis-B-Zellen zeigte dagegen prozentual höhere Werte in kryokonservierten PBMCs ($p=0.0024$). Im KM ($p=0.0002$), Dünndarm ($p=0.0070$) und Dickdarm ($p < 0.0001$) verdoppelten sich die Prozentzahlen jeweils. Diese Population war nach Kryokonservierung in sekundären lymphatischen Organen nicht signifikant verändert.

Die Prozentzahlen der reifen naiven B-Zellen wiesen signifikant höhere Werte in kryokonservierten PBMCs ($p=0.0073$), Milz ($p < 0.0001$) und Dickdarm ($p=0.0376$) auf. CD21⁺CD27⁻ B-Zellen im KM, LN und Dünndarm waren nicht signifikant verändert.

Bei der Analyse der IgG/IgA-sezernierenden B-Zellen war ein bis zur Hälfte reduzierter Prozentsatz dieser Population in kryokonservierten PBMCs ($p=0.0004$), Milz ($p=0.0006$), LN ($p=0.0002$) und Dünndarm ($p=0.0379$) zu beobachten, wohingegen der Dickdarm davon nicht betroffen war. Ähnlich zu den anderen Ergebnissen war auch hier KM am stärksten betroffen mit einem neunfachen Verlust in kryokonserviertem Material.

Gleichzeitig waren die Prozentzahlen der IgM-sezernierenden Zellen um die Hälfte in kryokonservierten PBMCs ($p=0.0120$), Milz ($p=0.0130$), LN ($p=0.0166$), Dünndarm ($p=0.0111$) und um das Dreifache im Dickdarm ($p=0.0015$) reduziert. Im KM ($p < 0.0001$) war ein ca. 17-facher Verlust an IgM-sezernierenden Zellen in kryokonservierten Proben zu verzeichnen.

Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass $CD20^+$ B-Zellen in PBMCs nach Kryokonservierung stabil blieben, jedoch prozentual in allen anderen Organen anstiegen. Bezüglich der Expression des Markers CD27 war in PBMCs und allen Organen ein Verlust nach Kryokonservierung zu beobachten, der somit zu einem prozentualen Verlust aller Populationen führte, die CD27 auf der Oberfläche exprimierten.

4.1.3 Gating-Strategie der Plasmazellen

Die Gating-Strategie ist in Abbildung 14 dargestellt. Dem Ausschluss der Dubletten folgte die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Nach Identifizierung der $CD19^+CD20^-$ Zellen wurden $CD38^+CD138^+$ Plasmazellen erfasst [150].

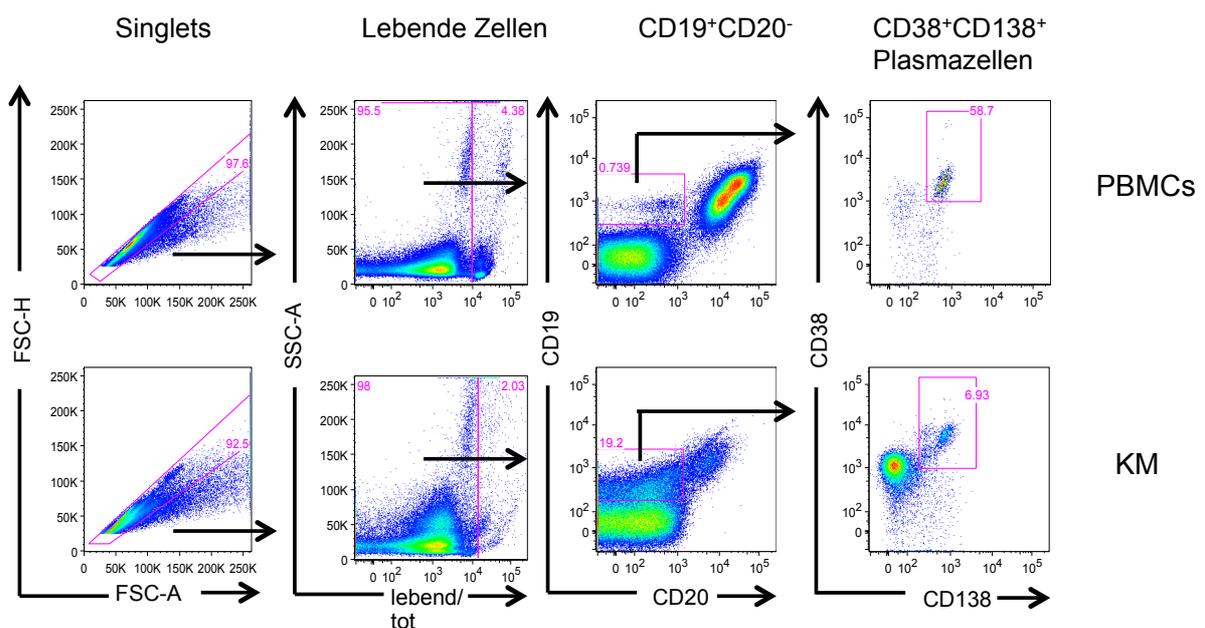


Abbildung 14: Gating-Strategie der Plasmazellen in kryokonservierten Proben von PBMCs und KM. Dargestellt sind exemplarische Dot Plots der verschiedenen Zellpopulationen in PBMCs und KM. Rosa Linien markieren ein Gate, die Menge der darin enthaltenen Events ist als prozentualer Anteil an der vorherigen Population angegeben. Identifiziert werden $CD38^+CD138^+$ Plasmazellen über Einzelzellen, lebende Zellen und $CD19^+CD20^-$ Zellen.

4.1.4 Vergleich der prozentualen Anteile von Plasmazellen in frischen und kryokonservierten Proben von PBMCs und KM

Aus dem gleichen Grund wie B-Zellen und Subpopulationen wurden auch Plasmablasten sowie Plasmazellen in PBMCs und KM vergleichend in frischen und tiefgefrorenen Proben untersucht. Die CD19⁺CD20⁻ Population war in frischen (0.5% ± 0.1) und kryokonservierten PBMCs (0.5% ± 0.3) vergleichbar, im KM dagegen gab es vierfach höhere Werte in kryokonservierten Proben (frisch 5.0% ± 2.1 vs. tiefgefroren 20.9% ± 11.2, $p=0.0002$).

In frischen Proben von PBMCs und KM war es möglich, eine CD38⁺CD138⁺ Zellpopulation und eine CD38⁺⁺CD138⁺⁺ Population abzutrennen, die Plasmablasten bzw. Plasmazellen charakterisierten. Leider war diese Separation bei kryokonserviertem Material nicht möglich, weswegen nur eine CD38⁺CD138⁺ Population mit geringer Fluoreszenzintensität definiert werden konnte (Abbildung 16). Bei Proben von PBMCs und KM konnte ein vierfacher Verlust dieser Population als Prozentzahl aller Zellen nach Kryokonservierung beobachtet werden (PBMCs: frisch 0.2% ± 0.1 vs. tiefgefroren 0.06% ± 0.1, $p=0.0005$; KM: frisch 4.0% ± 1.9 vs. tiefgefroren 1.0% ± 0.6, $p < 0.0001$).

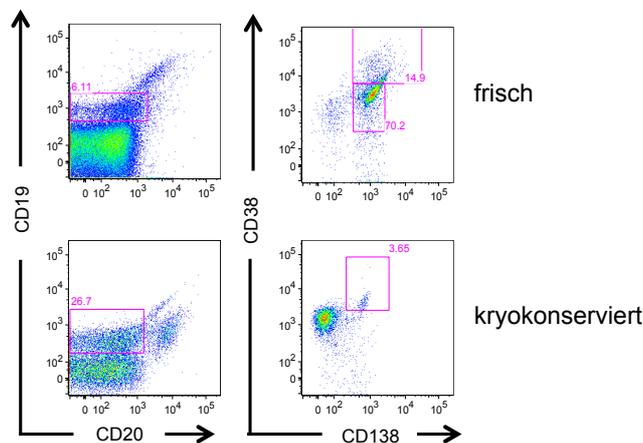


Abbildung 15: Exemplarische Dot Plots der CD19⁺CD20⁻ und CD38⁺CD138⁺ Zellpopulationen in frischen und kryokonservierten Zellsuspensionen von KM. Rosa Linien markieren ein Gate, die Menge der darin enthaltenden Events ist als prozentualer Anteil an der vorherigen Population angegeben. Die Dot Plots der oberen Reihe zeigen die CD19⁺CD20⁻ Population und die CD38⁺⁺CD138⁺⁺ Plasmazellen sowie die CD38⁺CD138⁺ Plasmablasten in einer frischen KM-Probe. In der unteren Reihe sind die gleichen Populationen in der zugehörigen kryokonservierten KM-Probe dargestellt. In kryokonserviertem Material lässt sich bezüglich der Plasmablasten und Plasmazellen keine klare Trennung erkennen, weswegen nur ein Gate gesetzt wurde.

Tabelle 9: Prozentzahlen der verschiedenen B-Zellpopulationen und Plasmazellen im Vergleich zwischen frischen und tiefgefrorenen Proben.

Organ und Population	frisch	kryokonserviert	p-Wert
PBMCs (n=12)			
CD20 ⁺	34.4 ± 8.0	38.8 ± 7.9	0.1746
CD20 ⁺ CD10 ⁺ (unreife B Zellen)	2.4 ± 1.2	2.5 ± 0.7	0.6860
CD21 ⁺ CD27 ⁻ (naive B Zellen)	18.3 ± 8.0	30.6 ± 9.7	0.0073
CD21 ⁺ CD27 ⁺ (ruhende Gedächtnis-B-Zellen)	3.4 ± 1.1	3.6 ± 1.4	0.7950
CD21 ⁺ CD27 ⁺ (aktivierte Gedächtnis-B-Zellen)	56.3 ± 11.6	34.4 ± 10.6	0.0006
CD21 ⁺ CD27 ⁻ (Gewebe-ähnliche Gedächtnis-B-Zellen)	21.8 ± 5.2	31.3 ± 7.2	0.0024
CD20 ⁺ CD27 ⁺	59.6 ± 13.1	36.8 ± 10.5	0.0005
CD3 ⁺ CD27 ⁺	95.0 ± 2.0	76.9 ± 8.8	< 0.0001
CD27 ⁺ IgD ⁻ (IgG-/IgA-sezernierende B-Zellen)	43.6 ± 9.0	25.3 ± 9.3	0.0004
CD27 ⁺ IgD ⁺ (IgM-sezernierende B-Zellen)	23.2 ± 7.5	16.7 ± 3.9	0.0120
CD27 ⁺ IgD ⁺ (naive B-Zellen)	29.1 ± 8.1	52.8 ± 12.5	0.0004
CD19 ⁺ CD20 ⁻	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.3	0.7290
CD38 ⁺ CD138 ⁺ (Plasmazellen)	0.2 ± 0.1	0.06 ± 0.1	0.0005
Knochenmark (n=12)			
CD20 ⁺	8.4 ± 3.4	16.2 ± 4.7	0.0004
CD20 ⁺ CD10 ⁺ (unreife B Zellen)	9.3 ± 3.0	2.0 ± 0.4	< 0.0001
CD21 ⁺ CD27 ⁻ (naive B Zellen)	23.7 ± 6.4	26.9 ± 11.2	0.4883
CD21 ⁺ CD27 ⁺ (ruhende Gedächtnis-B-Zellen)	2.1 ± 1.1	0.3 ± 0.2	0.0001
CD21 ⁺ CD27 ⁺ (aktivierte Gedächtnis-B-Zellen)	46.5 ± 17.7	6.1 ± 6.2	< 0.0001
CD21 ⁺ CD27 ⁻ (Gewebe-ähnliche Gedächtnis-B-Zellen)	27.5 ± 14.8	66.6 ± 13.6	0.0002
CD20 ⁺ CD27 ⁺	49.9 ± 18.3	7.4 ± 6.7	< 0.0001
CD3 ⁺ CD27 ⁺	93.4 ± 5.3	77.0 ± 11.4	0.0002
CD27 ⁺ IgD ⁻ (IgG-/IgA-sezernierende B-Zellen)	44.3 ± 16.8	5.8 ± 6.0	< 0.0001
CD27 ⁺ IgD ⁺ (IgM-sezernierende B-Zellen)	5.1 ± 2.9	0.3 ± 0.3	< 0.0001
CD27 ⁺ IgD ⁺ (naive B-Zellen)	34.0 ± 9.8	36.0 ± 19.3	0.4705
CD19 ⁺ CD20 ⁻	5.0 ± 2.1	20.9 ± 11.2	0.0002
CD38 ⁺ CD138 ⁺ (Plasmazellen)	4.0 ± 1.9	1.0 ± 0.6	< 0.0001

Milz (n=12)			
CD20 ⁺	30.0 ± 7.6	54.9 ± 10.3	< 0.0001
CD20 ⁺ CD10 ⁺ (unreife B Zellen)	4.6 ± 1.7	4.0 ± 1.9	0.3555
CD21 ⁺ CD27 ⁻ (naive B Zellen)	44.9 ± 9.2	71.5 ± 8.5	< 0.0001
CD21 ⁺ CD27 ⁺ (ruhende Gedächtnis-B-Zellen)	10.0 ± 3.1	6.1 ± 3.0	0.0073
CD21 ⁻ CD27 ⁺ (aktivierte Gedächtnis-B-Zellen)	30.6 ± 7.5	7.8 ± 3.6	< 0.0001
CD21 ⁻ CD27 ⁻ (Gewebe-ähnliche Gedächtnis-B-Zellen)	14.3 ± 5.2	14.4 ± 4.9	0.9770
CD20 ⁺ CD27 ⁺	40.9 ± 10.3	12.6 ± 7.1	< 0.0001
CD3 ⁺ CD27 ⁺	94.4 ± 1.9	80.8 ± 14.8	0.0003
CD27 ⁺ IgD ⁻ (IgG-/IgA- sezernierende B-Zellen)	27.4 ± 7.3	11.7 ± 7.8	0.0006
CD27 ⁺ IgD ⁺ (IgM-sezernierende B-Zellen)	10.2 ± 3.7	6.7 ± 3.9	0.0130
CD27 ⁻ IgD ⁺ (naive B-Zellen)	48.9 ± 8.8	66.6 ± 12.1	0.0014
Mesenterialer Lymphknoten (n=12)			
CD20 ⁺	16.2 ± 7.1	33.6 ± 9.5	0.0003
CD20 ⁺ CD10 ⁺ (unreife B Zellen)	5.6 ± 1.5	6.2 ± 1.9	0.6650
CD21 ⁺ CD27 ⁻ (naive B Zellen)	76.4 ± 9.7	79.8 ± 10.1	0.3123
CD21 ⁺ CD27 ⁺ (ruhende Gedächtnis- B-Zellen)	9.1 ± 5.7	5.5 ± 3.3	0.1259
CD21 ⁻ CD27 ⁺ (aktivierte Gedächtnis-B-Zellen)	5.2 ± 2.7	2.1 ± 1.7	0.0061
CD21 ⁻ CD27 ⁻ (Gewebe-ähnliche Gedächtnis-B-Zellen)	9.2 ± 3.5	12.5 ± 7.1	0.2481
CD20 ⁺ CD27 ⁺	13.6 ± 7.4	6.0 ± 3.5	0.0073
CD3 ⁺ CD27 ⁺	96.8 ± 1.5	82.8 ± 6.8	< 0.0001
CD27 ⁺ IgD ⁻ (IgG-/IgA- sezernierende B-Zellen)	5.0 ± 2.6	0.8 ± 0.8	0.0002
CD27 ⁺ IgD ⁺ (IgM-sezernierende B-Zellen)	1.9 ± 1.2	0.8 ± 0.7	0.0166
CD27 ⁻ IgD ⁺ (naive B-Zellen)	78.1 ± 6.0	83.7 ± 12.0	0.1409
Dünndarm (n=7)			
CD20 ⁺	25.8 ± 17.5	38.9 ± 22.4	0.2086
CD20 ⁺ CD10 ⁺ (unreife B Zellen)	13.3 ± 10.3	5.3 ± 1.5	0.3062
CD21 ⁺ CD27 ⁻ (naive B Zellen)	0.6 ± 1.1	0.4 ± 0.5	0.7012
CD21 ⁺ CD27 ⁺ (ruhende Gedächtnis- B-Zellen)	1.9 ± 1.9	0.1 ± 0.1	0.0111
CD21 ⁻ CD27 ⁺ (aktivierte Gedächtnis-B-Zellen)	56.2 ± 21.3	21.5 ± 15.1	0.0070

CD21 ⁻ CD27 ⁻ (Gewebe-ähnliche Gedächtnis-B-Zellen)	41.1 ± 21.3	77.6 ± 14.9	0.0070
CD20 ⁺ CD27 ⁺	60.4 ± 20.8	23.4 ± 15.3	0.0070
CD3 ⁺ CD27 ⁺	74.1 ± 16.5	37.4 ± 14.3	0.0041
CD27 ⁺ IgD ⁻ (IgG-/IgA-sezernierende B-Zellen)	35.4 ± 16.7	18.2 ± 12.9	0.0379
CD27 ⁺ IgD ⁺ IgM-sezernierende B-Zellen	11.2 ± 5.6	4.2 ± 3.2	0.0111
CD27 ⁺ IgD ⁺ (naive B-Zellen)	8.5 ± 4.8	30.8 ± 18.7	0.0041
Dickdarm (n=10)			
CD20 ⁺	11.3 ± 5.5	29.7 ± 10.0	< 0.0001
CD20 ⁺ CD10 ⁺ (unreife B Zellen)	13.8 ± 10.7	7.4 ± 4.0	0.1655
CD21 ⁺ CD27 ⁻ (naive B Zellen)	0.6 ± 0.7	1.3 ± 0.7	0.0376
CD21 ⁺ CD27 ⁺ (ruhende Gedächtnis-B-Zellen)	6.1 ± 9.7	0.2 ± 0.1	< 0.0001
CD21 ⁺ CD27 ⁺ (aktivierte Gedächtnis-B-Zellen)	58.7 ± 13.6	19.1 ± 10.1	< 0.0001
CD21 ⁻ CD27 ⁻ (Gewebe-ähnliche Gedächtnis-B-Zellen)	34.5 ± 8.3	79.2 ± 9.9	< 0.0001
CD20 ⁺ CD27 ⁺	67.1 ± 8.2	19.6 ± 11.0	< 0.0001
CD3 ⁺ CD27 ⁺	90.1 ± 8.1	65.1 ± 12.6	0.0001
CD27 ⁺ IgD ⁻ (IgG-/IgA-sezernierende B-Zellen)	36.3 ± 7.4	35.7 ± 12.5	0.7394
CD27 ⁺ IgD ⁺ (IgM-sezernierende B-Zellen)	18.3 ± 11.0	5.7 ± 1.7	0.0015
CD27 ⁺ IgD ⁺ (naive B-Zellen)	13.1 ± 5.2	14.2 ± 10.3	1.0000

Die Prozentzahlen sind als Mittelwerte mit dem Standardfehler dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede (ab $p < 0.05$), ermittelt mit dem Mann-Whitney-U-Test sind fett gedruckt.

4.1.5 Funktioneller Vergleich zwischen frischen und tiefgefrorenen PBMCs

Die Auswertung der quantitativen Bestimmung von IgG- und IgA-sezernierenden Zellen normiert auf 10^6 PBMCs (n=5) ergab eine geringere Anzahl von ASC in kryokonservierten im Vergleich zu frischen Proben (IgG: frisch 188.6 ± 74.3 vs. tiefgefroren ohne Ruhephase 69.6 ± 12.4 ; IgA: frisch 361.2 ± 101.1 vs. tiefgefroren ohne Ruhephase 255 ± 83.3). Dieses ließ sich ebenfalls beobachten, wenn vor dem Ansatz des B-Zell-ELISpots eine zweistündige

Ruhephase für die Zellen eingehalten wurde (IgG: 123.4 ± 49.3 ; IgA: 298.6 ± 162.4), obgleich diese zu einem besseren Erhalt der ASC geführt hat (Abbildung 16A+B).

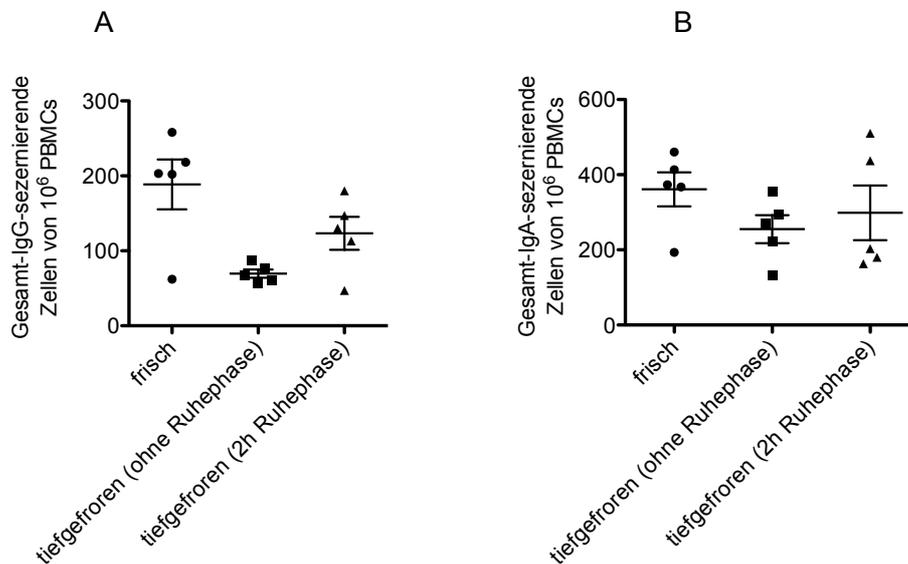


Abbildung 16: Vergleich der quantitativen Bestimmung von Gesamt-IgG und Gesamt-IgA ASC zwischen frischen und tiefgefrorenen PBMCs mit und ohne Ruhephase. Auf der x-Achse sind die frischen und kryokonservierten Proben ohne Ruhephase und mit einer zweistündigen Ruhephase bei 37°C unterschieden. Auf der y-Achse sind die Anzahl der Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen (A) und Gesamt-IgA-sezernierenden Zellen (B) von 10^6 PBMCs aufgetragen. Querstriche demonstrieren Mittelwerte, die Vertikalbalken den Standardfehler.

4.2 Analyse von CD138 als möglichem Marker zur Charakterisierung von Plasmazellen von Rhesusmakaken

Im Rahmen der phänotypischen Charakterisierung von B-Zellen wurden auch Plasmablasten/Plasmazellen berücksichtigt. Im Vorfeld musste jedoch untersucht werden, welchen Phänotyp Plasmazellen im RM aufweisen, da diese Population zu Beginn dieser Doktorarbeit im RM noch nicht ausreichend charakterisiert war. Als möglicher Marker wurde CD138 in Betracht gezogen, da Plasmazellen im humanen System v.a. über diesen klassischen Marker definiert sind [151], dessen Expression mit dem Reifegrad der Zellen steigt [152]. CD138 steht für Syndecan-1, ein Mitglied der transmembranen Proteoglykan-

Familie und ist zuständig für Zell-zu-Zell Adhäsion und zytoskelettale Organisation sowie Zell-Matrix-Interaktionen.

Anschließend zur phänotypischen Charakterisierung musste ein funktioneller Nachweis erbracht werden, der zeigte, dass CD138⁺ Zellen tatsächlich Plasmazellen darstellen. Plasmazellen sezernieren spontan Ak, somit musste dies für CD138⁺ Zellen bewiesen werden. Dazu wurden CD138⁺ Zellen aus PBMCs mittels magnetischer Separation angereichert und anschließend im B-Zell-ELISpot eingesetzt (n=8). Die Ergebnisse dieser phänotypischen und funktionellen Charakterisierung wurden von uns bereits publiziert [145]. Der Nachweis über die Reinheit erfolgte indirekt mittels durchflusszytometrischer Analyse. In Abbildung 17 sind zwei exemplarische Dot Plots gezeigt; der linke stellt PBMCs vor der magnetischen Aufreinigung, der rechte das CD138⁻ Eluat dar. Im rechten Plot sind nahezu keine CD138⁺ Zellen mehr vorhanden.

In den PBMCs befanden sich vor der Aufreinigung noch 0.76% ± 0.18 CD138⁺ Zellen, in der unmarkierten CD138⁻ Fraktion dagegen nur 0.11% ± 0.02 ($p=0.0002$) (siehe Abbildung 18). Die CD138⁺ aufgereinigten Zellen lieferten durchflusszytometrisch leider keine verlässlichen Ergebnisse, da die magnetischen Beads die Analyse verfälschten. Somit sind die Ergebnisse dieser Fraktion nur im ELISpot gezeigt. Der Nachweis über die Reinheit erfolgte demnach indirekt.

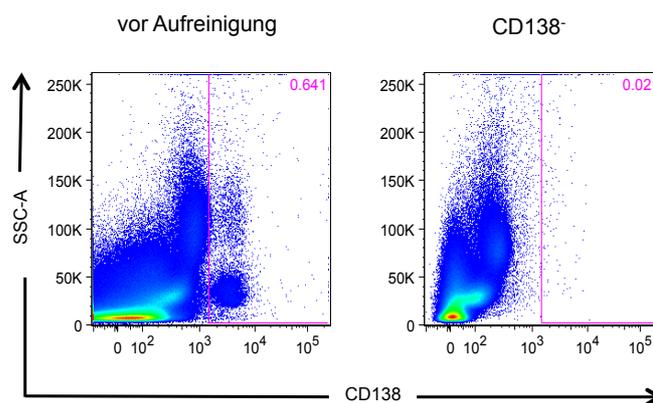


Abbildung 17: Exemplarische Dot Plots von PBMCs vor und nach der magnetischen Separation der CD138⁺ Zellen. Dargestellt ist links der Dot Plot einer Probe vor der magnetischen Aufreinigung der CD138⁺ Plasmazellen und rechts das CD138⁻ Eluat der gleichen Probe nach der magnetischen Aufreinigung. Rosa Linien markieren das CD138⁺ Plasmazell-Gate, die Menge der darin enthaltenden Events ist als prozentualer Anteil an der vorherigen Population angegeben.

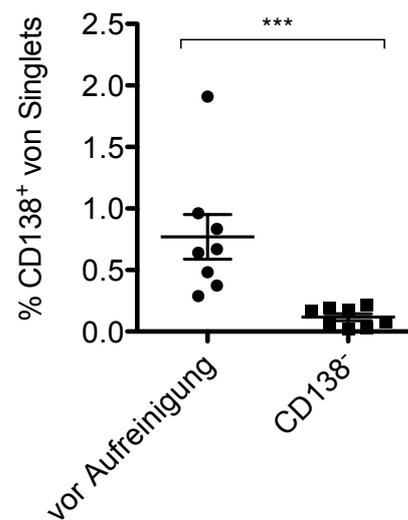


Abbildung 18: Prozentualer Anteil von CD138⁺ Zellen in Proben vor und nach der magnetischen Aufreinigung (n=8). Auf der x-Achse sind die Proben vor der Aufreinigung und die CD138⁻ Eluate nach der Aufreinigung dargestellt. Auf der y-Achse sind die Anteile der CD138⁺ Plasmazellen als Prozent der Singlets angegeben. Querstriche demonstrieren Mittelwerte, die Vertikalbalken den Standardfehler. Der Querbalken demonstriert den signifikanten Unterschied von *** $p < 0.001$ nach dem Mann-Whitney-U-Test.

Die Ergebnisse aus dem B-Zell-ELISpot sind der Abbildung 19 zu entnehmen. Vor Aufreinigung lag die Anzahl von Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen an 10^6 PBMCs bei 382 ± 99 , nach der Separation bei 331 ± 45 im CD138⁻ Eluat und bei 1785 ± 346 in der CD138⁺ aufgereinigten Fraktion. Somit ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den CD138⁺ Zellen und dem CD138⁻ Eluat ($p=0.0009$) sowie den Zellen vor der Aufreinigung ($p = 0.0109$).

Zusammenfassend ist zu nennen, dass CD138 ein geeigneter Marker für die Charakterisierung von Plasmazellen im RM ist, da CD138⁺ Zellen spontan IgG sezernieren.

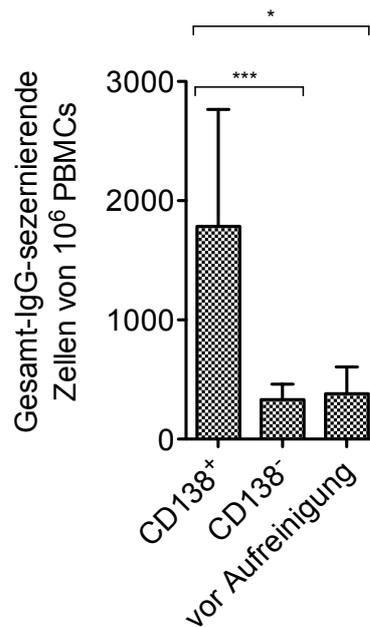


Abbildung 19: Anzahl der Gesamt-IgG-sezernierende Zellen in den Fraktionen vor und nach der magnetischen Separation der CD138⁺ Plasmazellen (n=8). Auf der x-Achse sind die Proben vor der Aufreinigung und die CD138⁻ Eluate sowie die CD138⁺ aufgereinigten Proben nach der Separation aufgetragen. Auf der y-Achse sind die Anzahl der Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen von 10⁶ PBMCs dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte mit der Standardabweichung. Die Querbalken demonstrieren die signifikanten Unterschiede zwischen den Fraktionen nach dem Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

4.3 Pathogenesestudie mit einer SIV-*nef*-Mutante und einer SIV-*vpr*-

Deletionsmutante im Rhesusaffenmodell

Eine SIV-Studie wurde longitudinal bis Woche 52 nach Infektion in Hinblick auf Krankheitsprogression sowie immunologische und virologische Parameter im Rhesusaffenmodell verfolgt. Wie in Tabelle 10 ersichtlich, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Infektionsverlauf Blut und unterschiedliche Organe analysiert. Zur Erfassung von Basiswerten wurden vor der Infektion Blut und alle Organe mehrmals analysiert und die Mittelwerte dieser Analysen wurden genutzt.

Die Studie bestand aus drei Versuchsgruppen mit jeweils drei Tieren. Die Kontrollgruppe wurde mit einem SIV-Wildtypvirus (SIVmac239wt, wt) infiziert und eine zweite Gruppe mit einer SIV-Variante, die zwei Punktmutationen im akzessorischen Gen *nef* aufwies (SIVmac239CD3ko-*nef*, CD3knockout, CD3ko). Hier ist spezifisch die Funktion der TCR-CD3 Herabregulierung ausgeschaltet. Die dritte Gruppe wurde mit einer Deletionsmutante im akzessorischen Gen *vpr* infiziert (SIVmac239Δ*vpr*, Δ*vpr*). Dieses stellt eine komplette 101bp (engl. *base pairs*, Basenpaare) große Deletion dar [140].

Tabelle 10: Tabellarische Auflistung der Probenentnahme im Infektionsverlauf.

Proben	Wochen nach SIV-Infektion													
	1	2	4	6	8	12	14	16	20	24	32	36	44	52
Blut	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
KM	x	x		x		x		x		x		x		x
LN		x	x		x		x		x	x	x		x	x
BAL			x				x		x			x		x
CB		x		x		x				x		x		x

4.3.1 Krankheitsprogression und AIDS

In Abbildung 20 ist die Überlebensrate in einem Kaplan-Meier-Plot dargestellt.

Zwei Tiere aus der Kontrollgruppe mussten wegen AIDS-ähnlicher Symptome euthanasiert werden und ein Tier aus der CD3ko-Gruppe verstarb spontan ohne vorherige Krankheitserscheinungen. Kein Tier aus der Δ*vpr*-Gruppe zeigte bis Woche 52 nach Infektion AIDS-assoziierte Symptome.

In der Kontrollgruppe wurde ein Tier (15226wt) zu Woche 35 nach Infektion (engl. *weeks post infection*, wpi) aufgrund von rezidivierendem, nicht therapierbarem Durchfall euthanasiert. Die makroskopische und histologische Untersuchung ergab eine hochgradige chronisch-aktive katarrhalische Gastroenteritis, die krankheitsbestimmend war. Eine

weiterführende bakteriologische und parasitologische Untersuchung wies einen schweren Befall mit verschiedenen opportunistischen Krankheitserregern hin, die dieses Krankheitsbild bedingten. Zusätzlich war das lymphatische System inaktiv und depletiert, was auf eine Immunsuppression hindeutete.

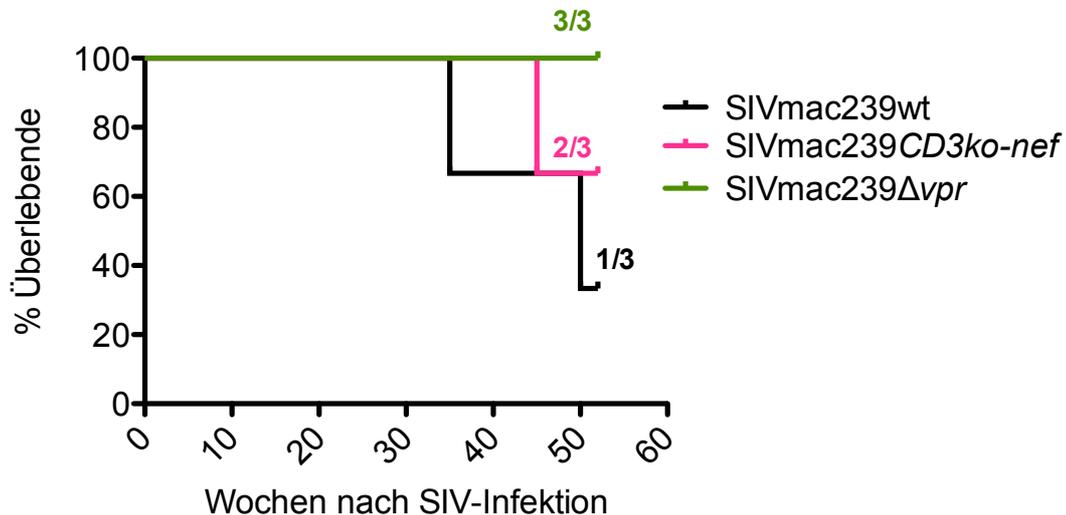


Abbildung 20: Überlebende Tiere. Dargestellt ist ein Kaplan-Meier-Plot, auf dessen x-Achse der zeitliche Verlauf nach SIV-Infektion angegeben ist und auf der y-Achse die Fraktion der Überlebenden in Prozent. Die Gruppen sind separat aufgetragen, schwarz = wt, rosa = *CD3ko-nef*, grün = *Δvpr*.

Ein weiteres Tier aus der Kontrollgruppe (14893wt) musste zu Woche 51 nach Infektion aufgrund von hochgradiger Dyspnoe und anderen respiratorischen Symptomen euthanasiert werden. Die makroskopische und histologische Untersuchung ergab eine hochgradige diffuse interstitielle Pneumonie mit Nachweis von großen intranukleären Einschlusskörperchen in Endothelzellen und Pneumozyten, ausgelöst durch das opportunistisch agierende *Cytomegalievirus*. Zudem lag eine akute katarrhalische Colitis, ausgelöst durch weitere Opportunisten wie *Trichuris*, *Giardia* und *Entamoeba* vor. Ein Tier aus der CD3ko-Gruppe (2583CD3ko) verstarb zu Woche 45 nach Infektion spontan ohne vorherige sichtbare Krankheitssymptome. In der Sektion zeigte sich makroskopisch eine Umfangsvermehrung im Bereich des Harnblasenhalses, die zur Obstruktion der Ureteren im Einmündungsbereich und zum Harnrückstau und damit verbundener akuter Urämie als

Todesursache geführt hat (Abbildung 21). Histologisch ließ sich diese Umfangsvermehrung als großzelliges B-Zell-Lymphom definieren. Mittels Pan-Herpes-PCR und Sequenzanalyse aus den Tumorzellen konnte das *Rhesus Lymphocryptovirus* als ursächliches Agens isoliert werden.

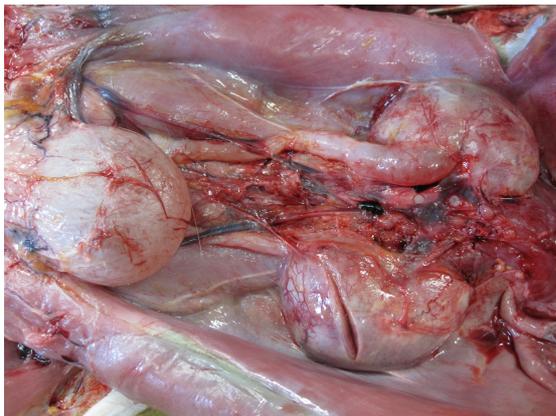
M.Bleyer,
2015M.Bleyer,
2015

Abbildung 21: Makroskopische Darstellung des Lymphoms im Tier 2583CD3ko. Links ist der Bauchsitus mit der makroskopisch sichtbaren Umfangsvermehrung im Bereich des Harnblasenhalses und den bilateralen Hydrourethern gezeigt. Rechts ist die eröffnete Harnblase mit gleichzeitigem Anschnitt der Umfangsvermehrung sichtbar.

4.3.2 Viruslast im Plasma

Wie in Abbildung 22 dargestellt, wurde bei allen Tieren der Kontroll- sowie der CD3ko-Gruppe bereits eine Woche nach Infektion virale RNA im Plasma nachgewiesen.

Bei diesen beiden Gruppen war die Spitzenvirämie bereits zwei Wochen nach Infektion erreicht und vergleichbar zwischen beiden Gruppen mit Werten von durchschnittlich 4.1×10^7 in der Kontrollgruppe und 2.9×10^7 RNA-Kopien/ml Plasma in der CD3ko-Gruppe (siehe Abbildung 23). In der Δvpr -Gruppe trat die Virämie etwas später als in den beiden anderen Gruppen auf. Bei zwei Tieren (2617 Δvpr und 15216 Δvpr) war zu Woche 1.4 nach Infektion virale RNA im Plasma nachweisbar, bei dem Tier 14847 Δvpr dagegen erst zu Woche 2.4 nach Infektion. Dementsprechend lag eine verzögerte Spitzenvirämie (Woche 3 und 4 nach Infektion) im Vergleich zu den anderen Gruppen vor. Die Spitzenvirämie war ca. 30-fach

niedriger als in der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 2.6×10^5 RNA-Kopien/ml Plasma (Abbildung 22).

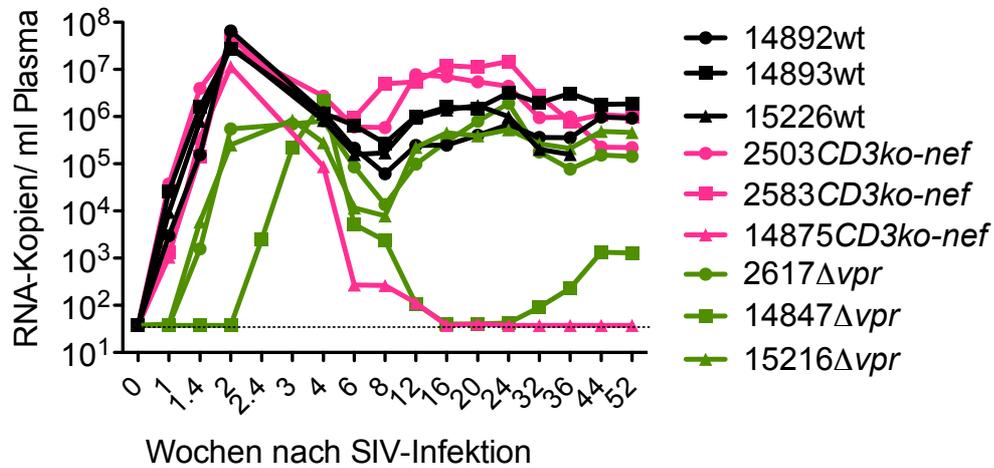


Abbildung 22: RNA-Viruslast im Plasma im Infektionsverlauf. Die x-Achse zeigt die Wochen nach SIV-Infektion und die y-Achse die RNA-Kopien/ml Plasma in einer logarithmischen Darstellung. Die Tiere sind separat dargestellt, schwarz = wt, rosa = *CD3ko-nef*, grün = Δ vpr.

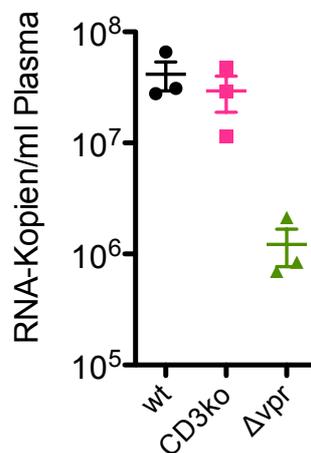


Abbildung 23: Vergleich der Spitzenvirämie zwischen den Gruppen. Die x-Achse zeigt die untersuchten Tiergruppen und die y-Achse die RNA-Kopien/ml Plasma in einer logarithmischen Darstellung. Die Tiere sind pro Gruppe einzeln aufgetragen, schwarz = wt, rosa = *CD3ko-nef*, grün = Δ vpr. Querstriche demonstrieren Mittelwerte, die Vertikalbalken den Standardfehler.

In der frühen chronischen Phase, die ab Woche 8 nach Infektion beginnt, lagen die Werte der Viruslast im Plasma in der Kontrollgruppe durchschnittlich bei 8.3×10^5 und in der CD3ko-Gruppe etwas höher bei 4.6×10^6 RNA-Kopien/ml Plasma. Zu diesem Zeitpunkt wies die Δvpr -Gruppe eine niedrigere Viruslast mit durchschnittlich 8×10^4 Viruskopien/ml Plasma auf. Auffallend an den zwei Einzeltieren 14875CD3ko und 14847 Δvpr war, dass bei ihnen bereits ab Woche 6 nach Infektion die Viruslast abnahm, und ab Woche 16 unter die Nachweisgrenze fiel. Während dieses Phänomen bei 14875CD3ko bis Woche 52 nach Infektion persistierte, kontrollierte 14847 Δvpr die Viruslast nur temporär. Ab Woche 32 nach Infektion stieg die Viruslast wieder an und erreichte ab Woche 44 nach Infektion mit 1.2×10^3 Viruskopien/ml Plasma ihr Plateau. Ab der späten chronischen Phase ab Woche 24 bis Woche 52 nach Infektion lag die Viruslast im Plasma in diesem Zeitraum in den übrigen Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich bei 1.2×10^6 , in der CD3ko-Gruppe bei 2.7×10^6 und etwas niedriger in der Δvpr -Gruppe mit durchschnittlichen Viruslasten von 4.4×10^5 Viruskopien/ml Plasma.

4.3.3 Neopterinbestimmung im Urin

Der Neopterinpiegel im Urin nach der Infektion wurde als x-facher Wert des Basiswerts vor der Infektion dargestellt, da Neopterin schon vor der Infektion (individuell unterschiedlich hoch) nachgewiesen werden kann. Bemerkenswert waren die Neopterinpiegel in der Kontrollgruppe zu Tag 15 nach Infektion mit einem ca. 17-fachen Anstieg in Relation zum Ausgangswert. Dieses war jedoch bedingt durch die sehr hohen Spiegel bei einem Tier (14892wt); die anderen beiden präsentierten einen ca. 11-fachen Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert. In der CD3ko-Gruppe war ein ca. 11-facher Anstieg zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu zeigte die Δvpr -Gruppe nur einen geringen Anstieg um das ca. 2-fache im Vergleich zum Ausgangswert (siehe Abbildung 24). Nach diesem (gruppenunterschiedlichen) raschen Anstieg der Neopterinpiegel zu Tag 15 pi kam es zu einem ebenso raschen Abfall. Bereits an Tag 17 nach Infektion konnte man in der Kontroll- und CD3ko-Gruppe nur noch

einen ca. 7-fachen Anstieg beobachten. Die Werte in der Δvpr -Gruppe veränderten sich nur wenig im Vergleich zu Tag 15. An Tag 31 nach Infektion waren in allen Gruppen nahezu die Ausgangswerte erreicht.

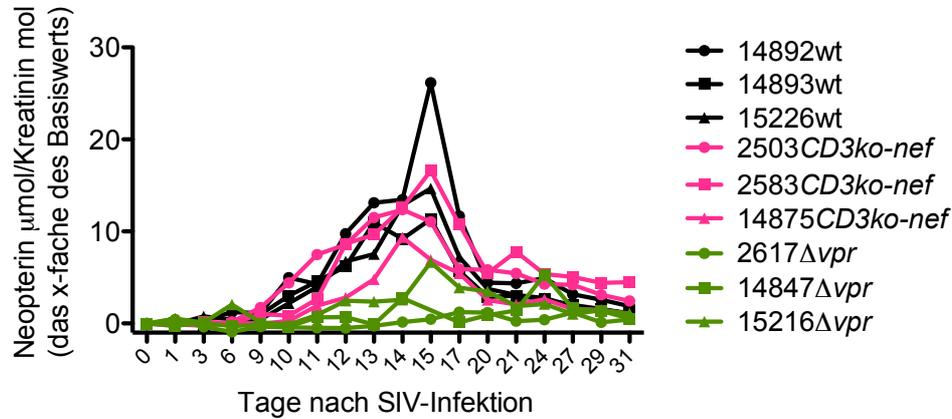


Abbildung 24: Neopterinspiegel im Urin. Die x-Achse zeigt die Tage nach SIV-Infektion und die y-Achse die Neopterin/Kreatinin-Ratio als x-fachen Wert des Basiswerts. Die Tiere sind einzeln aufgetragen, schwarz = wt, rosa = $CD3ko-nef$, grün = Δvpr .

Wie der Abbildung 25 zu entnehmen ist, korrelieren die Neopterinwerte signifikant mit der Spitzenvirämie ($p < 0.0001$).

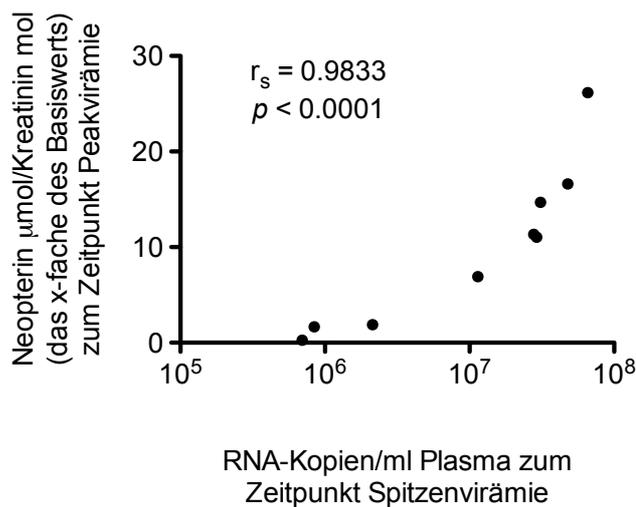


Abbildung 25: Korrelation der Neopterinwerte mit der Spitzenvirämie. Auf der x-Achse sind die RNA-Kopien/ml Plasma zum Zeitpunkt der Spitzenvirämie aufgetragen, wohingegen die y-Achse die Neopterin/Kreatinin-Ratio als x-facher Wert des Basiswerts darstellt. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient r_s und der dazugehörige p -Wert verdeutlichen den hochsignifikanten Zusammenhang beider Parameter.

4.3.4 Durchflusszytometrische Analyse der T- und B-Zellpopulationen und Plasmazellen

4.3.4.1 Gating-Strategie der T-Zellen

Nach Ausschluss der Dubletten zur Erfassung der Einzelzellen folgte die Charakterisierung der Lymphozyten über CD45 (Abbildung 26). Im Anschluss wurden die CD3⁺ T-Zellen insgesamt und danach die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen speziell identifiziert. Von den CD4⁺ T-Zellen wurden anschließend die Aktivierungsmarker HLA-DR sowie CD69 und die naiven T-Zellen (CD28⁺CD95⁻) sowie die zentralen (CD28⁺CD95⁺) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD28⁻CD95⁺) charakterisiert.

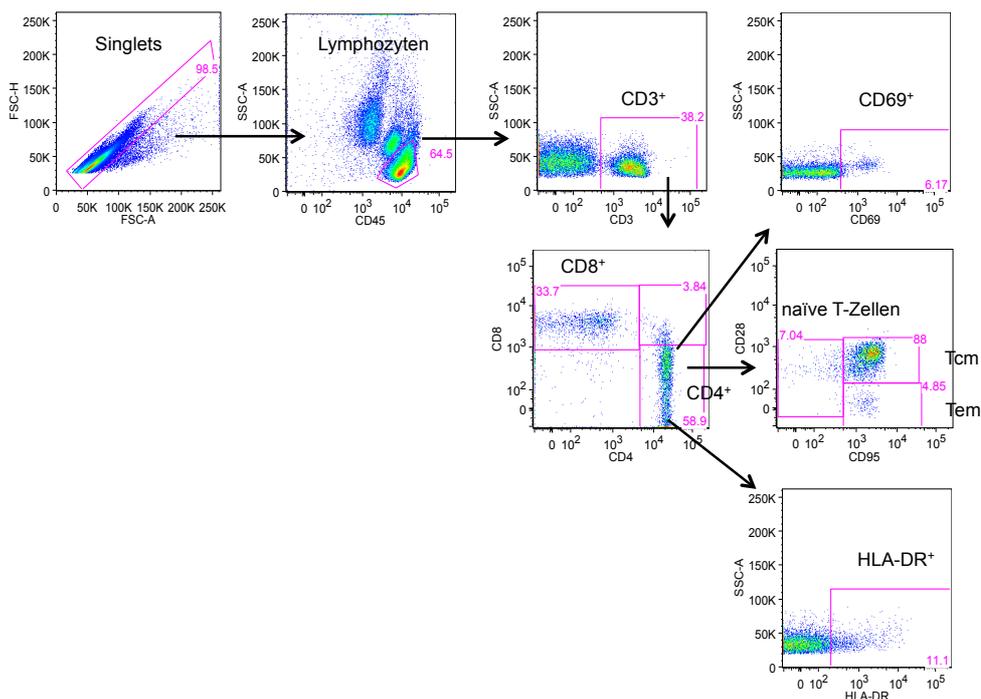


Abbildung 26: Gating-Strategie der T-Zellen in einer exemplarischen Vollblutprobe. Dargestellt sind Dot Plots der verschiedenen T-Zellpopulationen. Rosa Linien markieren ein Gate, die Menge der darin enthaltenden Events ist als prozentualer Anteil an der vorherigen Population angegeben. Identifiziert wurden CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen bei vorhergehender Charakterisierung von Lymphozyten, Einzelzellen und CD3⁺ T-Zellen. Von den CD4⁺ T-Zellen wurden die Aktivierungsmarker HLA-DR sowie CD69 und die naiven sowie die zentralen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen charakterisiert.

4.3.4.2 Etablierung der LN-FNA und Gating-Strategie der folliculären T-Helferzellen

Um die T_{FH} -Zellen longitudinal engmaschig untersuchen zu können, musste eine geeignete Methode der Probengewinnung etabliert werden. Im Abschnitt Material und Methoden wurde bereits die Methode der LN-FNA beschrieben. Zur Evaluierung der Vergleichbarkeit zwischen der LN-FNA und der klassischen LN-Exstirpation wurde eine Studie mit sieben SIV-negativen RM durchgeführt und verschiedene T-Zell-Populationen analysiert. Die nachfolgenden Daten wurden bereits von uns publiziert; einige Abbildungen sind deshalb originalgetreu entnommen [153].

Die Gating-Strategie für die Vergleichsstudie und die modifizierte Gating-Strategie der SIV-Studie sind in Abbildung 27A+B dargestellt. Erstere beginnt mit der Charakterisierung der Lymphozyten über einen niedrigen FSC-A und SSC-A. Nach Ausschluss der Dubletten folgte die Erfassung der $CD3^+$ T-Zellen und der $CD20^+$ B-Zellen. Die Fokussierung erfolgte anschließend auf die $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellpopulationen mit weiterführender Charakterisierung der $CD4^+CD45RA^-$ Gedächtnis-T-Zellen. Von dieser wurden final die T_{FH} -Zellen als $PD-1^{++}$ und $CD127^-$ Population definiert. Die Gating-Strategie in der SIV-Studie wurde modifiziert. Zur besseren Charakterisierung von Lymphozyten wurde nun der anti- $CD45$ mAk benutzt. Die Definition der T_{FH} -Zellen erfolgte nur noch über $PD-1$; der anti- $CD127$ mAk wurde ausgeschlossen, da T_{FH} -Zellen immer negativ für diesen Marker waren. Somit wurde $PD-1$ als ausreichend für die Charakterisierung angesehen. Zusätzlich wurde in der SIV-Studie für die weitere Charakterisierung der T_{FH} -Zellen der anti- $IL-21$ mAk eingeschlossen, der bei positivem Nachweis einen Hinweis auf die funktionelle Kapazität der T_{FH} -Zellen gibt. Ebenfalls hinzugefügt wurden $CD21$ und $CD27$, um auch B-Zell-Populationen longitudinal zu analysieren.

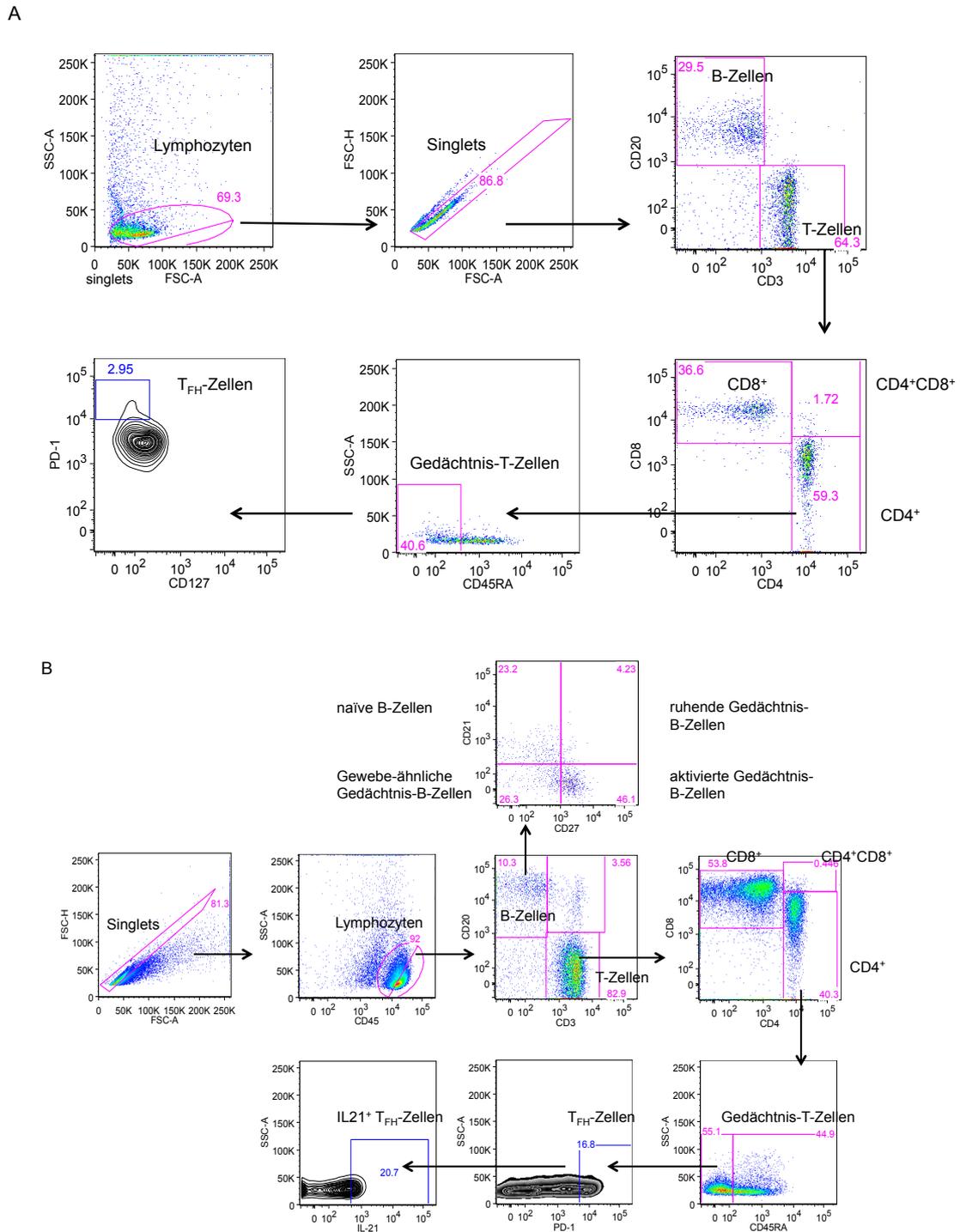


Abbildung 27: Gating-Strategie der T_{FH} -Zellen in einem LN-Feinnadelaspirat. Dargestellt sind exemplarische Dot Plots der verschiedenen T-Zellpopulationen. Rosa Linien markieren ein Gate, die Menge der darin enthaltenden Events ist als prozentualer Anteil an der vorherigen Population angegeben. Unterteilt werden in (A) Lymphozyten, anschließend Einzelzellen, $CD3^+$ T-Zellen oder $CD20^+$ B-Zellen, dann $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen, von $CD4^+$ Zellen $CD45RA^-$ Gedächtnis-T-Zellen und final T_{FH} -Zellen. In (B) wird die modifizierte Gating-Strategie in der SIV-Studie dargestellt.

In Abbildung 28 sind $CD20^+$ B-Zellen, $CD3^+$ T-Zellen, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, $CD45RA^-$ Gedächtnis-T-Zellen sowie T_{FH} -Zellen vergleichend zwischen LN-Feinnadelaspiraten und komplett exstirpierten LN in den SIV-negativen Tieren dargestellt. Die Ergebnisse in Tabelle 11 veranschaulichen die gute Vergleichbarkeit zwischen beiden Methoden. Dieses wird ebenfalls in Abbildung 29 deutlich, in der eine positive Korrelation von $CD4^+$ T-Zellen zwischen beiden Methoden dargestellt ist.

Zusätzlich wurden absolute Zellzahlen in den Aspiraten ermittelt (Abbildung 30). Die Zellzahl lag zwischen 2.5×10^5 bis 8.1×10^5 mit durchschnittlich 5.6×10^5 Zellen in $50 \mu\text{l}$ Probe bei der manuellen Zählung mit einer Zählkammer und war somit ausreichend für eine komplette phänotypische Analyse. Bei der Analyse mit den TruCOUNT™-Röhrchen variierten $CD45^+$ Lymphozyten von 4.7×10^4 bis 1×10^6 mit einem Mittelwert von 4.5×10^5 . $CD3^+$ T-Zellen rangierten von 4×10^4 bis 7.6×10^5 , im Durchschnitt lagen sie bei 3.7×10^5 Zellen. Subpopulationen wie $CD4^+$ T-Zellen variierten von 2.4×10^4 bis 4.2×10^5 mit durchschnittlich 2×10^5 Zellen, wohingegen sich $CD8^+$ T-Zellen in einem Bereich von 1×10^4 bis 2.4×10^5 mit durchschnittlich 1.2×10^5 bewegten. T_{FH} -Zellen variierten von 6.5×10^3 bis 3.1×10^4 mit einem Mittelwert von 1×10^4 Zellen.

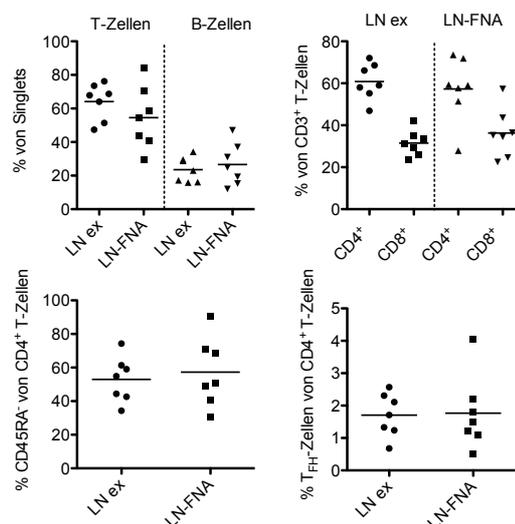


Abbildung 28: Vergleich von T-Zell-Populationen in LN-Feinnadelaspiraten und Zellsuspensionen aus LN-Exstirpaten. Auf der x-Achse sind die Proben der LN-Exstirpate sowie der LN-Feinnadelaspirate aufgetragen. Auf der y-Achse sind die prozentualen Anteile der verschiedenen mittels Durchflusszytometrie analysierten Zellpopulationen angegeben. Querstriche demonstrieren Mittelwerte.

Tabelle 11: Prozentzahlen von T- und B-Zell-Populationen in Zellsuspensionen von Lymphknotenexstirpaten und Feinnadelaspiraten.

Zellpopulation	LN ex	LN-FNA
CD3 ⁺	64.1 ± 4.1	54.5 ± 7.0
CD20 ⁺	23.5 ± 2.8	26.6 ± 4.7
CD3 ⁺ CD4 ⁺	60.8 ± 3.2	57.2 ± 5.7
CD3 ⁺ CD8 ⁺	31.5 ± 2.3	36.3 ± 4.4
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁻ (Gedächtnis-T-Zellen)	52.9 ± 5.1	57.3 ± 7.6
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁻ PD-1 ⁺⁺ CD127 ⁻ (T _{FH} -Zellen als % von CD4 ⁺ T-Zellen)	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.4

Die Prozentzahlen sind als Mittelwerte mit dem Standardfehler dargestellt.

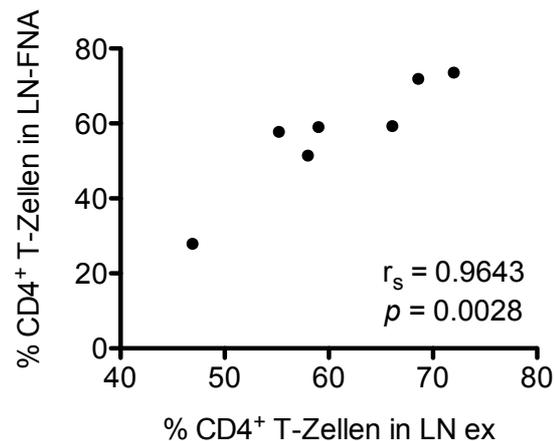


Abbildung 29: Korrelation der CD4⁺ T-Zellen. Auf der x-Achse sind die CD4⁺ T-Zellen aus Zellsuspensionen der Lymphknotenexstirpate und auf der y-Achse die CD4⁺ T-Zellen aus Zellsuspensionen der Feinnadelaspirate dargestellt. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient r_s und der dazugehörige p -Wert verdeutlichen den signifikanten Zusammenhang beider Parameter.

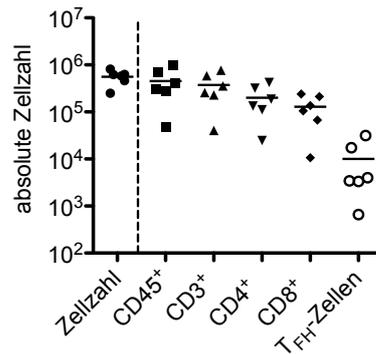


Abbildung 30: Absolute Zellzahlen in LN-Feinnadelaspiraten. Auf der x-Achse sind die untersuchten Zellpopulationen dargestellt. Die y-Achse zeigt die absolute Zellzahl in einer logarithmischen Darstellung in einer 50µl Probe. Die Zellzahl links auf der x-Achse wurde separat mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Querstriche demonstrieren Mittelwerte.

Somit erwies sich die LN-FNA als gut anwendbare Alternativmethode zur klassischen LN-Exstirpation zum Zweck der Phänotypisierung von B- und T-Zellpopulationen in lymphoidem Gewebe. Diese Methode ist schnell durchführbar, minimal invasiv und schonend für die Tiere sowie die immunologische Homöostase, da kein ganzer Lymphknoten entfernt werden muss. Dieses trägt ebenfalls zu dem Refinement des 3R-Prinzips nach Russel und Burch bei [154], da es zu einer Verbesserung der Methoden in Tierversuchen führt.

4.3.4.3 CD4-Zellzahlen im Vollblut und lymphoidem sowie mukosalem Gewebe

Im Folgenden sind die Werte immer als Mittelwert in Prozent \pm Standardfehler in Prozent dargestellt. Prozentzahlen von CD4⁺ T-Zellen wurden im Blut, KM, LN, in der BAL und in CB durchflusszytometrisch während des Krankheitsverlaufes bestimmt (Abbildung 31). Im Blut lagen die Ausgangswerte in der Kontrollgruppe bei 57% \pm 2 CD4-Zellen (von CD3-Zellen allgemein) und zeigten einen deutlichen Abfall in Woche 4 nach Infektion mit 34% \pm 3. In den folgenden Wochen erholten sich die CD4-Zellzahlen auf ca. 40% \pm 3, erreichten aber nie die Ausgangswerte, sondern nahmen kontinuierlich ab. In Woche 52 nach Infektion waren prozentual nur noch 35% \pm 6 CD4-Zellen im Blut messbar. In der CD3ko-Gruppe lagen die

Ausgangswerte im Blut mit $47\% \pm 2$ zwar niedriger, erfuhren aber ebenfalls einen Abfall auf $37\% \pm 3$ an Woche 4 nach Infektion. Dieser initiale Verlust war in dem Tier 14875CD3ko ebenfalls vorhanden, danach gab es jedoch eine rasche Erholung mit stabilen Zellzahlen im restlichen Infektionsverlauf. In den darauffolgenden Wochen lagen die durchschnittlichen Zellzahlen im Verlauf in der gesamten CD3ko-Gruppe bei ca. 40%. Nur das Tier 2583 wies stetig fallende CD4-Zellzahlen bis zu seinem Tod in Woche 44 nach Infektion auf. Die Δvpr -Gruppe hatte Ausgangswerte von $53\% \pm 0.3$ und wies nahezu keinen Abfall in Woche 4 auf. Damit unterschied sie sich deutlich von den anderen beiden Gruppen. Auch im Verlauf der nächsten Wochen blieben die CD4-Zellen stabil. Nur in der Woche 52 nach Infektion kam es zu einem Abfall auf $40\% \pm 10$, dieses war jedoch durch den starken Abfall der CD4-Zellen in einem Tier (2617) begründet.

Im KM lagen die Ausgangswerte in allen Gruppen ähnlich (wt: $31\% \pm 4$; CD3ko: $32\% \pm 5$; Δvpr : $29\% \pm 1$). Bemerkenswert bei allen war der nahezu dreifache Anstieg der CD4-Zellzahlen ab Woche 12 bis 16 nach Infektion (wt: $79\% \pm 1$; CD3ko: $74\% \pm 3$; Δvpr : $83\% \pm 2$). Dieses war nicht bedingt durch einen tatsächlichen Anstieg dieser Zellpopulation, sondern durch eine prozentuale Verschiebung aufgrund eines Verlustes an CD8⁺ T-Zellen. Dieses wird auch deutlich in der Abbildung 32, die einen tatsächlichen Verlust der absoluten Zellzahlen der CD8⁺ T-Zellen illustriert. Nach Woche 16 normalisierten sich die Prozentzahlen der CD4-Zellen (und ebenso die Zellzahlen der CD8-Zellen) auf Ausgangslevel.

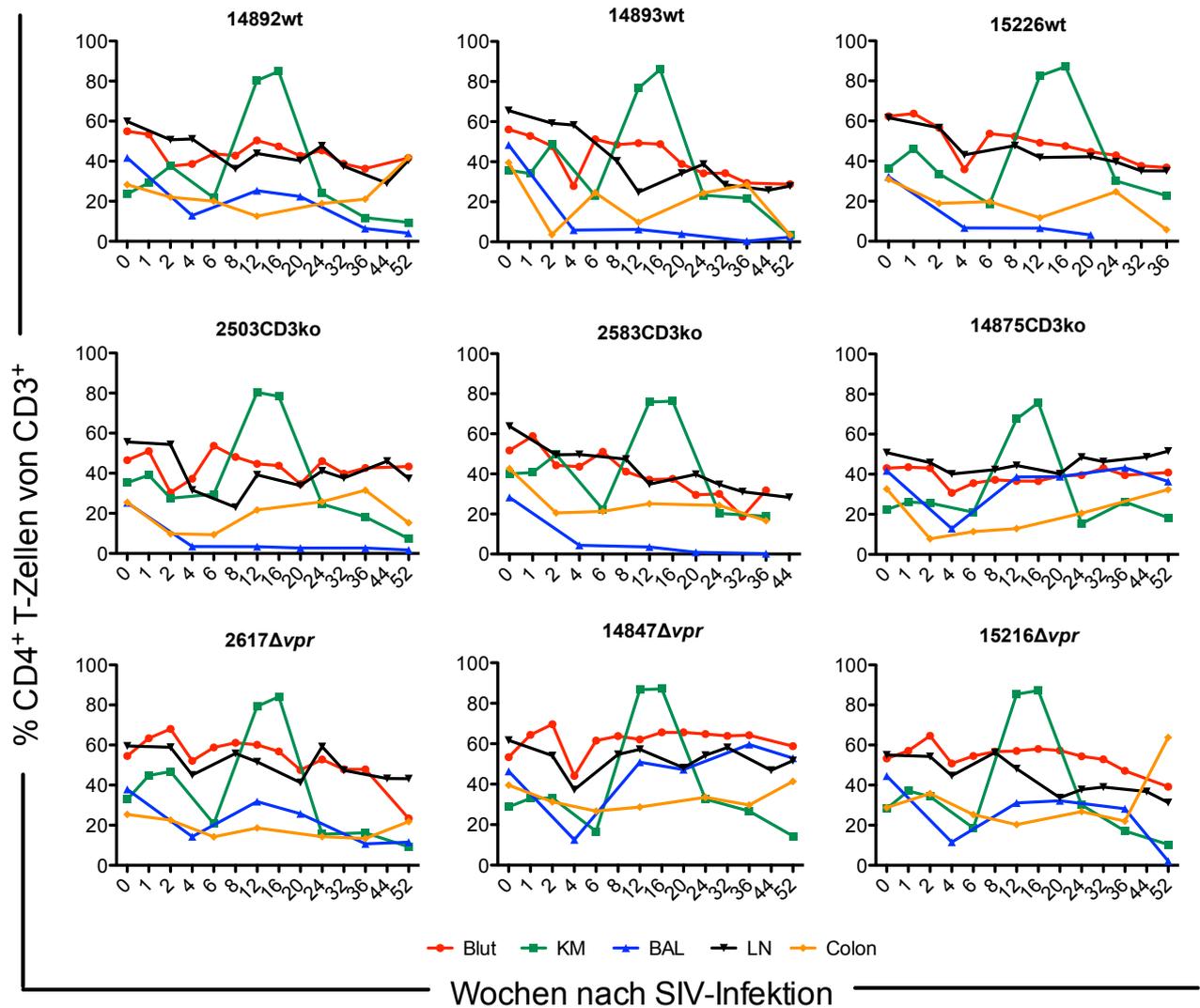


Abbildung 31: Prozentzahlen von CD4⁺ T-Zellen im Blut und den verschiedenen Organen im Infektionsverlauf. Die x-Achse zeigt die Wochen nach SIV-Infektion und die y-Achse die Prozentzahlen der CD4-Zellen als Anteil der CD3⁺ T-Zellen. Pro Bild sind die Kurvenverläufe individuell für jedes Tier dargestellt. rot = Blut, grün = KM, blau = BAL, schwarz = LN, gelb = Colon. Werte vor der Infektion sind als Mittelwert von zwei bis fünf Präwerten dargestellt.

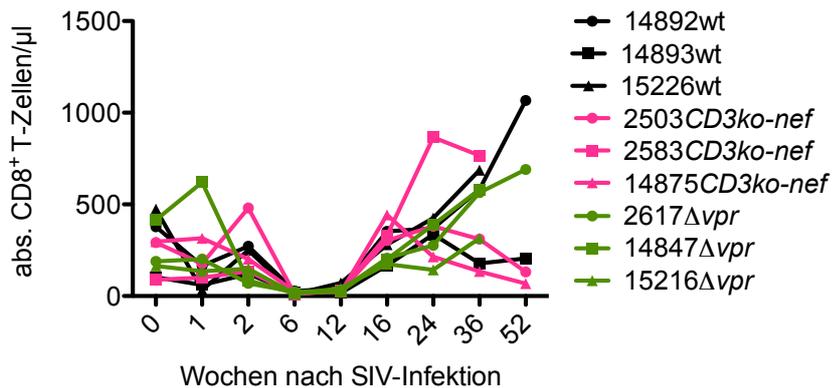


Abbildung 32: Individuelle absolute CD8-Zellzahlen im Knochenmark im Infektionsverlauf. Die x-Achse zeigt die Wochen nach SIV-Infektion und die y-Achse die absoluten Zellzahlen der CD8-Zellen pro μl . schwarz = wt, rosa = *CD3ko-nef*, grün = Δvpr . Der Wert vor der Infektion ist als Mittelwert von zwei Messungen angegeben.

In der BAL lagen die Ausgangsprozentsätze der CD4-Zellen bei $40\% \pm 4$ in der Kontrollgruppe, bei $31\% \pm 5$ in der *CD3ko*-Gruppe und bei $42\% \pm 2$ in der Δvpr -Gruppe. In Woche 4 kam es in allen Gruppen zu einem deutlichen Abfall (wt: $8\% \pm 2$; *CD3ko*: $6\% \pm 2$; Δvpr : $12\% \pm 0.8$), der in der Kontrollgruppe und bei zwei Tieren der *CD3ko*-Gruppe (2503, 2583) über die Zeit anhält. Das Tier 14875*CD3ko*, das die Viruslast erfolgreich kontrollierte, erreichte jedoch wieder Ausgangswerte. Dieses traf ebenfalls auf das Tier 14847 aus der Δvpr -Gruppe zu, das temporär die Viruslast kontrollierte. Bei den anderen beiden Tieren aus letztgenannter Gruppe stiegen die CD4-Spiegel vorübergehend wieder an, um danach jedoch wieder bis Woche 52 nach Infektion abzufallen.

Im LN nahmen die CD4-Werte in der Kontrollgruppe im Infektionsverlauf stetig ab (Woche 0: $62\% \pm 1$ vs. Woche 52: $34\% \pm 6$). Dieser war auch in zwei Tieren der *CD3ko*-Gruppe vorhanden (2503: Woche 0: 55% vs. Woche 52: 37% ; 2583: Woche 0: 63% vs. Woche 52: 28%). In dem die Viruslast kontrollierenden 14875 derselben Gruppe blieben die CD4-Zellzahlen stabil. In der Δvpr -Gruppe kam es zu einem weniger ausgeprägten Verlust über den Infektionsverlauf (Woche 0: $58\% \pm 1$ vs. Woche 52: $42\% \pm 5$). Hier waren die Werte des temporär die Viruslast kontrollierenden Affen 14847 am stabilsten.

Die Prozentzahlen im Colon, als das am stärksten von der CD4-Depletion betroffenen Organs, sind zusätzlich in der Abbildung 33 gezeigt.

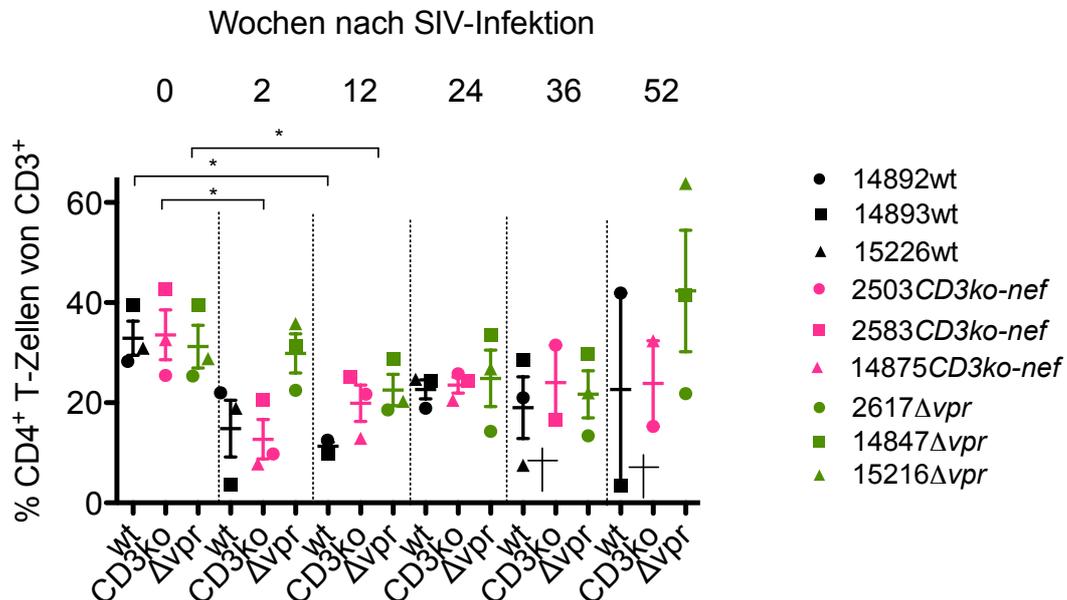


Abbildung 33: Prozentzahlen von CD4⁺ T-Zellen im Colon im Infektionsverlauf. Die x-Achse zeigt die Werte der untersuchten Tiergruppen zu verschiedenen Zeitpunkt nach Infektion und die y-Achse die Prozentzahlen der CD4-Zellen als Anteil der CD3-Zellen. Die Werte der Tiere sind einzeln aufgetragen, schwarz = wt, rosa = CD3ko, grün = Δvpr. Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von zwei Präwerten dar. Querstriche demonstrieren Mittelwerte, die Vertikalbalken den Standardfehler. Querbalken demonstrieren zusammenhängende signifikante Unterschiede von * $p < 0.05$ nach dem gepaarten t-Test für verbundene Proben. †, Tod.

Die Ausgangswerte der CD4-Zellen im Colon bewegten sich bei allen Tieren zwischen 31 und 33%. In der Kontrollgruppe kam es ab Woche 2 nach Infektion zu einem Abfall der Prozentzahlen, der an Woche 12 ($11\% \pm 0.8$) einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Ausgangswerten aufwies. Im weiteren Verlauf kam es zu einem Anstieg, Ausgangsspiegel wurden jedoch nicht erreicht. In den beiden Tieren, die wegen einer AIDS-Symptomatik euthanasiert werden mussten, lagen extrem niedrige CD4-Zellzahlen zum Zeitpunkt der Sektion vor. In der CD3ko-Gruppe war ebenfalls ein Abfall ab Woche 2 nach Infektion zu beobachten, der statistisch signifikant zu den Ausgangswerten war. In den

folgenden Wochen blieben die Werte konstant um ca. 20%. Die Δvpr -Gruppe wies im Unterschied zu den anderen Tieren jedoch nur einen milden Abfall der mukosalen CD4-Zellzahlen in der akuten Phase auf. Ab Woche 12 nach Infektion waren noch 23% an CD4⁺ T-Zellen vorhanden, die jedoch zwischen den Tieren in Woche 52 nach Infektion stark divergierten. Nichtsdestotrotz waren die Werte in zwei von drei Tieren in dieser Gruppe höher als in der Kontrollgruppe.

Die Prozentzahlen der CD4-Zellen im gesamten Verlauf der Infektion korrelierten im Blut und allen Organen invers mit der Plasmaviruslast zu den zugehörigen Zeitpunkten (Abbildung 34). In den mukosalen Geweben wie Lunge und Colon ist dieses am deutlichsten. Lediglich der Verlauf dieser Zellen im KM korrelierte nicht mit der Viruslast (Daten nicht gezeigt).

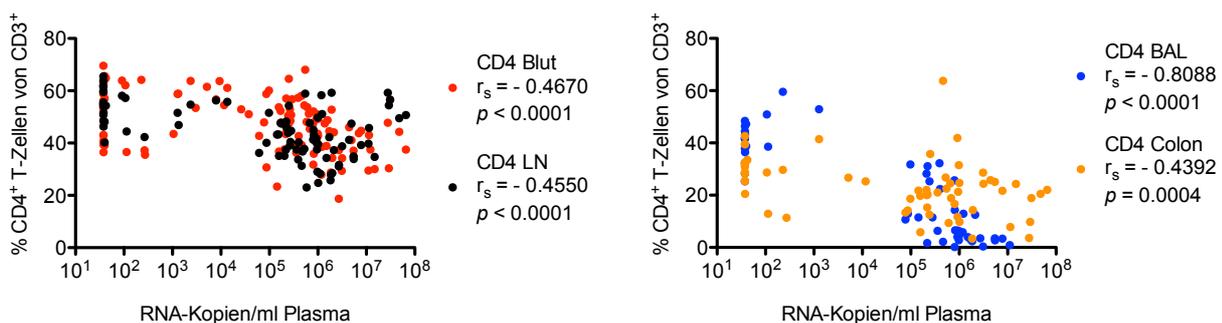


Abbildung 34: Korrelation der CD4⁺ T-Zellen im Blut und den verschiedenen Organen mit der Viruslast im Plasma. Auf der x-Achse sind die RNA-Kopien/ml Plasma in logarithmischer Darstellung aufgeführt, auf der y-Achse die CD4⁺ T-Zellen als prozentualer Anteil der CD3⁺ T-Zellen von Woche 0 bis Woche 52 nach Infektion. Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwerte von zwei bis fünf Präwerten dar. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient r_s und der p -Wert verdeutlichen die signifikante negative Korrelation beider Parameter. In rot = Blut, blau = BAL, schwarz = LN, gelb = Colon.

4.3.4.4 T_{FH} -Zellzahlen und $IL-21^+$ T_{FH} -Zellzahlen in lymphoidem Gewebe

In Abbildung 35 sind die Prozentzahlen der T_{FH} -Zellen als Anteil der $CD45RA^-$ Gedächtnis-T-Zellen und die funktionelle Kapazität durch $IL-21$ Expression in den T_{FH} -Zellen in individuellen Kurvenverläufen dargestellt.

Die Ausgangswerte der T_{FH} -Zellen lagen in der Kontrollgruppe bei $6\% \pm 0.7$. In der $CD3ko$ -Gruppe waren die Werte mit $8\% \pm 2$ sowie in der Δvpr -Gruppe mit $5\% \pm 0.8$ vergleichbar. Im Verlauf der Infektion kam es zu einer Expansion dieser Population auf 40-60%, meist in der chronischen Phase. Lediglich das die Viruslast kontrollierende Tier 14875 aus der $CD3ko$ -Gruppe zeigte zu keiner Zeit eine Expansion dieser Population. Das temporär die Viruslast kontrollierende Tier 14847 aus der Δvpr -Gruppe wies nur zu einem frühen Zeitpunkt einen Anstieg auf.

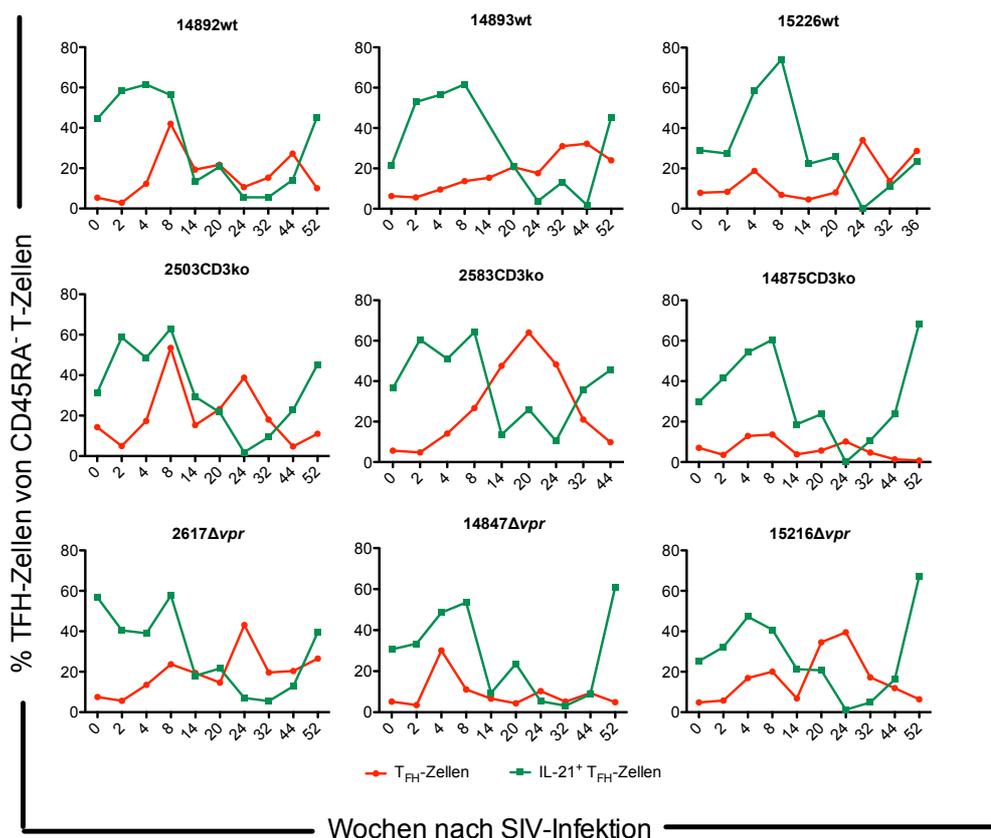


Abbildung 35: Prozentzahlen von T_{FH} -Zellen und $IL-21^+$ T_{FH} -Zellen im LN im Infektionsverlauf. Die x-Achse zeigt die Wochen nach SIV-Infektion und die y-Achse die Prozentzahlen der T_{FH} -Zellen und $IL-21^+$ T_{FH} -Zellen im LN. Pro Bild sind die Werte eines Tieres mit individuellen Kurvenverläufen aufgetragen, rot = T_{FH} -Zellen, grün = $IL-21^+$ T_{FH} -Zellen. Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von zwei Präwerten dar.

Diese Expansion der T_{FH}-Zellen korrelierte positiv mit der Plasma-Viruslast über den gesamten Infektionsverlauf (Abbildung 36).

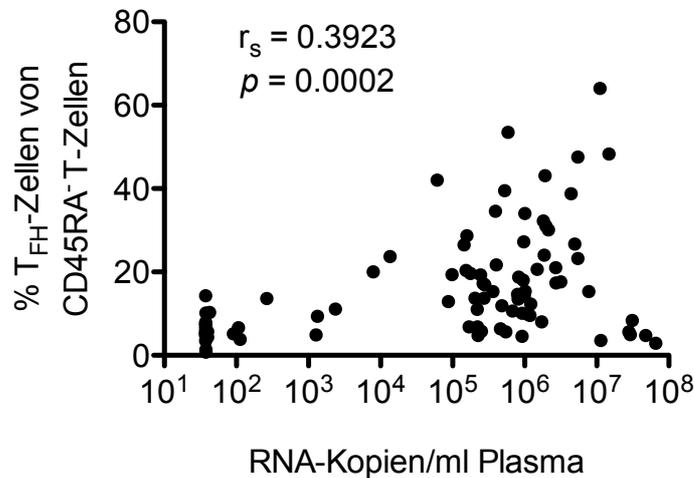


Abbildung 36: Korrelation der T_{FH}-Zellen mit der Viruslast im Plasma. Auf der x-Achse sind die RNA-Kopien/ml Plasma in logarithmischer Darstellung gezeigt, auf der y-Achse die T_{FH}-Zellen als Anteil der CD45RA⁺ Zellen über Woche 0 bis Woche 52 nach Infektion. Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von zwei Präwerten dar. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient r_s und der dazugehörige p -Wert verdeutlichen die signifikante positive Korrelation beider Parameter.

Die funktionale Kapazität der T_{FH}-Zellen, gemessen an der intrazellulären IL-21 Expression, war in allen Gruppen ähnlich mit Ausgangswerten um 32-37%. Ebenfalls ähnlich im Infektionsverlauf war der starke Abfall ab Woche 14 nach Infektion mit dem Tiefpunkt an Woche 24 mit nur noch ca. 3-5% IL-21⁺ T_{FH}-Zellen im Lymphknoten. Danach kam es zu einem langsamen Anstieg, der an Woche 52 wieder Ausgangsspiegel erreichte.

4.3.4.5 Immunaktivierung der T-Zellen

Der Grad der Immunaktivierung wurde anhand der CD69 und HLA-DR Expression auf CD4-Zellen im Blut und lymphoidem sowie mukosalem Gewebe bestimmt (Abbildung 37 und 38). Ausgangswerte von HLA-DR auf T-Zellen im Blut lagen in der Kontrollgruppe bei $6\% \pm 1$, in der CD3ko-Gruppe bei $8\% \pm 1$ und in der Δvpr -Gruppe um $4\% \pm 0.2$. Im Verlauf der Infektion kam es zu einem in den Gruppen vergleichbaren, bis zu zweifachen Anstieg der HLA-DR⁺ CD4⁺ T-Zellen im Blut Woche 1 nach Infektion. Danach fielen die Werte wieder auf etwa das Ausgangsniveau zurück. Erst in der chronischen Phase ab Woche 24 bzw. 36 kam es zu einem erneuten Anstieg. Dieser blieb jedoch in den früh verstorbenen Tieren 14893wt und 15226wt aus.

Im LN blieb ein vergleichbarer Anstieg im 15226wt und in den beiden die Viruslast kontrollierenden Tieren 14875CD3ko und 14847 Δvpr aus. Bei den Tieren 14893wt und 15216 Δvpr gab es erst zu Woche 52 nach Infektion einen Anstieg. In den verbliebenen Tieren 14892wt, 2503CD3ko, 2583CD3ko und 2617 Δvpr war eine variierende, aber anhaltende Immunaktivierung im LN bis Woche 52 nach Infektion zu verzeichnen.

Im mukosalen Gewebe der Lunge kam es in allen Tieren dagegen zu einem ca. fünf- bis zehnfachen frühen Anstieg der Prozentzahlen der HLA-DR⁺ CD4⁺ T-Zellen zu Woche 4 nach Infektion, der jedoch in Woche 16 bzw. Woche 20 bei den meisten Tieren bereits wieder rückläufig war und zu Woche 52 Ausgangswerte erreichte. Lediglich bei dem Tier 14893wt und 2503CD3ko war eine konstante Immunaktivierung im mukosalen Gewebe bis Woche 52 zu beobachten. Die Tiere 2583CD3ko und 2617 Δvpr präsentierten nach dem Abfall auf Ausgangslevel zu Woche 20 bereits wieder einen Anstieg über Woche 36 bis Woche 52.

Die Expression des frühen Immunaktivierungsmarkers CD69 zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Während in der Δvpr -Gruppe zu Woche 2 nach Infektion kein Anstieg zu verzeichnen war, gab es in jeweils zwei Tieren aus der Kontrollgruppe (14892, 15226) und der CD3ko-Gruppe (2583, 14875) einen bis zu zweifachen Anstieg der CD69 Expression mit den höchsten Werte bei dem Tier 14875CD3ko.

Ab Woche 4 nach Infektion kam es jedoch zu einem Abfall bei allen Tieren auf Werte deutlich unter dem Ausgangsniveau und erst ab Woche 20 bzw. 24 zu einem Wiederanstieg bei allen Tieren aus der Δvpr -Gruppe und dem Tier 14892wt. Die CD3ko-Gruppe erreichte erst ab Woche 52 nach Infektion wieder Normalwerte. Die Werte zu Woche 52 nach Infektion müssen jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. Die Folgedaten müssen abgewartet werden, um den starken Anstieg interpretieren zu können.

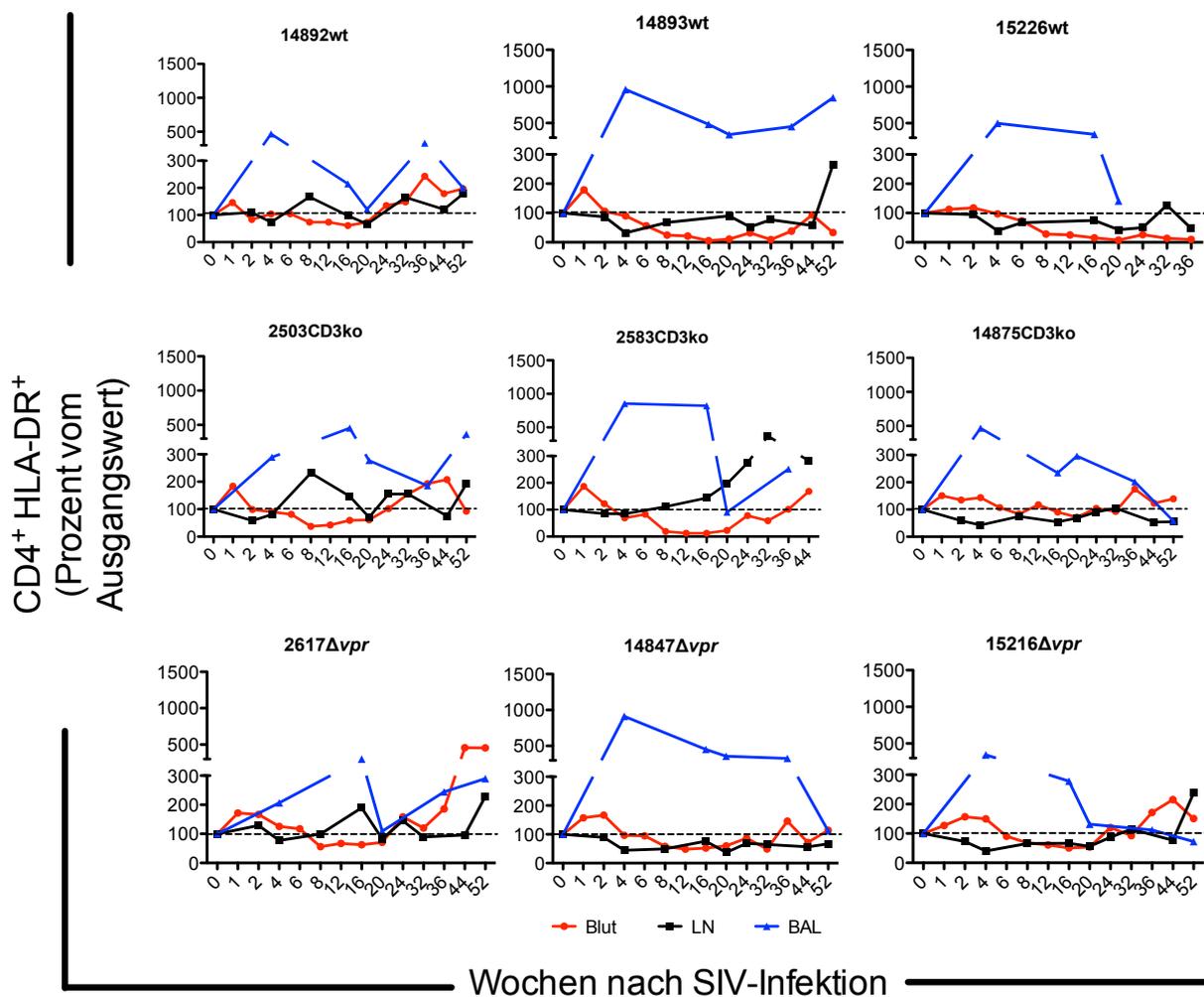


Abbildung 37: Immunaktivierung der CD4⁺ T-Zellen anhand der HLA-DR Expression im Infektionsverlauf. Die x-Achse zeigt die Wochen nach SIV-Infektion und die y-Achse die Prozentzahlen der CD4⁺ HLA-DR⁺ Zellen im Blut, LN und in der BAL als prozentualen Unterschied zum Ausgangswert. Pro Abbildung sind die Werte eines Tieres mit individuellen Kurvenverläufen aufgetragen, rot = Blut, schwarz = LN, blau = BAL. Der mittlere Basiswert vor der Infektion wurde aus zwei bis fünf Präwerten berechnet.

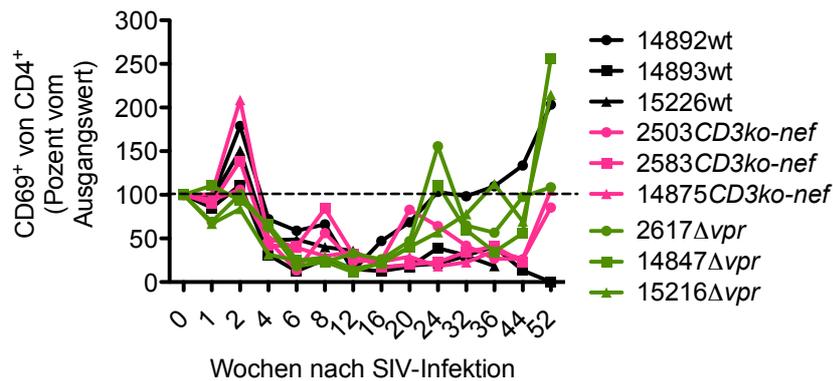


Abbildung 38: Immunaktivierung von CD4⁺ T-Zellen im Blut anhand der CD69 Expression im Infektionsverlauf. Die x-Achse stellt die Wochen nach SIV-Infektion und die y-Achse die CD69⁺ CD4⁺ T-Zellen als prozentualen Unterschied zum Ausgangswert dar. Die Werte der Tiere sind einzeln aufgetragen, schwarz = wt, rosa = CD3ko-nef, grün = Δvpr. Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von fünf Präwerten dar.

4.3.4.6 Prozentzahlen der zentralen und Effektor-Gedächtnis-CD4⁺ T-Zellen im Vollblut

In Abbildung 39A+B sind die prozentualen Anteile der zentralen (CD28⁺CD95⁺) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD28⁻CD95⁺) an den CD4-Zellen dargestellt. Der Anteil von zentralen Gedächtnis-T-Zellen an den CD4⁺ T-Zellen lag vor Infektion in allen Gruppen bei ca. 70-80%. In Woche 2 nach Infektion gab es nur in einem Tier (2583CD3ko) einen Verlust dieser Population auf ca. 45%. Alle anderen Tiere wiesen Werte wie vor der Infektion oder etwas höher (Δvpr-Gruppe) auf. In Woche 8 nach Infektion waren bei allen Tieren ähnliche bis leicht erhöhte Werte im Vergleich zu den Präwerten zu verzeichnen. Woche 24 nach Infektion gab es in allen Gruppen einen deutlichen Abfall, der jedoch nur in der CD3ko-Gruppe statistische Signifikanz erreichte. Dieser Abfall war am mildesten im 14892wt, 14875CD3ko und in der Δvpr-Gruppe ausfiel. Ähnliche Werte waren ebenfalls an Woche 52 nach Infektion zu verzeichnen.

Die Effektor-Gedächtnis-Zellen bildeten vor der Infektion mit durchschnittlich ca. 5% nur einen kleinen Teil der $CD4^+$ T-Zellen. In der frühen Phase der Infektion gab es in der Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg auf $12\% \pm 0.6$. In der Δvpr -Gruppe blieb ein vergleichbarer Anstieg aus. Die $CD3ko$ -Gruppe präsentierte sich sehr heterogen mit dem Tier 2583, bei dem ein ca. dreifacher Anstieg verzeichnet wurde sowie den restlichen beiden Tieren, die auf Ausgangslevel blieben. Die Werte in der chronischen Phase befanden sich bei allen Tieren der drei Gruppen mit kleinen Schwankungen wieder auf dem Ausgangsniveau.

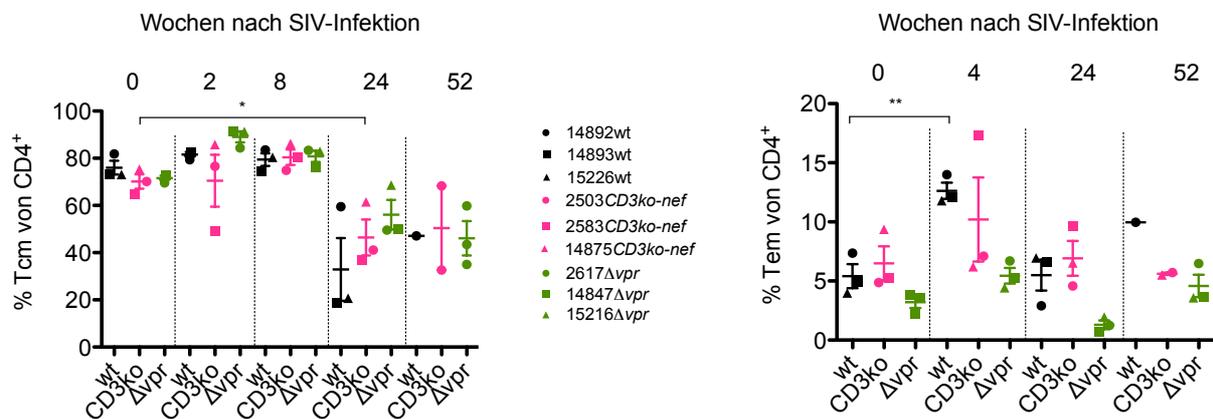


Abbildung 39: Zeitlicher Verlauf der Prozentzahlen von zentralen und Effektor-Gedächtnis-CD4⁺ T-Zellen im Blut nach Infektion. Die x-Achse zeigt die untersuchten Tiergruppen über die Zeit und die y-Achse die Prozentzahlen der zentralen (A) und Effektor-Gedächtnis-Zellen (B) als Anteil der CD4-Zellen. Die Werte der Tiere sind pro Gruppe einzeln aufgetragen, schwarz = wt, rosa = CD3ko, grün = Δvpr . Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von fünf Präwerten dar. Querstriche demonstrieren Mittelwerte, die Vertikalbalken den Standardfehler. Querbalken demonstrieren zusammenhängende signifikante Unterschiede von * $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$ nach dem gepaarten t-Test für verbundene Proben.

4.3.4.7 Gating-Strategie der B-Zellen

Nach Charakterisierung der Lymphozyten über einen niedrigen FSC-A und SSC-A folgte der Ausschluss der Dubletten zur Erfassung der Einzelzellen (Abbildung 40A). Danach wurden reife Zellen über die negative CD10 Expression identifiziert. Im Anschluss wurden die CD20⁺ B-Zellen allgemein und danach die naiven sowie die einzelnen Gedächtnis-B-Zellpopulationen über CD21 und CD27 Expression speziell charakterisiert. Ebenfalls von CD20⁺ B-Zellen wurde der Aktivierungsmarker CD80 analysiert. Zur Erfassung der Prozentzahlen der CD20⁺ B-Zellen (und der CD3⁺ T-Zellen) wurden wie zuvor beschrieben [145] die Lymphozyten über die Kombination der positiven CD45 Expression und des niedrigen SSC-A definiert (Abbildung 40B). Somit wurde die Anzahl der CD20⁻CD3⁻ Zellen reduziert und die Prozentzahlen korrekt dargestellt.

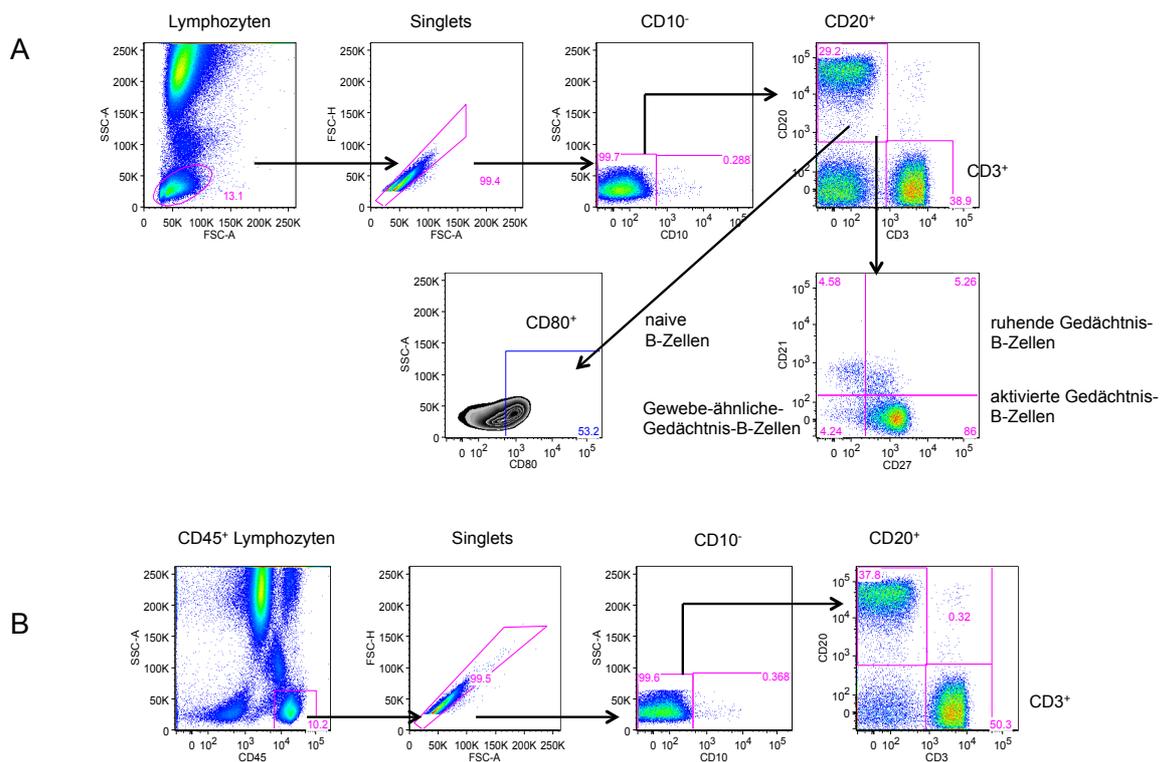


Abbildung 40: Gating-Strategie der B-Zellen in einer Vollblutprobe. Dargestellt sind exemplarische Dot Plots der verschiedenen B-Zellpopulationen. Rosa Linien markieren ein Gate, die Menge der darin enthaltenden Events ist als prozentualer Anteil an der vorherigen Population angegeben. Identifiziert werden in (A) Lymphozyten mit nachfolgender Charakterisierung von Einzelzellen, CD10⁻ Zellen, CD20⁺ B-Zellen und davon ausgehend CD80⁺ und naive B-Zellen sowie Gedächtnis-B-Zellpopulationen; in (B) CD45⁺ Lymphozyten, anschließend Einzelzellen, CD10⁻ Zellen und CD20⁺/CD3⁺ Zellen.

4.3.4.8 CD20-Zellzahlen im Vollblut und KM

Analog zu den verschiedenen T-Zellpopulationen wurden CD20⁺ B-Zellen longitudinal im Vollblut und KM untersucht (Abbildung 41A+B). Alle Gruppen wiesen im Vollblut Ausgangswerte von ca. 40% an CD20-Zellen als Anteil der CD45⁺ Lymphozyten auf. Markant war zu Woche 2 nach Infektion der deutliche Abfall in der Kontrollgruppe auf 24% ± 4 und in der CD3ko-Gruppe auf 20% ± 3, der in ersterer auch statistisch signifikant war. Dieser Abfall blieb in der Δvpr -Gruppe im gesamten Infektionsverlauf aus. Die Werte stiegen sogar teilweise in der chronischen Phase etwas an. In der Kontrollgruppe war der weitere Verlauf nach Woche 2 tierindividuell unterschiedlich. Das Tier 14892 zeigte nach Abfall durchgehend stabile Werte vergleichbar oder sogar zeitweise höher zum Ausgangswert. Bei dem Tier 14893 wurden in Woche 8 Prozentzahlen von B-Zellen detektiert, die ähnlich zum Ausgangswert waren. Im weiteren Krankheitsverlauf beliefen sich die B-Zellen jedoch auf ca. 30%. Die Werte des Tieres 15226 stiegen ebenfalls in Woche 8 auf Ausgangslevel, fielen danach jedoch auf Werte ähnlich der akuten Phase und blieben bis zu seinem Tod Woche 36 auf diesem Niveau. Die CD3ko-Gruppe präsentierte sich ebenfalls heterogen nach dem Abfall in der akuten Phase. Die Tiere 2583 und 14875 zeigten danach Werte auf Ausgangslevel, während das Tier 2503 auch in Woche 8 nach Infektion ähnlich niedrige Werte wie in Woche 2 zeigte, die sich erst ab Woche 16 wieder auf dem Ausgangsniveau befanden.

Im KM wurde ein ähnlicher Verlaufstrend wie im Vollblut beobachtet, der jedoch auch zu einigen Zeitpunkten unterschiedlich war. Die Ausgangswerte lagen in der Kontrollgruppe bei 38% ± 6, in der CD3ko-Gruppe bei 32% ± 3 und in der Δvpr -Gruppe bei 42% ± 3. Der Abfall zu Woche 2 nach Infektion in der Kontroll- sowie der CD3ko-Gruppe war ähnlich. In der Δvpr -Gruppe blieb dieser Abfall aus. Die nachfolgende Kinetik der B-Zellen im KM in der Kontrollgruppe verlief ähnlich wie die im Blut. Lediglich beim Tier 14892 ist an Woche 52 nach Infektion ein rapider Abfall im Vergleich zu Woche 36 zu verzeichnen, der so im Vollblut nicht vorhanden war.

Die CD3ko-Gruppe wies nach dem markanten Abfall der B-Zellen in Woche 2 im weiteren Verlauf der Infektion tierindividuelle Werte um das Ausgangsniveau und teilweise sogar höhere Werte auf. Wenige Wochen vor dem Tod des Tieres 2583 war der Anteil an B-Zellen bei dem Tier auf 50% des Ausgangswertes gesunken.

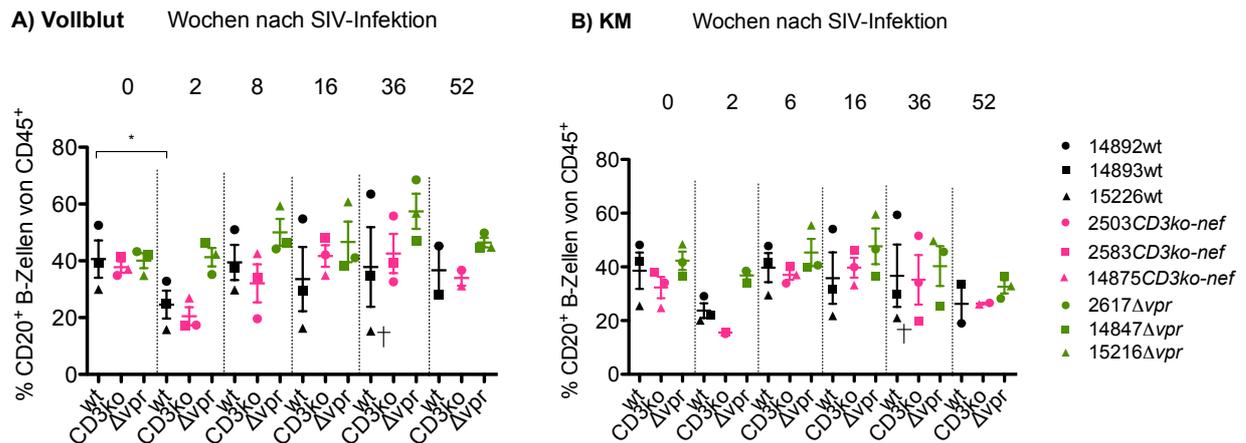


Abbildung 41: Prozentzahlen von CD20⁺ B-Zellen im Infektionsverlauf. Die x-Achse zeigt die untersuchten Tiergruppen und die y-Achse die Prozentzahlen der CD20⁺ B-Zellen als Anteil der CD45-Zellen im Vollblut (A) und KM (B). Die Werte der Tiere sind pro Gruppe einzeln aufgetragen, schwarz = wt, rosa = CD3ko, grün = Δvpr. Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von drei bis fünf Präwerten dar. Querstriche demonstrieren Mittelwerte, die Vertikalbalken den Standardfehler. Querbalken demonstrieren zusammenhängende signifikante Unterschiede von * $p < 0.05$ nach dem gepaarten t-Test für verbundene Proben.

4.3.4.9 Prozentzahlen der aktivierten Gedächtnis-B-Zellen im Vollblut

Die Population der aktivierten Gedächtnis-B-Zellen war von besonderem Interesse im Vollblut und wurde ebenfalls longitudinal untersucht (Abbildung 42). Dies lag darin begründet, dass diese Population während der akuten Phase depletiert wird und es daraus resultierend zu einer nachhaltigen Schädigung des immunologischen Gedächtnisses kommt [124-126]. Ausgangswerte der CD21⁻CD27⁺ Zellen als Prozent von CD20⁺ B-Zellen waren in

allen Gruppen ähnlich und bewegten sich zwischen 70%-72%. Auffällig war nachfolgend analog zu den CD20⁺ B-Zellen ein rascher Abfall zu Woche 2 nach Infektion in der Kontrollgruppe mit Werten von 53% ± 2. Dieser Unterschied zwischen Präwert und Woche 2 pi war statistisch signifikant ($p = 0.0400$). In der CD3ko-Gruppe war der Abfall zu Woche 2 bei zwei Tieren vorhanden, allerdings blieben die Spiegel bei dem Tier 14875 (Viruslast kontrollierend) konstant. Die Δvpr -Gruppe wies bemerkenswerterweise im gesamten Infektionsverlauf stabile Werte um das Ausgangsniveau auf und ab Woche 24 nach Infektion sogar geringgradig höhere Werte von ca. 80%. Der Anteil an CD21⁻CD27⁺ B-Zellen in der CD3ko-Gruppe erholte sich nach dem Abfall auf Ausgangsniveau und stieg teilweise in der chronischen Phase an. In der Kontrollgruppe wurde nach dem Abfall in Woche 2 ebenfalls bereits zwei Wochen später ein Anstieg der untersuchten B-Zellsubpopulation beobachtet. Diese Werte blieben bis Woche 8 auf Ausgangsniveau. Ab Woche 12 nach Infektion divergierten die Tiere stark individuell. Das Tier 14892 erholte sich nach dem frühen Abfall, die anderen beiden Tiere (14893 und 15226) wiesen bis zu ihrem Tod einen kontinuierlichen Abfall auf.

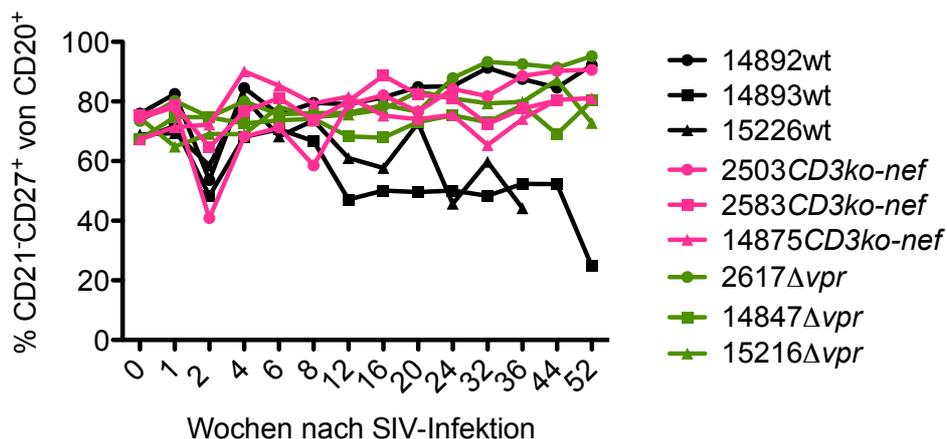


Abbildung 42: Prozentzahlen von aktivierten Gedächtnis-B-Zellen im Vollblut im Infektionsverlauf. Die x-Achse zeigt die Wochen nach SIV-Infektion und die y-Achse die CD21⁻CD27⁺ Zellen als Anteil der CD20⁺ B-Zellen. Die Werte der Tiere sind einzeln aufgetragen, schwarz = wt, rosa = CD3ko-nef, grün = Δvpr . Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von fünf Präwerten dar.

4.3.4.10 Immunaktivierung der B-Zellen

Die CD80 Expression wurde analysiert, um Aussagen über den Aktivierungszustand der B-Zellen zu treffen (Abbildung 43). Die CD3ko-Gruppe und die Δvpr -Gruppe zeigten sich homogen untereinander mit Ausgangswerten um 43%. Die Kontrollgruppe präsentierte sich heterogener, da ein Tier (15226) schon 88% als Ausgangswert aufwies. Die anderen beiden lagen durchschnittlich bei ca. 50%. Bei allen Tieren außer dem 14892wt kam es früh zu Woche 2 nach Infektion zu einem tierindividuellen Anstieg der CD80 Expression auf B-Zellen, der in der Δvpr -Gruppe statistisch signifikant war. Die höchsten Werte streuten zwischen allen Gruppen. Ein Jahr nach Infektion war diese erhöhte Expression noch bei dem 14893 aus der Kontrollgruppe zum Sektionstermin zu verzeichnen; die Werte des Tieres 14892wt blieben stabil um den Ausgangswert. Aus der CD3ko-Gruppe wies das Tier 2503 den gleichen Wert wie an Woche 2 auf und die Prozentzahlen des die Viruslast kontrollierenden Tieres 14875 erreichten nahezu den Ausgangswert. Das Gleiche galt für das Tier 15216 Δvpr . Die Werte des Tieres 14847 Δvpr fielen nach dem Anstieg an Woche 2 auf Ausgangsniveau an Woche 52 zurück. Die Prozentzahlen des Tieres 2617 Δvpr stiegen stetig bis auf ca. 70% ein Jahr nach Infektion an.

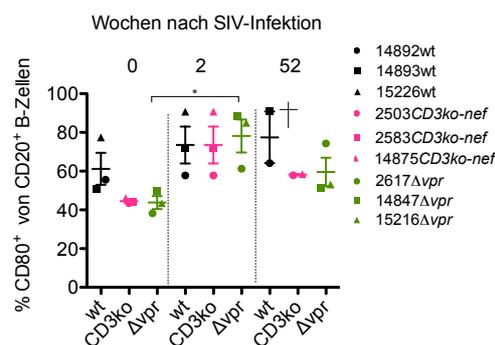


Abbildung 43: Prozentzahlen von CD80⁺ B-Zellen im Infektionsverlauf. Die x-Achse zeigt die untersuchten Tiergruppen und die y-Achse die Prozentzahlen der CD80⁺ B-Zellen als Anteil der CD20-Zellen im Vollblut. Die Werte der Tiere sind pro Gruppe einzeln aufgetragen, schwarz = wt, rosa = CD3ko, grün = Δvpr . Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von fünf Präwerten dar. Querstriche demonstrieren Mittelwerte, die Vertikalbalken den Standardfehler. Querbalken demonstrieren zusammenhängende signifikante Unterschiede von * $p < 0.05$ nach dem gepaarten t-Test für verbundene Proben.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Δvpr -Gruppe im Blut und in allen Organen eine bessere Erhaltung von CD4-Zellen generell aufwies, sowie, im Vergleich zu der Kontrollgruppe nur einen milden Abfall von zentralen Gedächtnis-CD4-Zellen im Blut zeigte. Eine frühe Immunaktivierung, gemessen am Neopterinpiegel im Urin und den CD69⁺CD4⁺ T-Zellen blieb ebenfalls aus. B-Zellen allgemein sowie die spezialisierten aktivierten Gedächtnis-B-Zellen blieben im Infektionsverlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe stabil.

Die CD3ko-Gruppe zeigte kein eindeutiges Bild in Hinblick auf die durchflusszytometrischen Analysen. Der Verlust der CD4-Zellen war im Blut zwar weniger ausgeprägt als in der Kontrollgruppe, es gab jedoch keinen Unterschied bezüglich des Verlusts im Colon. Das die Viruslast kontrollierende Tier zeigte stabile CD4-Zellzahlen im LN und in der chronischen Phase auch in der BAL. Bezüglich der Immunaktivierung, gemessen an Neopterin im Urin und CD69⁺CD4⁺ T-Zellen gab es keinen Unterschied zwischen dieser und der Kontrollgruppe, obwohl der höchste Wert dem die Viruslast kontrollierenden Tier zugeordnet werden konnte. Die beiden Tiere, die hohe Viruslasten aufwiesen, zeigten ebenfalls wie die Kontrollgruppe eine transiente Depletion der B-Zellen allgemein und der aktivierten Gedächtnis-B-Zellen, stabilisierten sich aber in der chronischen Phase.

4.3.5 Humorale Immunantwort

4.3.5.1 Bindende Antikörper gegen p27

Bindende Antikörper gegen p27 wurden longitudinal mittels ELISA analysiert (Abbildung 44). Die Tiere innerhalb der Gruppen waren ziemlich heterogen, weshalb hier eine Einzeltierdarstellung sinnvoll erschien. In der Kontrollgruppe gab es nur bei dem Tier 14892 einen stetigen Anstieg der gegen p27 gerichteten Antikörper. Die anderen beiden Tiere 14893 und 15226 dieser Gruppe zeigten lediglich einen transienten Anstieg. Das Tier 2503CD3ko zeigte ebenfalls nur einen transienten Anstieg. 2583CD3ko zeigte einen

geringen Anstieg zu Woche 4, die Werte fielen jedoch zu Woche 12 auf Ausgangswerte zurück und stiegen anschließend erneut. Die gegen p27 gerichteten Antikörper des die Viruslast kontrollierenden Tieres 14875CD3ko stiegen stetig ab Woche 4 nach Infektion. Die p27-Antikörper der Tiere 15216 Δ vpr und 14847 Δ vpr stiegen stetig im Infektionsverlauf. Das Tier 2617 Δ vpr zeigte zu Woche 8 einen ca. 1.5-fachen Anstieg der gegen 27 gerichteten Antikörper, der nach Woche 12 jedoch bereits rückläufig wurde.

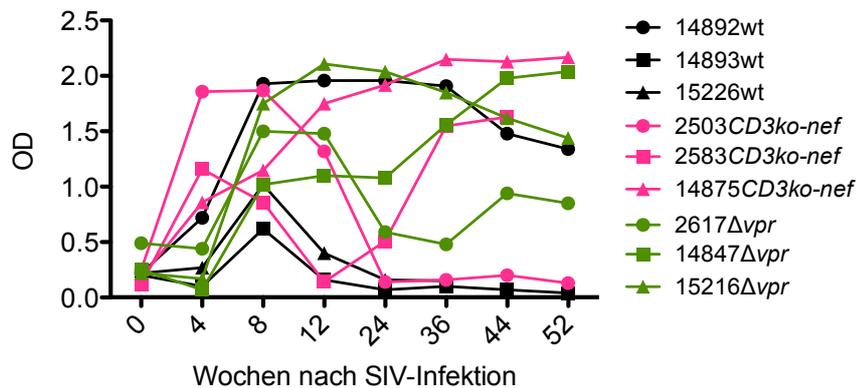


Abbildung 44: Spiegel bindender Antikörper gegen p27 im Plasma im Infektionsverlauf. Die x-Achse gibt die Wochen nach SIV-Infektion und die y-Achse die OD der bindenden Antikörper gegen p27 bei einer Plasmaverdünnung von 1:200 an. Die Werte der Tiere sind separat aufgetragen, schwarz = wt, rosa = CD3ko-nef, grün = Δ vpr. Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von drei Präwerten dar.

4.3.5.2 Bindende Antikörper gegen gp130

Bindende Antikörper gegen gp130 wurden longitudinal ebenfalls mittels ELISA analysiert (Abbildung 45). Alle Tiere zeigten zu Woche 8 einen starken Anstieg der gegen gp130 gerichteten Antikörper, der bei einigen Tieren mit Überschreitung des Schwellenwerts bereits ab Woche 4 begann. Die Werte der Gruppen CD3ko, Δ vpr und des Tieres 14892wt blieben danach über den gesamten Infektionsverlauf stabil im Sättigungsbereich. Lediglich die Tiere 14893wt und 15226wt zeigten deutlich niedrigere Werte.

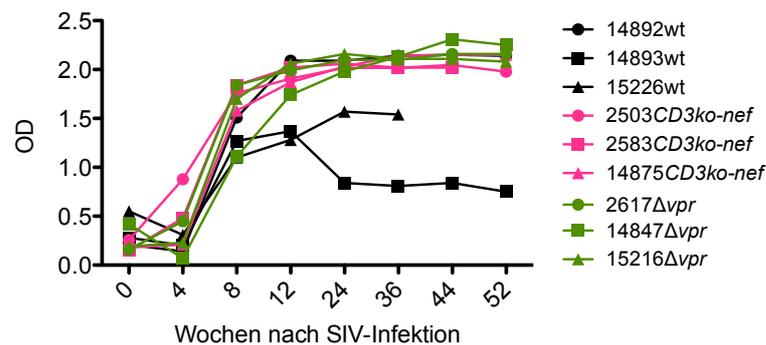


Abbildung 45: Spiegel bindender Antikörper gegen gp130 im Plasma im Infektionsverlauf. Die x-Achse zeigt die Wochen nach SIV-Infektion und die y-Achse die OD der bindenden Antikörper gegen gp130 bei einer Plasmaverdünnung von 1:200 an. Die Werte der Tiere sind individuell aufgetragen, schwarz = wt, rosa = *CD3ko-nef*, grün = Δvpr . Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von drei Präwerten dar.

4.3.5.3 Anzahl der Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen

Die Anzahl der Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen wurde longitudinal mittels B-Zell-ELISpot analysiert (Abbildung 46). Die Präwerte gestalteten sich mit 415 ± 64 in der Kontrollgruppe, 320 ± 34 in der *CD3ko*-Gruppe und 399 ± 63 Gesamt-IgG ASC in der Δvpr -Gruppe ähnlich. Bereits ab Woche 4 nach Infektion stiegen diese Werte auf durchschnittlich 1294 ± 97 aller Gruppen an, um in Woche 8 ihr Maximum von durchschnittlich 1965 ± 111 zu erreichen. In der chronischen Phase nahm diese Zellpopulation kontinuierlich ab, ohne jedoch wieder ihr Ausgangsniveau zu erreichen.

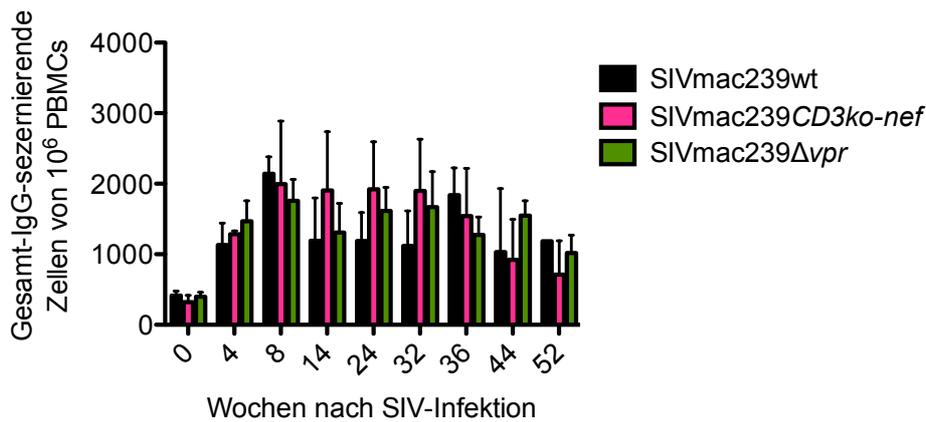


Abbildung 46: Anzahl der Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen im Infektionsverlauf. Die x-Achse zeigt die Wochen nach SIV-Infektion und die y-Achse die Anzahl der Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen. Die Mittelwerte für jede Gruppe sind separat aufgetragen, schwarz = wt, rosa = *CD3ko*, grün = *Δvpr*. Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von drei Präwerten dar. Die Vertikalbalken demonstrieren den Standardfehler.

4.3.5.4 Prozentzahlen der gp130-spezifischen Antikörper-sezernierenden Zellen

Die Anzahl der gp130-spezifischen ASC wurde longitudinal ebenfalls mittels B-Zell-ELISpot analysiert (Abbildung 47) und als prozentualer Anteil der Gesamt-IgG ASC dargestellt. Ähnlich zu den Ergebnissen des ELISA wurden in der Kontrollgruppe nur bei dem Tier 14892 über den Infektionsverlauf stabile Spiegel von gp130-spezifischen ASC gemessen, die zwischen 1-3% lagen. In den anderen beiden Tieren 14893 und 15226 waren diese Reaktivitäten nur temporär vorhanden. In zwei Tieren der *CD3ko*-Gruppe waren ab Woche 4-8 nach Infektion gp130-spezifische ASC nachweisbar, die sich zwischen 2-4% bewegten; bei dem Tier 14875 war diese Zellpopulation erst ab Woche 32 zu finden. Bei zwei Tieren der Gruppe stiegen die Werte in Woche 52 auf 5-7%, der höchste Wert trat bei dem Tier 14875, das die Viruslast kontrollierte, auf. Hingegen fielen die Werte bei dem Tier 2583 nach kurz vor seinem Tod in Woche 44 auf 0.5% ab. In der *Δvpr*-Gruppe konnten ebenfalls ab Woche 4-8 stabile Spiegel an gp130-spezifischen ASC zwischen ca. 2-6% gemessen

werden. Der generell höchste Wert mit 13% war bei dem temporär die Viruslast kontrollierenden Tier 14847 in Woche 52 zu beobachten.

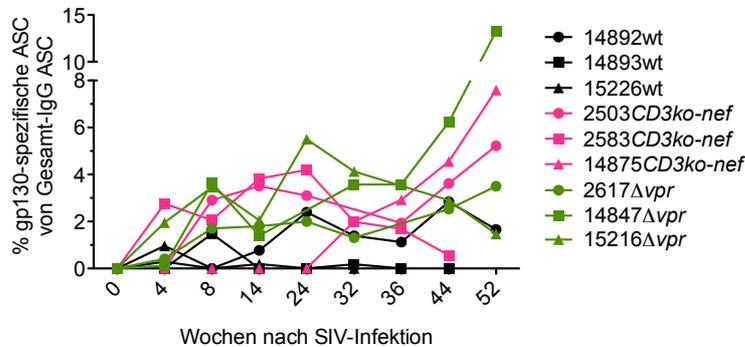


Abbildung 47: Prozentzahlen der gp130-spezifischen ASC im Infektionsverlauf. Die x-Achse zeigt die Wochen nach SIV-Infektion und die y-Achse die Prozentzahlen der gp130-spezifischen ASC als Anteil der Gesamt-IgG ASC. Die Werte der Tiere sind einzeln aufgetragen, schwarz = wt, rosa = *CD3ko-nef*, grün = Δvpr . Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von drei Präwerten dar.

4.3.5.5 Etablierung der Stimulation zur quantitativen Bestimmung der gp130-spezifischen Antikörper-sezernierenden Gedächtnis-B-Zellen

Zur Analyse der gp130-spezifischen Antikörper-sezernierenden Gedächtnis-B-Zellen musste initial noch eine geeignete Stimulation etabliert werden. Gedächtnis-B-Zellen müssen im Gegensatz zu Plasmablasten vorher mit bestimmten Reagenzien *in vitro* stimuliert werden, um zu Plasmablasten zu differenzieren und Antikörper zu sezernieren. In Abbildung 48 sind die Ergebnisse der Etablierung einer geeigneten Stimulation mit PBMCs von fünf SIV-infizierten Rhesusaffen gezeigt, die seit Jahren erfolgreich die Viruslast kontrollieren (LTNPs). Wie im Abschnitt Material und Methoden erläutert, wurden als geeignete Reagenzien CpG ODN 2006 und PWM vor rhIL-2 und R848 bevorzugt sowie die Dauer der Stimulation auf drei Tage festgelegt.

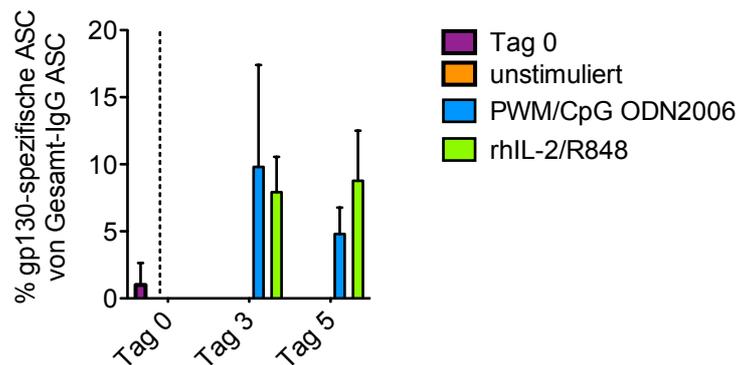


Abbildung 48: Prozentzahlen der gp130-spezifischen Antikörper-sezernierenden Gedächtnis-B-Zellen im Blut von LTNPs bei Verwendung verschiedener Stimulationsprotokolle (n=5). Die x-Achse zeigt die Dauer der Stimulation und die y-Achse die Prozentzahlen der gp130-spezifischen Antikörper-sezernierenden Gedächtnis-B-Zellen als Anteil der Gesamt-IgG ASC. Gezeigt sind die Mittelwerte als dicke Vertikalbalken mit dünnen Vertikalbalken, welche die Standardabweichung verdeutlichen. In lila = Tag 0, orange = unstimulierte Kontrolle, blau = Stimulation mit PWM + CpG ODN 2006, grün = Stimulation mit rhIL-2 + R848.

4.3.5.6 Prozentzahlen der gp130-spezifischen Antikörper-sezernierenden Gedächtnis-B-Zellen

Der B-Zell-ELISpot mit Stimulation zur Quantifizierung der Gedächtnis-B-Zellen in Hinblick auf SIV-spezifische ASC wurde bei den Tieren der Pathogenesestudie in Woche 12 und 52 nach Infektion durchgeführt (Abbildung 49). In Woche 12 nach Infektion waren bei allen Tieren prozentual nur ca. 0.5 bis 1.6% gp130-ASC zu verzeichnen. Ähnlich den übrigen Ergebnissen zur SIV-Env-spezifischen B-Zellantwort konnten keine gp130-spezifischen ASC bei den beiden verstorbenen Tieren 14893 und 15226 aus der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Zu Woche 52 nach Infektion kam es jedoch in den verbliebenen Tieren zu einer deutlichen Expansion der gp130-spezifischen ASC auf Werte zwischen 14-20%. Lediglich bei dem 15216 aus der Δvpr -Gruppe konnten nur ca. 3% an gp130-spezifischen ASC nachgewiesen werden. Dieses spiegelt die Ergebnisse aus dem B-Zell-ELISpot ohne Stimulation wider, wo ebenfalls bei demselben Tier die niedrigsten Werte gemessen wurden.

Leider war bei dem Tier 14892 aus der Kontrollgruppe aufgrund einer hohen Hintergrundreaktion kein Wert zu Woche 52 nach Infektion bestimmbar.

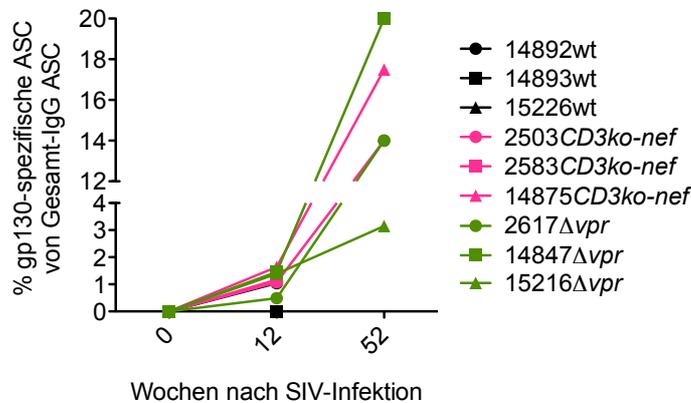


Abbildung 49: Prozentzahlen der gp130-spezifischen Antikörper-sezernierenden Gedächtnis-B-Zellen im Infektionsverlauf. Auf der x-Achse sind die Wochen nach SIV-Infektion dargestellt und auf der y-Achse die Prozentzahlen der gp130-spezifischen ASC als Anteil der Gesamt-IgG ASC. Die Werte der Tiere sind individuell aufgetragen, schwarz = wt, rosa = *CD3ko-nef*, grün = *Δvpr*. Werte vor der Infektion stellen sich als Mittelwert von drei Präwerten dar.

4.3.6 Korrelationen zwischen humoralen Immunantworten und B-Zell-

Subpopulationen

Die Prozentzahlen der aktivierten Gedächtnis-B-Zellen korrelierten signifikant mit den bindenden Antikörpern gegen p27 und gp130 (Abbildung 50A) und den Prozentzahlen der gp130-spezifischen ASC über den gesamten Infektionsverlauf (Abbildung 50B).

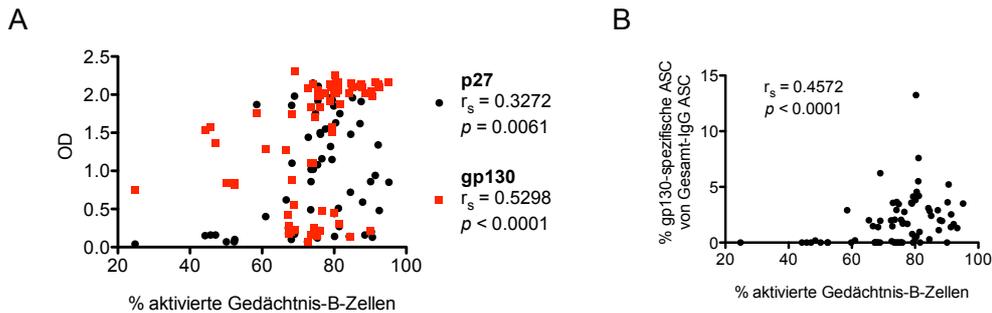


Abbildung 50: Korrelation der aktivierten Gedächtnis-B-Zellen mit den bindenden Antikörpern gegen p27 und gp130 und den gp130-spezifischen ASC. Auf der x-Achse sind die Prozentzahlen der aktivierten Gedächtnis-B-Zellen angegeben, auf der y-Achse die OD der bindenden Antikörper gegen p27 und gp130 (A) und die Prozentzahlen der gp130-spezifischen ASC (B) von Woche 0 bis Woche 52 nach Infektion. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient r_s und der p -Wert verdeutlichen die signifikante Korrelation beider Parameter.

Die langlebigen Plasmazellen korrelierten signifikant (im Blut) mit den Prozentzahlen der gp130-spezifischen ASC zu Woche 52 nach Infektion (Abbildung 51).

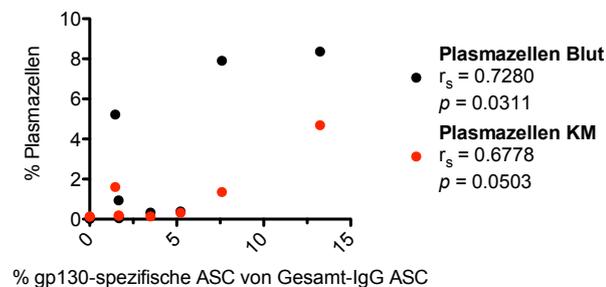


Abbildung 51: Korrelation der Plasmazellen im Blut und KM mit den gp130-spezifischen ASC zu Woche 52 nach Infektion. Auf der x-Achse sind die Prozentzahlen der gp130-spezifischen ASC als Anteil an den Gesamt-IgG ASC gezeigt, auf der y-Achse die Prozentzahlen der Plasmazellen im Blut und KM an Woche 52 nach Infektion. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient r_s und der dazugehörige p -Wert verdeutlichen die signifikante Korrelation der Parameter.

Eine signifikante positive Korrelation wurde auch zwischen den T_{FH} -Zellen im LN und den Gesamt-IgG ASC im Blut über den gesamten Infektionsverlauf beobachtet (Abbildung 52).

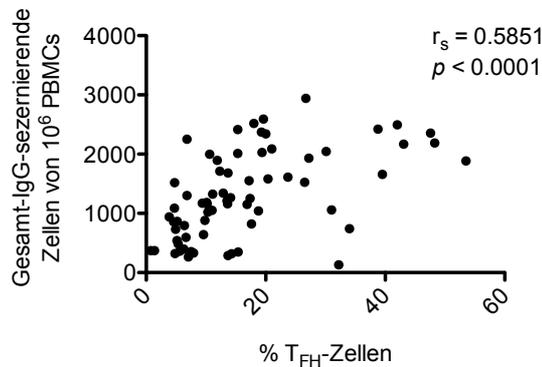


Abbildung 52: Korrelation der T_{FH} -Zellen im LN und den Gesamt-IgG ASC im Blut. Auf der x-Achse sind die Prozentzahlen der T_{FH} -Zellen gezeigt, auf der y-Achse die Anzahl der Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen über Woche 0 bis Woche 52 nach Infektion. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient r_s und der dazugehörige p -Wert verdeutlichen die signifikante positive Korrelation der Parameter.

Die Prozentzahlen der im B-Zell-ELISpot bestimmten gp130-spezifischen ASC im Blut korrelierten signifikant mit den im ELISA nachgewiesenen bindenden Serumantikörpern gegen gp130 (Abbildung 53).

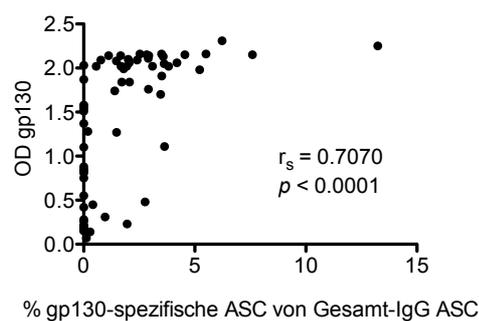


Abbildung 53: Korrelation der gp130-spezifischen ASC mit den bindenden Antikörpern gegen gp130. Auf der x-Achse sind die Prozentzahlen der gp130-ASC als Anteil der Gesamt-IgG ASC aufgetragen, auf der y-Achse die OD der bindenden Antikörper gegen gp130 von Woche 0 bis Woche 52 nach Infektion. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient r_s und der dazugehörige p -Wert verdeutlichen die signifikante positive Korrelation der Parameter.

5. Diskussion

5.1 Kryokonservierte mononukleäre Zellen aus Blut und verschiedenen lymphoiden und nicht lymphoiden Organen sind im Vergleich zu frischen Proben signifikant verändert.

Studien über den Nutzen von kryokonserviertem Material bezüglich der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung von B-Zellen existieren weder mit menschlichen Proben noch solchen von RM. Somit wurde in der vorliegenden Doktorarbeit untersucht, ob sich bei -80°C gelagertes kryokonserviertes Material von PBMCs und verschiedenen repräsentativen lymphoiden und nicht lymphoiden Organen überhaupt für die phänotypische Charakterisierung von B-Zellpopulationen und Plasmazellen bei RM eignet. Die vorliegenden Daten in dieser Arbeit wurden bereits teilweise publiziert [145].

Die Analysen ergaben, dass die Prozentzahlen von B-Zellen allgemein stabil in Proben von kryokonservierten PBMCs im Vergleich zu frischem Material sind (Tabelle 9). Dagegen waren nach Kryokonservierung in allen anderen untersuchten Organen höhere Prozentzahlen an B-Zellen zu beobachten. Dieses Ergebnis, dass die Prozentzahlen von B-Zellen in kryokonservierten PBMCs erhalten bleiben, ist im Einklang mit einer vorherigen Studie [132], wohingegen auch signifikante Verluste von B-Zellen nach Kryokonservierung beschrieben wurden [134]. Bei beiden Studien wurde jedoch für die Charakterisierung von B-Zellen im Menschen vornehmlich die Expression von CD19 untersucht. Bei RM werden B-Zellen jedoch überwiegend über die Expression von CD20 definiert [155, 156]. Allerdings war bislang nicht bekannt, ob sich der Anteil an CD20^+ RM MNCs nach Kryokonservierung verändert. Die Ergebnisse bezüglich der höheren Prozentzahlen von B-Zellen in den lymphoiden Organen sowie dem mukosalen Gewebe des Darms (Tabelle 9) können möglicherweise durch einen Verlust an CD3^+ T-Zellen und damit verbundenem prozentualen Anstieg der CD20^+ B-Zellen erklärt werden. Tatsächlich konnte in allen Organen, jedoch

nicht im Blut, ein prozentualer Verlust von CD3⁺ T-Zellen festgestellt werden (eigene Beobachtung, Daten nicht gezeigt).

Die Hauptbefunde dieser Arbeit konzentrierten sich auf alle Zellpopulationen, die CD27 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Hier war ebenfalls KM das am stärksten von der Kryokonservierung betroffene Organ. Es gab in jedem Organ einen signifikanten Verlust von CD21⁺CD27⁺ aktivierten Gedächtnis-B-Zellen. Die Prozentzahlen der ruhenden Gedächtnis-B-Zellen waren ebenfalls erniedrigt. Entsprechend waren die prozentualen Anteile der naiven oder Gewebe-ähnlichen Gedächtnis-B-Zellen im selben Zuge erhöht (Tabelle 9).

Das gleiche Phänomen spiegelte sich in den Prozentzahlen der B-Zellen mit und ohne Klassenwechsel wider, was einen Verlust von IgM- und IgG-/IgA-sezernierenden B-Zellen darstellte. Diese Veränderungen wurden in allen Organen und PBMCs beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass während der Kryokonservierung der Marker CD27 durch einen noch unbekanntem Mechanismus massiv beeinflusst wird.

CD27 ist ein 55kDa großes, glykosyliertes Typ I Transmembranprotein, das zu der TNF-Rezeptor-Superfamilie gehört. Zusammen mit seinem Liganden CD70 liefert es kostimulierende Signale für die T- und B-Zell-Aktivierung, Proliferation und Immunglobulinproduktion [149].

Drei mögliche Mechanismen könnten die erniedrigten Prozentzahlen von CD27⁺ Zellen erklären. Zum einen kann es zur Abspaltung von CD27 und einer damit entstehenden löslichen Form kommen, und zum anderen kann es zu einer Herabregulierung der Expression auf der Zelloberfläche kommen. Zudem kann es zu einem selektiven Absterben dieser Zellpopulation kommen.

Es ist bereits bekannt, dass CD27 für eine proteolytische Spaltung anfällig ist. Während der HIV-Infektion und verschiedener AIDS-bedingter Tumore kann es zu einer erniedrigten Prozentzahl von zirkulierenden B-Zellen mit CD27 auf der Zelloberfläche kommen und damit einhergehend mit einem erhöhten Anteil einer löslichen Form von CD27 (sCD27) [157-159].

Weiterhin wird sCD27 nach T-Zellaktivierung von der Zelloberfläche durch Metalloproteinasen abgelöst und freigesetzt, was durch Proteinaseinhibitoren gehemmt

werden kann [160-164]. Eine weitere Möglichkeit der verringerten CD27-Expression in kryokonservierten Proben könnte in seiner Herabregulierung begründet sein. Es wurde bereits berichtet, dass die direkte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch Phorbolester die CD27 Expression auf der Zelloberfläche herunterreguliert [165]. Der Prozess der Kryokonservierung wiederum kann zu einer Aktivierung von Proteinkinasen führen, was für tiefgefrorene Arterien gezeigt wurde [166]. Dies ist reversibel, da der Schaden durch Zugabe von Staurosporin, einem Proteinkinase-Inhibitor, gehemmt werden kann [167]. Ein selektives Absterben der Zellen, die CD27 auf der Zelloberfläche exprimieren, ist eine weitere mögliche Erklärung und erscheint sinnvoll, wenn man bedenkt, dass alle Populationen mit diesem Marker betroffen waren. Eine kürzlich erschienene Publikation zeigte, dass Caspasen in den Kryokonservierungs-induzierten Stress involviert sind [168]. Somit könnten spezifische Caspasen aktiviert sein, die an der Apoptose der Zellen beteiligt sind.

Welche Ursache zum Verlust der CD27⁺ B-Zell Subpopulationen nach Kryokonservierung führt (Aktivierung von Proteinkinasen mit nachfolgender Herabregulierung von CD27, Bildung einer löslichen Form von CD27 oder selektives Absterben), kann abschließend nicht benannt werden. Dafür wären weitere Experimente, wie z.B. die Zugabe von Proteinkinase-Inhibitoren vor der Kryokonservierung oder die Analyse von möglichem sCD27 im Überstand der aufgetauten Zellsuspensionen anzuschließen, um zu verstehen, was zu den erniedrigten Prozentzahlen von zirkulierenden aktivierten und ruhenden Gedächtnis-B-Zellen führt.

Die Ergebnisse bezüglich der funktionellen Kapazität der B-Zellen (Abbildung 16 A+B), die mithilfe des ELISpots ermittelt wurden, passen zu den Ergebnissen der Prozentzahlen der Plasmablasten/Plasmazellen in den kryokonservierten Proben. Es ist nicht erstaunlich, dass es auch funktionelle Einbußen in den aufgetauten Proben gibt, wenn derartig massive Veränderungen bei den aktivierten Gedächtnis-B-Zellen vorhanden sind. Eine zweistündige Ruhephase verbesserte die Anzahl der Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen; inwieweit eine noch längere Ruhepause die funktionelle Kapazität verbessern könnte, muss noch evaluiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei -80°C für maximal ein halbes Jahr kryokonservierte Proben von PBMCs und anderen Organen anfällig für Kryokonservierungsinduzierte Veränderungen in Hinblick auf Phänotyp und Funktion von B- und Plasmazellen sind und daher nur bedingt für retrospektive Analysen geeignet sind. CD27 wurde hierbei als Marker identifiziert, der möglicherweise verlässlich ist, eine gute Aussage über die Qualität der kryokonservierten Proben zu treffen.

Optimierungsmöglichkeiten bestehen nichtsdestotrotz sicherlich bei der Lagerungstemperatur der Proben. Alle Proben wurden zwischen zwei und sechs Monaten bei -80°C asserviert, bevor sie untersucht wurden. Es gibt einige Studien über den Einfluss der Temperatur sowie die Dauer der Lagerung von kryokonservierten Proben und den damit verbundenen Akzeptanzkriterien, wobei die Lagerung in flüssigem Stickstoff den Goldstandard darstellt [169-174].

Nichtsdestotrotz sprechen finanzielle und sicherheitsrelevante Argumente für eine Lagerung bei -80°C . In einer Studie wurde beschrieben, dass eine kurze Lagerung von PBMCs bei -70° (von drei Monaten) verglichen mit der Lagerung über den gleichen Zeitraum in flüssigem Stickstoff keinen Unterschied bezüglich der Rate der Apoptose ergab [170]. Eine weitere Publikation beschrieb, dass Proben, die für drei Wochen bei -70°C gelagert und dann auf Trockeneis transportiert wurden, keine Unterschiede zu einer Lagerung bei niedrigeren Temperaturen bezüglich der funktionellen T-Zellanalyse mittels ELISpot zeigten [175].

Eine Studie, die einen signifikanten Abfall von regulatorischen T-Zellen in kryokonserviertem Material bei HIV-Patienten zeigte, benutzte Proben, die für zwei Wochen bei -80°C gelagert wurden [176]. Eine spätere Publikation bestätigte dieses Phänomen, obwohl die benutzten Proben in flüssigem Stickstoff über den gleichen Zeitraum gelagert wurden [177]. Die Vermutung liegt nahe, dass der Effekt der phänotypischen Veränderungen nicht durch die Temperatur bedingt ist, sondern generell auf den Einfrierstress zurückzuführen ist.

Diese Erklärung könnte ebenfalls auf die Beobachtungen in dieser Arbeit zutreffen. Proben von PBMCs und KM, die ca. ein Jahr in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, ergaben ein ähnliches Bild bezüglich des veränderten Phänotyps (Daten sind nicht gezeigt). Obwohl hier

kein autologes frisches Material vergleichend herangezogen werden konnte, wiesen sie große Ähnlichkeit zu den beschriebenen tiefgefrorenen Proben auf, was die niedrige Anzahl der CD27⁺ Zellen betrifft. Nichtsdestotrotz wäre es gerechtfertigt, systematisch vergleichend eine Lagerung bei -150°C der verschiedenen Organe von frischen und autologen tiefgefrorenen Proben auf phänotypische und funktionelle Unterschiede bei B- und Plasmazellen zu untersuchen. Eventuell könnte dieser Parameter entscheidend bei den verschiedenen Ansprüchen der Organe an das Einfrieren sein.

5.2 CD138 ist ein geeigneter Marker zur Charakterisierung von Plasmazellen im Rhesusaffen.

Im Vorfeld musste untersucht werden, welchen Phänotyp Plasmazellen im RM aufweisen, da diese Population zu Beginn dieser Doktorarbeit im RM noch nicht ausreichend charakterisiert war. In dieser Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob CD138⁺ Zellen analog zu dem humanen System ebenfalls Plasmablasten/Plasmazellen sind. Tatsächlich wurde durch magnetische Aufreinigung von CD138⁺ Zellen aus dem peripheren Blut und deren Analyse im B-Zell-ELISpot ohne weitere Stimulation nachgewiesen, dass diese Population tatsächlich IgG-sezernierende Plasmablasten/Plasmazellen darstellt (Abbildung 19). Ein indirekter Beweis über die Reinheit wurde mittels Durchflusszytometrie erbracht (Abbildung 17+18).

Während für menschliche Proben bereits wiederholt publiziert wurde, dass CD138 der klassische und universelle Plasmazellmarker für normale sowie tumorös veränderte Plasmazellen ist [151, 178-181], gibt es im RM nur wenige Analysen hierzu. Eine frühere Studie mit SIV-infizierten RM nutzte ebenfalls CD138 zur Charakterisierung von Plasmazellen [150], so wie wir ebenfalls Plasmazellen/Plasmablasten über CD138 (in Kombination mit anderen Markern) im Rhesusaffen definiert haben [145, 146]. Hingegen wurden in einer aktuellen Studie Plasmablasten im Affen als CD138⁻ [182] charakterisiert. In dieser wird die Population jedoch zudem als CD19⁻ und CD27⁻ definiert, was den Befunden

dieser Doktorarbeit deutlich widerspricht. Dies wurde in einer weiteren Publikation unserer Arbeitsgruppe bestätigt und könnte an den unterschiedlich verwendeten Klonen von anti-CD19 mAk liegen [146]. Man ist sich jedoch darüber einig, dass die CD138 Expression mit dem Reifegrad der Plasmazellen steigt [152]. Das bedeutet, dass die zirkulierenden Plasmazellen im Blut sowohl CD138⁻ als auch CD138⁺ sein können und mit Besetzen spezieller Überlebensnischen im KM die CD138 Expression hochregulieren.

Der Nachweis, dass 138⁺ Zellen tatsächlich Plasmazellen sind, wurde mit verschiedenen Techniken erbracht. Eine zu dieser Doktorarbeit vergleichbare Studie beschrieb ebenfalls die magnetische Aufreinigung von CD138⁺ Zellen aus dem KM von Mäusen, sowie die Bestimmung des Plasmazellstatus über einen IgG-ELISA [183]. Hier wurde nachgewiesen, dass die Selektion der CD138⁺ Zellen spezifisch war, da das Eluat keine CD138⁺ Zellen mehr enthielt, was sich auch in dieser Arbeit für Rhesusaffen-Plasmazellen bestätigte. Leider konnte in dieser Arbeit die gewonnene CD138⁺ Fraktion nicht adäquat durchflusszytometrisch erfasst werden, da vermutlich die magnetischen Beads die Analyse gestört haben. Somit erfolgte auch hier der Beweis indirekt. Eine ähnliche Studie setzte ebenfalls die magnetische Aufreinigung von humanen CD138⁺ Zellen aus dem KM ein und erbrachte den Plasmazellnachweis über einen IgG-ELISA und mikroskopischer Analyse der Morphologie [152]. In einer anderen Studie wurden CD20⁻CD38⁺⁺CD138⁻ und CD20⁻CD38⁺⁺CD138⁺ Zellen aus dem Blut von gesunden menschlichen Blutspendern sortiert und der Plasmazellstatus über eine morphologische Analyse bestätigt [184]. Es gab diesbezüglich keinen Unterschied zwischen beiden Populationen. In der bereits oben zitierten Studie mit Rhesusaffen wurde der Nachweis der Plasmazellen ebenfalls mit einem B-Zell-ELISpot ohne Stimulation der Zellen erbracht [150]. Hier wurden jedoch sortierte CD19⁺CD21⁻CD27⁻ Zellen als Plasmazellen definiert, da sie spontan IgG und IgA sezernierten.

In einer Erweiterung meines Versuchs wäre es nun denkbar, zusätzlich zu der magnetischen Aufreinigung aus dem Blut auch CD138⁺ Zellen aus dem KM zu untersuchen, da dieses als Nische für langlebige Plasmazellen dient. Dazu wäre es jedoch nötig, mehr Aspirat aus dem

KM zu sammeln, was methodisch nicht bei jedem Tier möglich ist. Zudem müsste eine Etablierung der Isolierung von mononukleären Zellen aus dem KM-Aspirat erfolgen. Zusätzlich zu dem Funktionsnachweis mit Hilfe des B-Zell-ELISpots könnte mit den aufgereinigten Zellen aus dem Blut auch ein Ausstrich mit einer Färbung und morphologischen Analyse der sortierten CD138⁺ Zellen durchgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Doktorarbeit erfolgreich CD138⁺ Plasmablasten/Plasmazellen aus dem Blut isoliert wurden und zusätzlich bewiesen wurde, dass diese Population funktionell tatsächlich Antikörper-sezernierende Zellen im Rhesusaffen darstellt.

5.3 Die LN-FNA stellt eine geeignete Methode zur longitudinalen Analyse von T-Zell-Populationen im Lymphknoten dar und ist mit der klassischen Methode der kompletten Exstirpation eines Lymphknotens vergleichbar.

Während einer SIV-Infektion etablieren sich immunologische Dysfunktionen bereits früh in lymphoidem Gewebe. Deswegen ist dessen Analyse von größter Wichtigkeit in Pathogenesestudien von SIV. Leider ist eine engmaschige, longitudinale Probennahme von LN aufgrund der Invasivität und der Zugänglichkeit limitiert. Die üblich angewandte komplette Exstirpation eines Lymphknotens stellt eine invasive Methode dar, die auch aufgrund ethischer Bedenken nicht sehr oft angewendet werden kann. Deshalb war es vor Beginn der SIV-Studie nötig, eine neue Methode zu etablieren, die eine häufige Probenentnahme des lymphoiden Gewebes erlaubt. Dabei sollte sie sicher und schonend für die Tiere sein. Die Methode der LN-FNA wurde hierfür näher ins Auge gefasst.

Die LN-FNA wird oft bei Menschen genutzt. Eine Vielzahl von Studien belegen, dass die LN-FNA eine nützliche Technik zur immunophänotypischen Analyse von Lymphozytenpopulationen und der Diagnose von Lymphadenopathien bei HIV darstellt [185-188]. Die meisten dieser HIV-Studien fokussierten sich auf die zytologische Diagnose von

Lymphadenopathien [189-199]; in einigen wenigen wurde die FNA auch für die Erfassung von Prozentzahlen von verschiedenen T-Zell-Populationen oder der lymphoiden Viruslast bei HIV genutzt [200-204].

Zu Beginn dieser Doktorarbeit gab es keine Studie, die eine LN-FNA im SIV-Modell bei RM durchgeführt hat. Eine Untersuchung an SIV-negativen Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) ergab, dass die LN-FNA longitudinal gut anwendbar und zudem vergleichbar zu einem komplett exstirpierten Lymphknoten bezüglich der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung verschiedener Lymphozytenpopulationen war [205]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde dieser Ansatz für den Rhesusaffen adaptiert. Zuerst wurde die Methode an SIV-negativen RM vergleichend zwischen dem Aspirat und einem ipsilateral entnommenen Lymphknoten durchgeführt. T-Zell-Populationen wie CD4⁺, CD8⁺ und Gedächtnis-T-Zellen sowie T_{FH}-Zellen waren in den Aspiraten gut identifizierbar. Zusätzlich waren die Prozentzahlen dieser untersuchten Populationen in den Aspiraten vergleichbar mit denen in den Zellsuspensionen aus dem ipsilateral entnommenen Lymphknoten (Abbildung 28+29, Tabelle 11), was mit den Daten aus den Schweinsaffen übereinstimmte [205]. Diese Daten wurden von uns bereits publiziert [153]. Nichtsdestotrotz gab es eine geringfügig höhere Variation der Prozentzahlen in den Aspiraten im Vergleich zu den Zellsuspensionen der kompletten Lymphknoten. Eine mögliche Erklärung ist die Kompartimentalisierung des normalen Lymphknotens, die eine bevorzugte Probenentnahme entweder der B- oder T-Zell-Areale bedingt [205]. Eine ausreichende Passagierung durch den Lymphknoten muss sichergestellt werden, um dieses Risiko so gering wie möglich zu halten.

Ein immenser Vorteil der LN-FNA ist seine geringe Invasivität. Der LN verbleibt in seinem anatomischen Netzwerk und die immunologische Homöostase wird nicht gestört, was bei Langzeitexperimenten und häufigen Lymphknotenexstirpationen unter Umständen zu verfälschten Resultaten führen könnte. Zudem trägt die LN-FNA zu dem 3R-Konzept nach Russel und Burch bei [154], da es eine Verbesserung der Methoden bei Tierexperimenten darstellt. Die Tiere erleiden keine postoperativen Schmerzen oder mögliche Komplikationen durch die komplette operative Entnahme eines Lymphknotens. Es bedarf ebenfalls nicht der

prophylaktischen Antibiotikagabe und auch die effektive Zeit in Narkose ist um die Hälfte verringert, da die LN-FNA sehr viel schneller durchzuführen ist.

Eine große Herausforderung, besonders für funktionelle Tests, ist jedoch die gewonnene Zellzahl in den Aspiraten (Abbildung 30). Diese ist gering, jedoch ausreichend für die phänotypische Charakterisierung. Wenn mehr Zellen benötigt werden, müssten mehr Passagen durch den Lymphknoten durchgeführt oder ein stärkeres Vakuum benutzt werden. Dieses könnte jedoch zu einer erhöhten Blutkontamination führen und muss deswegen in zukünftigen Studien vorher evaluiert werden.

Durch die Implementierung der LN-FNA war es möglich, T-Zellpopulationen wie die T_{FH} -Zellen longitudinal während einer SIV-Infektion engmaschig zu untersuchen. Diese Zellen stellen eine spezialisierte Population dar, die Hilfe für Antigen-spezifische B-Zellen liefert und wichtig für die Generation von hochaffinen und spezifischen langlebigen Plasmazellen ist [97]. Unsere Gating-Strategie zur Quantifizierung dieser Population (Abbildung 27A+B) stimmt mit der in einer kürzlich erschienenen Publikation überein [205]. Es ist bekannt, dass diese Zellen während der chronischen Phase der HIV- und SIV-Infektion akkumulieren [108, 109, 206-208]. Bezüglich der HIV-Infektion gab es zudem Hinweise, dass die Dynamik der T_{FH} -Zellen mit der Viruslast im Plasma zusammenhängt [108, 207]. Ein entsprechender Beweis für die SIV-Infektion ist bis jetzt ausgeblieben. In der vorliegenden Studie wurde jedoch eine signifikante positive Korrelation zwischen der Viruslast und den Prozentzahlen der T_{FH} -Zellen im Verlauf der gesamten Infektion festgestellt (Abbildung 36), was von uns auch publiziert wurde [153]. Dieses steht im Gegensatz zu einer SIV-Studie, die keinen Zusammenhang zwischen beiden Parametern feststellen konnte [109]. Diese Gruppe stellte jedoch eine signifikante Korrelation der T_{FH} -Zellen mit SIV-spezifischen Antikörpern dar, welche in der hier vorliegenden Studie anhand der Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen ebenfalls bestätigt werden konnte (Abbildung 52). Die SIV-spezifischen ASC korrelierten jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht mit den T_{FH} -Zellen (Daten nicht gezeigt). Die von uns beobachtete funktionelle Schädigung der T_{FH} -Zellen, ausgedrückt durch einen Verlust der IL-21 Sekretion (Abbildung 33), stimmt mit bereits publizierten Daten überein [209].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Etablierung der LN-FNA eine Möglichkeit der engmaschigen longitudinalen Probenentnahme des lymphoiden Gewebes bei SIV-Studien ermöglicht hat. Es konnten eine Expansion der T_{FH}-Zellen in der chronischen Phase der Infektion (Abbildung 33) und die signifikante positive Korrelation dieser mit der Viruslast und den Gesamt-IgG ASC demonstriert werden sowie eine inverse Korrelation der lymphoiden CD4-Zellen mit der Viruslast (Abbildung 34).

5.4 Die Nef-vermittelte Herabregulierung des TCR-CD3 Komplexes begünstigt möglicherweise die Aufrechterhaltung einer effizienten Virusreplikation von SIV in Rhesusaffen.

Nef übernimmt eine Vielzahl von Aufgaben während der Infektion. Dazu gehört auch die Herabregulierung des mit CD3 komplexierten T-Zell-Rezeptors [77]. Diese Fähigkeit des Nef Proteins unterscheidet HIV-2 sowie die meisten SIV-Stämme von HIV-1 und eng verwandten SIVs (SIVcpz, SIVgsn, SIVmus, SIVmon). Letztere haben diese spezifische Fähigkeit verloren, was in dem Unvermögen resultiert, die T-Zell-Aktivierung zu blockieren und so der erhöhten Immunaktivierung vorzubeugen. Dieser Defekt trägt möglicherweise zur erhöhten Pathogenität von HIV-1 bei [78].

In dieser Doktorarbeit wurde eine Mutante von SIVmac239 untersucht, die drei Punktmutationen (zwei davon mit funktioneller Relevanz) im *nef* Gen aufwies, sodass die Funktion der Herabregulierung von TCR-CD3 spezifisch ausgeschaltet war. Dieses Konstrukt wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Kirchhoff hergestellt. Laut den *in vitro* Daten hatten diese Punktmutationen keinen Einfluss auf weitere Funktionen von Nef, wie z.B. der Modulation der Oberflächenproteine CD4, CD28 und der MHC-Moleküle der Klasse I und der Infektiosität sowie viralen Replikation (noch nicht publizierte Daten, persönliche Kommunikation mit Prof. Frank Kirchhoff). Auf diesem Wege sollte die spezifische Rolle der Nef-vermittelten Herabregulierung des TCR-CD3 Komplexes *in vivo*

untersucht werden und dessen Einfluss auf bestimmte virologische und immunologische Parameter sowie auf die Krankheitsprogression.

Frühe *in vivo* Studien mit *nef*-defekten SIV-Mutanten belegten die wichtige Rolle des Nef Proteins in Hinblick auf die virale Replikation und Immunpathogenese. So ist es für die Aufrechterhaltung von hohen Viruslasten und der Ausbildung der vollen Pathogenität essentiell [68]. Bei HIV-1 Patienten, die nur sehr langsam oder gar nicht AIDS entwickelten (Langzeitüberlebende), ließen sich massive Defekte im *nef* Gen nachweisen [69, 70, 210]. Nichtsdestotrotz ist die Anwesenheit eines intakten *nef* Gens nicht alleinig und ausschließlich für die Ausbildung von AIDS erforderlich. HIV-1 infizierte Langzeitüberlebende, die mit *nef*-defekten Varianten infiziert waren und über eine lange Periode symptomfrei waren entwickelten schließlich trotzdem Symptome einer Immundefizienz [211, 212]. Auch bei SIV-infizierten Rhesusmakaken wurde dieses Phänomen beobachtet [213]. In den folgenden Jahren wurden die multimodalen Funktionen von Nef in einer Vielzahl von Studien mit unterschiedlichen, einzelnen Mutationen im *nef* Gen *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Über die spezifische Funktion der Nef-vermittelten TCR-CD3 Herabregulierung gibt es noch sehr wenige *in vitro* und gar keine *in vivo* Untersuchungen. Eine kürzlich veröffentlichte *in vitro* Studie berichtet, dass die TCR-CD3 Herabregulierung mit einer selektiven Erhaltung von CD4⁺ zentralen Gedächtnis-T-Zellen und Hemmung der T-Zellaktivierung, gemessen anhand der CD69 und CD25 Expression, assoziiert ist und somit in einer Reduktion der Zellschädigung durch die Immunaktivierung resultiert [214]. Es wurde gezeigt, dass die effiziente Herabregulierung des TCR-CD3 Rezeptorkomplexes mit stabilen, hohen CD4-Zellzahlen in natürlich infizierten Rauchmangaben [80] und virämischen HIV-2 infizierten Patienten [215] korreliert. In letzterer Gruppe ist ebenfalls die Korrelation mit einer erniedrigten Immunaktivierung trotz ungehinderter Progression zu AIDS dargestellt [81].

Diese Doktorarbeit befasst sich als erste systematisch mit den Auswirkungen der fehlenden Herabregulierung des TCR-CD3 Komplexes auf die Immunpathogenese in SIV-infizierten RM und imitiert diesbezüglich den Zustand bei HIV-1 und eng verwandten SIVs. Die CD3ko-

Gruppe ähnelte in vielen Aspekten den virologischen und immunologischen Kinetiken der Kontrollgruppe. Es gab jedoch auch signifikante Unterschiede. Die Überlebenszeit war in der CD3ko-Gruppe verlängert (Abbildung 20). Das Tier 2583CD3ko starb zwar an Woche 45 nach Infektion, dieses war jedoch dem unglücklichen Umstand der Lage der tumorösen Umfangsvermehrung geschuldet. Einige Zentimeter versetzt hätte dieser Tumor nicht zu einer Verlegung der Harnwege und somit möglicherweise nicht zu so einem frühen Tod des Tieres geführt. Das *Rhesus Lymphocryptovirus* ist das häufigste isolierte ursächliche Agens bei SIV-assoziierten Lymphomen [216] und war im Tumorgewebe dieses Tieres nachweisbar (persönliche Mitteilung von Dr. Martina Bleyer, Pathologin des DPZ). Die hier vorliegende solitäre Lokalisation ohne generalisierte Hyperplasie oder Depletion der Lymphknoten ist zwar selten, kommt aber vereinzelt vor [216].

Die Kinetik der Virusbeladung über den Verlauf der Infektion war in beiden Gruppen ähnlich und spiegelte den klassischen Verlauf in einer SIV-Infektion wider. Eine wichtige Ausnahme bildete lediglich das Tier 14875CD3ko, das in der chronischen Phase der Infektion die Viruslast erfolgreich und persistent bis unter die Nachweisgrenze kontrollierte (Abbildung 22+23). Dieses Phänomen der Viruslastkontrolle ist bekannt und tritt bei SIV-Langzeitüberlebenden RM schon früh ab der chronischen Phase auf und bleibt dann über einen langen Zeitraum erhalten [217]. Hier wäre es interessant, dieses Tier über Woche 52 nach Infektion hinaus zu beobachten und den Immunstatus und die Pathogenese über einen längeren Zeitraum zu bestimmen. Der MHC-Status dieses Tieres konnte nicht für die effiziente Viruskontrolle verantwortlich gemacht werden, da durch Vorselektion keines der Versuchstiere die MHC-Allele *Mamu-A*01*, *Mamu-B*08* oder *Mamu-B*17* besaß, die mit einer langsameren Krankheitsprogression oder Kontrolle der Viruslast assoziiert sind [218-222].

Die Resultate der Sequenzanalyse der CD3ko-Gruppe (Ergebnisse nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Prof. Frank Kirchhoff) vervollständigen das Bild und erklären teilweise die Beobachtungen. Bei den Tieren 2503 und 2583 revertierten die

Punktmutationen im *nef* Gen bereits in Woche 6 zur Wildtypsequenz, während bei dem Tier 14875 die Mutationen im Gen über den Verlauf der Infektion stabil blieben. Die Viruslast war vor Reversion der Mutationen in allen Tieren in der akuten Phase gleich. Nef scheint demzufolge in der Frühphase entbehrlich zu sein. In der chronischen Phase wurde jedoch deutlich, dass bei nicht vorhandener Reversion der Mutationen und somit nicht vorhandener Herabregulierung (bei dem Tier 14875) die Virusreplikation abgeschwächt war. Dieses lässt den Schluss zu, dass eine effiziente Herabregulierung des TCR-CD3 Komplexes *in vivo* für eine effiziente Virusreplikation vorteilhaft ist und dem Virus einen selektiven Vorteil bietet.

Der zentrale Aspekt des CD4⁺ T-Zell-Verlusts während der akuten Phase der SIV-Infektion war im mukosalen Gewebe des Colon in beiden Gruppen ähnlich (Abbildung 33) und übereinstimmend mit anderen Studien [40-44]; im Blut dagegen gab es in der CD3ko-Gruppe einen milderen Abfall (Abbildung 31). Vor allem war die raschere Wiederherstellung der CD4-Zellen nach dem initialen Abfall bei dem die Viruslast kontrollierenden Tier 14875CD3ko offenkundig. Ebenfalls war in diesem Tier kein Verlust von CD4-Zellen im LN und in der chronischen Phase zusätzlich noch in der BAL zu beobachten (Abbildung 31).

Bei näherer Betrachtung der CD4⁺ Subpopulationen wie den zentralen Gedächtnis-T-Zellen im Blut fiel auf, dass in der Kontrollgruppe im Vergleich zur CD3ko-Gruppe ein stärkerer Verlust dieser Population in der chronischen Phase ab Woche 24 auftrat. Auch hier war der geringste Verlust dieser Population bei dem Tier 14875CD3ko auffällig (Abbildung 39).

Ungewöhnlich sind die Resultate zu den CD4-Zellen und den zentralen Gedächtnis-T-Zellen im Zusammenhang mit der Tatsache, dass die SIV-Mutationen nicht in dem Virus des Tieres 14875CD3ko revertierten und somit keine effiziente Herabregulierung des TCR-CD3 Komplexes stattfand. Folgt man den bereits publizierten Daten, so müsste die fehlende bzw. ineffiziente Herabregulierung zu niedrigen CD4-Zellzahlen führen [80, 215]. Allerdings unterscheiden sich diese beide Studien von der hier präsentierten *in vivo* Pilotstudie. In jenen wurden bereits bestehende Infektionen (SIV der Rauchmangaben und HIV-2) untersucht und Zusammenhänge zwischen individuellen CD4-Zellzahlen und der individuellen Effizienz der Herabregulierung des TCR-CD3 Komplexes dargestellt. In der hier vorliegenden Studie

wurden jedoch Rhesusaffen mit SIV infiziert, in dem bereits Mutationen im *nef* Gen vorhanden waren. Somit waren diese Tiere spezifisch mit einer Variante infiziert, der die Funktion der Herabregulierung des TCR-CD3 Komplexes von vornherein fehlte. Ebenso ist die Rolle der Herabregulierung im Zusammenhang einer pathogenen SIV-Infektion noch nicht untersucht worden. Interessant ist auch die Tatsache, dass nur bei den virämischen HIV-2 Patienten eine signifikante Korrelation des Grades der Herabregulierung mit den CD4-Zellzahlen festgestellt wurde. Bei avirämischen Patienten waren die CD4-Zellen generell erhalten, unabhängig von der Nef Funktion [215]. Dieses könnte auch die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse des Tieres 14875 erklären, das stabile CD4-Zellzahlen trotz der fehlenden Herabregulierung aufweist. Hier könnten zusätzlich zu der Nef Funktion andere Mechanismen eine Rolle bei der Kontrolle der Viruslast und damit verbundener Erhaltung der CD4-Zellen spielen. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, gibt es bei HIV sowie bei SIV bestimmte Individuen, welche die Viruslast über eine lange Zeit kontrollieren und die CD4-Zellzahlen aufrechterhalten. Hier sind die genauen Mechanismen ebenfalls noch nicht abschließend geklärt. Bei diesem Individuum 14875CD3ko könnte also ein multifaktorielles Geschehen zwischen tierindividuellen Faktoren und dem Einfluss durch die Mutationen vorliegen.

Entgegen der Erwartung der höheren Immunaktivierung in der CD3ko-Gruppe durch die fehlende Herabregulierung des TCR-CD3 Komplexes und damit verbundener chronischer Immunaktivierung konnten bezüglich des frühen Aktivierungsmarkers CD69 (Abbildung 38), der Marker HLA-DR (Abbildung 37) und CD80 (Abbildung 43) ähnliche Anstiege in beiden Gruppen beobachtet werden. Deutlich war jedoch, dass die höchsten Werte bezüglich CD69 auf CD4⁺ T-Zellen und CD80 auf CD20⁺ B-Zellen innerhalb der CD3ko-Gruppe bei dem Tier 14875 verzeichnet werden konnten, dem Tier, das als einziges keine Reversion der Mutationen im *nef* Gen aufwies.

Publiziert ist, dass eine erniedrigte Immunaktivierung bei effizienter TCR-CD3 Herabregulierung vorhanden ist und beide Parameter signifikant invers korrelieren [81, 214]. Somit müsste die Kontrollgruppe wegen der effizienten Herabregulierung eine erniedrigte

Immunaktivierung im Vergleich zur CD3ko-Gruppe zeigen; tatsächlich sind aber keine deutlichen Unterschiede sichtbar. Vor allem in der frühen Phase der Infektion, wo bei keinem Tier der CD3ko-Gruppe eine Reversion der Mutationen vorhanden war, wurde ein klarer Unterschied bezüglich der Immunaktivierung zu der Kontrollgruppe erwartet. Interessanterweise zeigt jedoch das Tier 14875CD3ko, dessen Virus die stabilen Mutationen besitzt und somit nie eine Herabregulierung des TCR-CD3 Komplexes aufwies, die höchsten Werte der Immunaktivierung. Zu diskutieren wäre jedoch, warum in der frühen Phase der Infektion (Woche 2) die Werte der anderen beiden Tiere der CD3ko-Gruppe nicht ähnlich ausfielen. Allerdings könnten da schon andere Mechanismen (unabhängig von *Nef*) eine Rolle gespielt haben, die diese beiden Tiere früh von dem die Viruslast kontrollierenden Tier unterschieden haben.

Zu den B-Zellen allgemein, den spezifischen B-Zell-Subpopulationen und den humoralen Immunantworten sind noch keine Untersuchungen bekannt, die sich mit möglichen Unterschieden oder Gemeinsamkeiten zwischen einer SIV-Wildtyp-Infektion und einer mit dieser speziellen SIV-Mutante im akzessorischen Gen *nef* befassen.

Bezüglich der B-Zellen im Blut und KM allgemein konnte in der akuten Phase der Infektion in beiden Gruppen ein ähnlicher Verlust beobachtet werden (Abbildung 41). Die spezialisierten aktivierten Gedächtnis-B-Zellen lieferten sehr interessante Ergebnisse (Abbildung 42). In der Kontrollgruppe gab es in allen drei Tieren einen Abfall in der akuten Phase mit Erholung dieser Population im Tier 14892 in der chronischen Phase. In der CD3ko-Gruppe waren nur in dem 14875 stabile Werte über den Verlauf der Infektion zu beobachten. Die Tiere 2503 und 2583 präsentierten sich mit einem Verlust in der akuten Phase; die Prozentzahlen erholten sich danach jedoch wieder auf Ausgangswerte.

Die humoralen Immunantworten, gemessen an den bindenden Antikörpern gegen p27 und gp130 (Abbildung 44 + 45) und den gp130-spezifischen ASC (Abbildung 47+49), waren in der CD3ko-Gruppe höher als in den Tieren aus der Kontrollgruppe. In dieser ist jedoch der 14892 als Ausnahme zu nennen, da er vergleichbar zur CD3ko-Gruppe war. Dieses Tier war

auch dasjenige, das die stabilen Werte der aktivierten Gedächtnis-B-Zellen in der chronischen Phase der Infektion besaß.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Nef-vermittelte Herabregulierung möglicherweise die Aufrechterhaltung einer effizienten Virusreplikation in der chronischen Phase *in vivo* begünstigt. Dieses wurde an den beiden Tieren gezeigt, dessen Virus ab Woche 6 nach Infektion zum Wildtyp revertiert ist. Insofern lässt dies den Schluss zu, dass die Aufrechterhaltung der Mutationen einen Selektionsnachteil liefert. Das verbliebene Tier, dessen Mutationen im viralen Genom stabil blieben, zeigte einige spezielle Eigenschaften, wie z.B. die Kontrolle der Viruslast in der chronischen Phase, eine geringgradig höhere Immunaktivierung und stabilere CD4-Zellzahlen in verschiedenen Kompartimenten. Das Zusammenspiel dieser Merkmale ist interessant und bedarf weiterer Analysen. Eine anschließende Studie mit einer größeren Anzahl von Tieren wäre wünschenswert.

5.5 Die SIVmac239 *vpr* Deletionsmutante ist in Rhesusaffen attenuiert.

Eine wichtige Funktion von Vpr ist die Arretierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase [63]. Eine damit im Zusammenhang stehende kürzlich veröffentlichte Publikation gab Anlass zu dieser in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie. Es wurde beschrieben, dass die Zellzyklus-Arretierung durch Aktivierung des SLX4-Komplexes durch Vpr geschieht. Dies führt final zu der Inhibition von spontanen oder HIV-1 vermittelten antiviralen IFN-Antworten [64].

In dieser hier vorliegenden Studie sollten die viralen und immunologischen Kinetiken sowie die Krankheitsprogression bei einer Infektion mit einer SIVmac239 *vpr*-Deletionsmutante im Vergleich zu einer Wildtyp-Infektion *in vivo* in Rhesusaffen untersucht werden. Bei Unterschieden könnten Rückschlüsse auf eine frühe Beeinflussung der angeborenen antiviralen Immunantwort gezogen werden. Bei der hier eingesetzten Mutante (hergestellt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Kirchhoff) ist *vpr* komplett deletiert, wie bereits publiziert [140]. Aufgrund der Größe der Deletion ist eine Reversion ausgeschlossen

(persönliche Kommunikation mit Prof. Kirchhoff, Daten nicht gezeigt) und wurde daher nicht speziell mit einer Sequenzanalyse belegt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Infektion in der Δvpr -Gruppe attenuiert ist. Ein Jahr nach Infektion hatte im Gegensatz zu der Kontrollgruppe, bei der bis dahin zwei Tiere früh wegen AIDS-bedingter Symptome eingeschläfert werden mussten, kein Tier AIDS-ähnliche Symptome entwickelte (Abbildung 20). Zudem konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe erst verzögert Virus im Plasma nachgewiesen werden. Resultierend daraus lag eine verzögerte Spitzenvirämie an Woche 3 bis 4 nach Infektion vor, die auch noch ca. 30-fach niedriger lag. Interessant war auch das Tier 14847 Δvpr , das die Viruslast temporär bis unter die Nachweisgrenze kontrollierte (Abbildung 22+23). Ein weiterer Hinweis auf eine Attenuierung war der ausgebliebene Anstieg von Neopterin im Urin (Abbildung 24), der auf eine nicht vorhandene frühe Immunaktivierung hindeutet. Dieses spiegelt sich auch bei der Expression des frühen Immunaktivierungsmarkers CD69 auf CD4⁺ T-Zellen wider, bei der im Gegensatz zur Kontrollgruppe kein früher Anstieg zu verzeichnen war (Abbildung 38). Wichtig ist auch, dass es in der Δvpr -Gruppe zu keinem frühen Abfall der CD4⁺ T-Zellzahlen im Blut kam und diese im Infektionsverlauf stabil blieben (Abbildung 31). Selbst in der Mukosa des Colons war ein im Vergleich zur Kontrollgruppe sehr viel milderer Abfall zu verzeichnen (Abbildung 33). Der initiale Verlust dieser Population in der BAL wurde in der chronischen Phase wieder ausgeglichen. Der Verlust der speziellen T-Zell-Population der zentralen Gedächtnis-CD4⁺ T-Zellen war deutlich milder in der Δvpr -Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe (Abbildung 39). Die Prozentzahlen der CD20⁺ B-Zellen und der aktivierten CD21⁻CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen blieben in der Δvpr -Gruppe im Infektionsverlauf im Gegensatz zu der Kontrollgruppe stabil (Abbildung 41+42). Zudem lag eine deutlich stärkere humorale Immunantwort in der Δvpr -Gruppe vor, gemessen an den bindenden Antikörpern gegen p27 und gp130 sowie den gp130-spezifischen ASC (Abbildung 44+45+47+49).

Die Daten dieser Arbeit stimmen mit bereits publizierten Daten überein, die ebenfalls einen attenuierten Infektionsverlauf bei Einsatz von *vpr*-Mutanten beobachteten [66, 67]. Eine dieser Studie zeigte, dass eine Mutation des *vpr* Startcodons in drei von fünf Tieren vom *vpr*-

zum *vpr+* Genotyp in vier bis acht Wochen nach Infektion revertierte [66]. Der selektive Druck in Richtung Reversion zum Wildtyp ist dementsprechend hoch und weist auf eine wichtige Rolle von *Vpr* für die Virusreplikation hin. Die zwei Tiere, dessen Viren jedoch stabile Mutationen behielten, zeigten Hinweise auf eine attenuierte Infektion mit einer niedrigeren Viruslast und einer transienten Lymphadenopathie. Sie entwickelten keine AIDS-ähnliche Erkrankung über den Zeitraum von einem Jahr und wiesen höhere Antikörpertiter auf. Dieselbe Arbeitsgruppe publizierte zwei Jahre später eine Studie, in der eine SIV *vpr*-Mutante von 43bp untersucht wurde und stellte fest, dass in diesen Tiere eine abgeschwächte Infektion vorlag [67]. Sie entwickelten niedrigere Viruslasten, stärkere humorale Immunantworten und eine langsamere Krankheitsprogression im Vergleich zu Wildtyp-infizierten Affen. Trotzdem erlagen zwei von vier Tieren schließlich AIDS-bedingten Symptomen. Somit verursachte auch eine *vpr* Deletionsmutante AIDS.

Nichtsdestotrotz sind diese Studien 20 Jahre alt und weisen deutliche Limitierungen auf. Die virale RNA-Last wurde noch nicht mithilfe der PCR quantifiziert und eine umfassende polychromatische Durchflusszytometrie konnte ebenfalls nicht durchgeführt werden. Auch ähnlich detaillierte Analysen zu der humoralen Immunantwort und den SIV-spezifischen ASC lagen noch nicht vor. Zudem war eine Reevaluierung der Resultate vor dem Hintergrund neuer Erkenntnisse gerechtfertigt.

Eine weitere Studie aus den Neunzigerjahren befasste sich mit einer kompletten *vpr* Deletionsmutante. Sie zeigte, dass es bezüglich Viruslast, Antikörpertitern, CD4-Zellzahlen und Krankheitsprogression keinen Unterschied zwischen der Infektion mit einer Deletionsmutante und des Wildtyps gab [65]. Hier lagen keinerlei Anzeichen einer abgeschwächten Infektion vor. Jedoch sind diese Ergebnisse nur auf den ersten Blick widersprüchlich zu den anderen Publikationen und den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit. Die Beobachtung, dass die Tiere, die mit der Deletionsmutante infiziert wurden, final AIDS erlagen, wurde ja bereits in den anderen Publikationen bestätigt. Jedoch war in diesen die Krankheitsprogression verlangsamt. In der besagten Studie von Gibbs *et al.* gab es bezüglich des Zeitpunktes jedoch keinen Unterschied zu Wildtyp-infizierten Tieren. Eine

Reversion, welche die Ähnlichkeit zum Wildtyp erklären könnte, wurde in der Publikation ausgeschlossen. Eine mögliche Erklärung könnte die Wahl der verwendeten Tiere und ihr genetischer Hintergrund sein. Analog zu der bereits beschriebenen Assoziation bestimmter MHC-Typen mit einer langsamen Krankheitsprogression ist ebenso publiziert, dass bestimmte MHC-Typen mit einer schnellen oder mittleren Krankheitsprogression assoziiert sind [223, 224]. Wurden in dieser Studie nun Tiere mit einem derartigen genetischen Hintergrund ausgewählt, bei dem es eher zu einem raschen Krankheitsverlauf kam, so würde dieses die Attenuierung möglicherweise kompensieren und könnte die Beobachtungen zum Teil erklären. Bis zu Woche 52 nach Infektion erlag keines unserer Tiere AIDS. Jedoch könnte sich dies bei einer längeren Überwachung der Tiere noch ändern. Trotzdem würde es dann bei dem Ergebnis bleiben, dass die Krankheitsprogression in der *Δvpr*-Gruppe verlangsamt ist. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Viruslast in der chronischen Phase. Hier gab es keinen Unterschied zwischen der *Δvpr*-Gruppe und der Kontrollgruppe. Lediglich die niedrigere Spitzenvirämie und das verzögerte Auftreten von viralen Kopien im Plasma in der *Δvpr*-Gruppe stimmen nicht mit der besagten Publikation überein. Allerdings gilt auch hier, dass diese Studie 20 Jahre alt ist und die Viruslast noch nicht mit der sensitiven Methode der PCR gemessen wurde.

Wie bereits erwähnt, wurde diese Studie u.a. aufgrund kürzlich publizierter Ergebnisse durchgeführt [64]. Vpr aktiviert eine mit dem SLX4-Komplex assoziierte Endonuklease, die überschüssige DNA prozessiert. Somit wird (durch das Entfernen dieser DNA) das Aufspüren durch die angeborene antivirale Immunantwort mittels IFN verhindert.

Interferone agieren als antivirale Zytokine, die früh aktiviert werden und den Ausgang einer Infektion entscheidend beeinflussen [225]. Interferon-regulierende Faktoren (IRF), wie z.B. IRF-3 spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion von IFN [226]. Dieses ist ein kritischer Schritt in der Initiierung der frühen zellulären antiviralen Immunantwort. Die Tatsache, dass Vpr IFN-Antworten moduliert, ist bereits seit einiger Zeit bekannt. Eine Studie von 2008 belegt, dass Vpr von HIV-1 die initiale frühe antivirale Immunantwort stört, indem es IRF-3 degradiert [227]. Mutationen im *vpr* Gen führten zu einer erniedrigten Kapazität, IRF-3 zu

degradieren. Diese Ergebnisse wurden in einer weiteren Publikation bestätigt, in der ebenfalls gezeigt wurde, dass *Vpr* zu einer geringgradigen Attenuierung der Virus-induzierten IFN- β Promotor-Expression führte [228]. Diese *in vitro* Ergebnisse liefern eine gute Erklärung für die Beobachtungen in der hier vorliegenden *in vivo* Studie. Somit führt die Infektion mit einem *vpr*-defekten Virus im *in vivo* Krankheitsmodell zu einer mäßig attenuierten Infektion. Das verzögerte Auftreten von viralen Kopien im Plasma und die erniedrigte Spitzenvirämie im Vergleich zur Kontrollgruppe weisen auf eine mögliche Beeinträchtigung der Etablierung der viralen Infektion hin. Dieses könnte durch das Fehlen von *vpr* bedingt sein, was eine ungestörte IFN-Antwort zur Folge hatte. Somit konnte das Virus früh angegriffen werden und die Infektion konnte sich nur mit Verzögerungen etablieren. Dieses drückte sich dann anschließend in einer Erhaltung von CD4-Zellen im Blut und verschiedenen Geweben sowie von B-Zellen im Allgemeinen und den aktivierten Gedächtnis-B-Zellen im Besonderen aus. Auch die niedrige Immunaktivierung, gemessen an Neopterin im Urin sowie an der CD69 Expression auf CD4⁺ T-Zellen spricht für eine attenuierte Infektion. Diese Hypothese sollte sich durch eine umfassende Analyse der Zytokinprofile unterstützen lassen. Dazu wurden in der frühen Phase der Infektion ab Tag 5 Proben asserviert, die noch untersucht werden müssen. Danach wird sich erst bestätigen lassen, ob die *vpr*- Deletionsmutante auch *in vivo* zu einer erhöhten IFN-Antwort und somit erfolgreicherer angeborener Immunantwort führt. Eine stabile Typ I IFN-Antwort ist in der Frühphase der HIV-/SIV-Infektion vorteilhaft, jedoch bei einer chronischen Persistenz nachteilig für das Immunsystem. Natürliche SIV-Infektionen unterschieden sich von den pathogenen dadurch, dass natürlich infizierte Wirte die IFN-Antwort in der frühen chronischen Phase herabregulieren [229]. Auch in einer kürzlich erschienenen Publikation wird die zeitabhängige Dichotomie der IFN-Antwort deutlich gemacht. So verhindert eine initiale IFN-Gabe in der frühen Phase eine systemische Infektion, bei längerer Applikation kommt es dagegen zu einer Desensibilisierung mit geringerer antiviraler Genexpression, Etablierung der Infektion und progressivem CD4-Verlust [230].

Zusammenfassend zeigte diese Doktorarbeit, dass die Infektion mit einer *vpr* Deletionsmutante *in vivo* zu einer mäßig attenuierten Infektion mit einem verzögerten Einsetzen der Infektion, einer reduzierten Spitzenvirämie, einer geringeren Immunaktivierung, einem verlängertem Überleben, einer besseren Erhaltung von CD4⁺ T-Zellen sowie aktivierten Gedächtnis-B-Zellen und einer stärkeren humoralen Immunantwort führt. Der Grund hierfür könnte einer wirksamen angeborenen IFN-Immunantwort in der akuten Infektionsphase angerechnet werden, da *Vpr* nicht störend eingreifen kann.

6. Zusammenfassung

Trotz intensiver jahrzehntelanger Forschung im Bereich von HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) ist es noch nicht gelungen, einen effektiven Impfstoff zu entwickeln. Insofern ist weitere Forschung, v.a. im Bereich der B-Zellen von großer Wichtigkeit. Die SIV (Affen-Immundefizienz-Virus)-Infektion der Rhesusmakaken (RM) stellt dabei das wichtigste Modell zur Erforschung der HIV-Infektion des Menschen dar.

Ein erstes Ziel dieser Doktorarbeit war die Analyse der Verteilung und Anzahl verschiedener B-Zell-Populationen wie naiver B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen sowie Plasmazellen in peripherem Blut sowie verschiedenen Organen in SIV-infizierten RM. Zusätzlich sollte eine funktionelle Charakterisierung von Antikörper-sezernierenden Zellen erfolgen. Das ursprünglich dafür gedachte Material wurde schon vor Beginn der Doktorarbeit kryokonserviert. Schon bald jedoch wurde deutlich, dass sich kryokonservierte Proben in der durchflusszytometrischen und funktionellen Analyse von frischen Proben unterschieden. Daraufhin wurde eine systematische Vergleichsstudie an SIV-negativen RM angeschlossen, um mögliche Effekte der Kryokonservierung auf B- und Plasmazellen zu evaluieren. Studien hierzu gab es bislang noch nicht. Ein Ergebnis war, dass sich die prozentualen Anteile der CD20⁺ B-Zellen in PBMCs (mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut) nicht von denen in den dazugehörigen frischen PBMCs unterschieden. Das galt jedoch nicht für Knochenmark, Milz, Lymphknoten (LN) und Dünn- und Dickdarm, bei denen prozentual höhere Anteile dieser Population in den kryokonservierten Proben beobachtet werden konnten. Die massivste Veränderung betraf jedoch die Expression des Oberflächenantigens CD27 auf Gedächtnis-B-Zellen. In tiefgefrorenem Material von PBMCs und allen Organen gab es einen signifikanten Verlust der Expression dieses Markers, was möglicherweise entweder auf eine proteolytische Abspaltung, eine Herabregulierung oder ein selektives Absterben dieser Zellpopulationen zurückzuführen ist. Zusätzlich wurde in dieser Vergleichsstudie ein Verlust von Plasmazellen/Plasmablasten in kryokonserviertem Material beobachtet, der sich auch funktionell in einem Verlust von Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen widerspiegelte.

Im Vorfeld musste jedoch eine adäquate Charakterisierung von Plasmazellen im RM gefunden werden. In dieser Doktorarbeit wurde CD138 –analog zum humanen System- als geeigneter Marker für Plasmablasten/Plasmazellen in RM etabliert. Der Plasmazellstatus wurde über eine Aufreinigung von CD138⁺ Zellen mit anschließendem Einsatz im B-Zell-ELISpot zur Quantifizierung von spontan Antikörper-sezernierenden Zellen erbracht.

Bezugnehmend auf die eingeschränkte Nutzbarkeit des kryokonservierten Materials wurde eine SIV-Studie longitudinal in Hinblick auf die Verteilung und Anzahl von verschiedenen B- und T-Zellpopulationen, die humorale Immunantwort, virale Kinetik und Krankheitsprogression untersucht. Dabei lag das Augenmerk auf zwei Gruppen von Tieren, die mit *in vitro* hergestellten Mutanten in akzessorischen Genen von SIV infiziert wurden, um die Rolle dieser während einer *in vivo* SIV-Infektion zu untersuchen. Beide Mutanten wurden mit einer Wildtyp-infizierten Kontrollgruppe verglichen. Eine Gruppe von Tieren erhielt eine *vpr*-Deletionsmutante und die andere eine *nef*-Mutante, bei der spezifisch die Funktion der TCR (T-Zell-Rezeptor) -CD3-Herabregulierung ausgeschaltet war.

Aktuelle Forschungsarbeiten weisen auf die essentielle Rolle der akzessorischen Gene bei der Pathogenese der HIV-/SIV-Infektion hin. Bislang gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Bedeutung spezieller Funktionen der akzessorischen Gene *in vivo* beschäftigen.

Die Ergebnisse der Δvpr -Gruppe deuten auf eine *in vivo* mäßig attenuierte Infektion hin. Das verzögerte Einsetzen der Virämie, die reduzierte Spitzenvirämie und das verlängerte Überleben sprachen hierfür. Zudem lagen eine geringere Immunaktivierung, eine stärkere humorale Immunantwort und stabile Prozentzahlen von CD4⁺ T-Zellen, zentralen Gedächtnis-T-Zellen sowie aktivierten Gedächtnis-B-Zellen vor. Eine mögliche Erklärung ist die ungehinderte angeborene Immunantwort in der akuten Phase der Infektion durch das Fehlen von Vpr mit daraus resultierender wirksamer früher Interferon-Antwort.

Die Ergebnisse der Sequenzanalysen für die *nef*-Gruppe belegen, dass das Virus von zwei Tieren in der frühen chronischen Phase ab Woche 6 nach Infektion zum Wildtyp revertierte. Diese Tiere wiesen hohe Viruslasten auf. Das Virus eines Tieres jedoch behielt die Mutationen und kontrollierte die Virusvermehrung effektiv. Ebenso wies dieses Tier eine

geringgradig höhere Immunaktivierung und eine bessere Erhaltung von CD4⁺ T-Zellen im Blut und verschiedenen Geweben sowie aktivierten Gedächtnis-B-Zellen im Blut auf.

Dies zusammen ließ den Schluss zu, dass eine Nef-vermittelte Herabregulierung des TCR-CD3 Komplexes möglicherweise die Aufrechterhaltung einer effizienten Virusreplikation in der chronischen Phase begünstigt.

Zudem wurde die LN-Feinnadelaspiration als Methode etabliert, die es erlaubt, das lymphoide Gewebe während einer SIV-Infektion engmaschig longitudinal zu untersuchen. So wurde in dieser Dissertation festgestellt, dass folliculäre T-Helferzellen im LN im Infektionsverlauf expandieren und positiv mit der Viruslast korrelieren.

7. Summary

Despite the decades-long intensive research in the field of HIV (human immunodeficiency virus) an effective vaccine is yet to be developed. Therefore, further research in especially the field of B cells is of utmost importance. The SIV (simian immunodeficiency virus) infection of rhesus macaques (RM) represents the most important model for the HIV infection of humans.

The first objective of this thesis was the analysis of the distribution and frequencies of various B cell populations such as naive and memory B cells as well as plasma cells in peripheral blood and different tissue of SIV-infected RM. Additionally, a functional characterization of antibody secreting cells should be performed. The required material had been cryopreserved before this thesis started. Soon upon analysis, it became obvious that cryopreserved material differs from fresh material with regard to polychromatic flow cytometric and functional analyses. Thereupon, a systematic comparative study on SIV-negative RM was conducted to investigate possible effects of cryopreservation on B and plasma cells. To date, studies for this are missing.

A finding was that the percentages of CD20⁺ B cells in PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) were similar compared to respective fresh PBMCs. This was not the case for bone marrow, spleen, lymph node (LN) and small as well as large intestine, in which proportions of B cells were higher in cryopreserved samples compared to those in fresh ones. The most severe changes concerned the expression of the surface antigen CD27 on memory B cells. There was a significant loss of the CD27 expression on B cells in cryopreserved PBMCs and all organs. Possible reasons are a proteolytic cleavage, downregulation or a selective loss of cell populations carrying CD27. Additionally, a loss of plasma cells/plasmablasts was observed in cryopreserved samples, which was reflected in a loss of total IgG secreting cells.

However, an appropriate phenotypical characterization of plasma cells in RM had to be evaluated previously. In this thesis CD138 –analog to the human system- was established as a suitable marker for plasma cells in RM. The plasma cell status was verified by purification

of CD138⁺ cells with subsequent use in B-cell-ELISpot for the quantification of spontaneously antibody secreting cells.

Because of the limited use of cryopreserved material, a longitudinal follow-up of a SIV study was conducted. The distribution and percentages of different B and T cell populations as well as humoral immune responses, viral kinetics and disease progression were analyzed.

Two groups of RM were infected with two different SIV constructs containing mutations in accessory genes to evaluate their role *in vivo*. Current publications indicate their important role during the HIV/SIV infection. To date, only a few studies concerning the role of specific functions of the accessory genes *in vivo* exist.

One group received a *vpr* deletion mutant and the other a *nef* mutant with introduced point mutations where the function to down-modulate the TCR (T cell receptor) -CD3 complex is specifically turned off. Both groups were compared to one infected with wild type SIV.

The results of the Δvpr group indicated a moderate attenuation of the course of infection. This was proven by a delayed onset of viremia, reduced peak viremia and prolonged survival. Additionally, these animals showed lower levels of immune activation, stronger humoral immune responses as well as a preservation of CD4⁺ T cells, central memory T cells and activated memory B cells. A possible explanation is the unhampered innate immune response due to the lack of Vpr in the acute phase of infection resulting in efficient early interferon response.

The results of the sequence analyses of the *nef*-group showed that the virus of two animals reverted to wildtype in the early chronic phase of infection at week 6. These animals maintained high viral loads. In the remaining animal, the viral mutations were stable with no reversion throughout the infection. This particular animal also controlled the viral load, showed a slightly higher level of immune activation with better maintenance of CD4⁺ T cells as well as activated memory B cells. To summarize, a *nef*-mediated down-modulation of the TCR-CD3 complex may favor the maintenance of efficient virus replication in the chronic phase of infection.

Additionally, the LN fine-needle aspiration was implemented as a method to analyze lymphoid tissue longitudinally during a SIV infection. The findings of this thesis indicate that percentages of follicular T helper cells increase in the course of infection and correlate with the plasma viral load.

8. Abkürzungsverzeichnis

AICD	<i>activation induced cell death</i>
°C	Celsius
AF	Alexa Fluor
AGM	Afrikanische Grüne Meerkatzen
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> , Erworbenes Immunschwächesyndrom
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APCs	<i>antigen presenting cells</i> , Antigen-präsentierende Zellen
APOBEC3G	apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
ASC	<i>antibody secreting cells</i> , Antikörper-sezernierende Zellen
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BC	Beckmann Coulter
BCIP/NBT	Bromchlorindolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
BCR	B-Zell-Rezeptor, <i>B cell receptor</i>
BD	Becton Dickinson
BL	BioLegend
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
BV	Brilliant Violet
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cART	<i>combined antiretroviral therapy</i> , kombinierte antiretrovirale Therapie
CB	Colonbiopsien
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungsgruppen
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
Dr.	Doktor
DTT	Dithiothreitol
ECD	<i>Energy Coupled Dye</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISpot	<i>enzyme-linked immunospot assay</i>
engl.	englisch
Env, env	Hüllprotein, <i>envelope</i>
ESP	<i>enzyme-linked immunospot assay</i>
et al.	<i>et alii</i>
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreuung
G	Gauge
g	gramm
Gag, gag	Gruppen-spezifisches Antigen
GC	<i>germinal center</i> , Keimzentrum
GMII	Göttinger Mischung II
gp	Glykoprotein
h	<i>hour</i> , Stunde
H₂O	Wasser
H₂SO₄	Schwefelsäure
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HTLV	Humanes T-Lymphotropes Virus
ICTV	<i>International Committee on the Taxonomy of Viruses</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	<i>interferon regulatory factors</i> , Interferon-regulierende Faktoren

kDA	kiloDalton
kg	kilogramm
KGW	Körpergewicht
KM	Knochenmark
ko	<i>knockout</i>
L	Ligand
LAV	Lymphadenopathie-assoziiertes AIDS Virus
LN	Lymphknoten
LN ex	Lymphknoten-Exstirpation
LN-FNA	Lymphknoten-Feinnadelaspiration
LPS	Lipopolysaccharide
LTNPs	<i>longterm-nonprogressor</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
MACS	<i>magnetic cell sorting</i> , magnetische Zellsortierung
mAk	monoklonaler Antikörper
mg	miligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	milliliter
MNC	<i>mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen
mol	<i>mole</i>
mRNA	messenger RNA
n	Probengröße
Na₂CO₃	Natriumcarbonat
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN₃	Natriumacid
Nef, nef	<i>HIV-1 negative factor</i>
ng	nanogramm
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
nm	nanometer
OD	optische Dichte
p	Signifikanzniveau
P	Protein
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin7
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cyanin5.5
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
pi	<i>post infection</i> , nach Infektion
PIC	<i>preintegration complex</i> , Präintegrationskomplex
PKC	Proteinkinase C
PO	<i>Pacific Orange</i>
POD	Peroxidase
Pol, pol	<i>polymerase</i>
PWM	<i>pokeweed mitogen</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
R848	Resiquimod
Rev, rev	<i>regulator of expression of viral proteins</i>
rh	rekombinant human
RM	Rhesusmakaken
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i> , Rotationen pro Minute
RPMI kompl.	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> komplett
r_s	Searman-Rang-Korrelationskoeffizient
RT	Reverse Transkriptase
RTemp	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler um den Mittelwert
SIV	Affen Immundefizienz-Virus
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
STLV	Affen-T-Lymphotropes Virus
Tat, tat	<i>transactivator of transcription</i>
TCID	<i>tissue culture infectious dose</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
T_{FH}	follikuläre T-Helferzellen
Th	T-Helferzellen
TLR	<i>toll-like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin

TNF	Tumor Nekrose Faktor
u.a.	unter anderem
UNAIDS	<i>United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
v.a.	vor allem
vif	<i>virion infectivity factor</i>
VL	Viruslast
Vpu/Vpx/Vpr, vpu/vpx/vpr	<i>viral protein u/x/r</i>
wpi	<i>weeks post infection</i> , Wochen nach Infektion
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
µl	mikroliter
µm	mikrometer
µmol	mikromol

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen HIV-1, SIVcpz und SIVgor.	15
Abbildung 2: Veränderungen der Viruslast im Plasma, der CD4 ⁺ T-Zellen im Blut und in mukosalen Geweben und des Grades der Immunaktivierung im Verlauf der HIV-Infektion.	18
Abbildung 3: Virale Kinetik von SIV und HIV im Vergleich.	21
Abbildung 4: Morphologie von HIV.	22
Abbildung 5: Genomische Organisation von verschiedenen HIV- und SIV-Stämmen.	23
Abbildung 6: Funktionen von Vpr im viralen Lebenszyklus.	25
Abbildung 7: Replikationszyklus von HIV.	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls.	34
Abbildung 9: Fotos der Beckenkammfunktion.	47
Abbildung 10: Schematische Darstellung des B-Zell-ELISpots.	59
Abbildung 11: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation.	60
Abbildung 12: Gating-Strategie der B-Zellen in den einzelnen Organen in exemplarischen kryokonservierten Proben.	72
Abbildung 13: Exemplarische Dot Plots zur Unterteilung der CD20 ⁺ Subpopulationen.	73
Abbildung 14: Gating-Strategie der Plasmazellen in den einzelnen Organen in exemplarischen kryokonservierten Proben.	76
Abbildung 15: Exemplarische Dot Plots der CD19 ⁺ CD20 ⁻ und CD38 ⁺ CD138 ⁺ Zellpopulation zwischen frischem und kryokonserviertem KM.	77
Abbildung 16: Ergebnisse des Vergleichs der quantitativen Bestimmung von Gesamt-IgG- und Gesamt-IgA-ASC zwischen frischen und tiefgefrorenen PBMCs mit und ohne Ruhephase.	81
Abbildung 17: Exemplarische Dot Plots von PBMCs vor und nach der magnetischen Separation der CD138 ⁺ Zellen.	82
Abbildung 18: Prozentualer Anteil von CD138 ⁺ Zellen in Proben vor und nach der magnetischen Aufreinigung (n=8).	83
Abbildung 19: Anzahl der Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen in den Fraktionen vor und nach der magnetischen Separation der CD138 ⁺ Plasmazellen (n=8).	84

Abbildung 20: Überlebende Tiere.	86
Abbildung 21: Fotos des Lymphoms.	87
Abbildung 22: RNA-Viruslast im Plasma im Infektionsverlauf.	88
Abbildung 23: Vergleich der Spitzenvirämie zwischen den Gruppen.	88
Abbildung 24: Neopterinpiegel im Urin.	90
Abbildung 25: Korrelation der Neopterinwerte mit der Spitzenvirämie.	90
Abbildung 26: Gating-Strategie der T-Zellen in einer exemplarischen Vollblutprobe.	91
Abbildung 27: Gating-Strategie der T _{FH} -Zellen in einem exemplarischen LN-Feinnadelaspirat.	93
Abbildung 28: Vergleich von T-Zell-Populationen in LN-Feinnadelaspiraten und Zellsuspensionen aus LN-Exstirpaten.	94
Abbildung 29: Korrelation der CD4 ⁺ T-Zellen.	95
Abbildung 30: Absolute Zellzahlen in LN-Feinnadelaspiraten.	96
Abbildung 31: Prozentzahlen von CD4 ⁺ T-Zellen in den verschiedenen Organen im Infektionsverlauf.	98
Abbildung 32: Absolute CD8-Zellzahlen im Knochenmark im Infektionsverlauf.	99
Abbildung 33: Prozentzahlen von CD4 ⁺ T-Zellen in Colon im Infektionsverlauf.	100
Abbildung 34: Korrelation der CD4 ⁺ T-Zellen in den verschiedenen Organen mit der Viruslast im Plasma.	101
Abbildung 35: Prozentzahlen von T _{FH} -Zellen und IL-21 ⁺ T _{FH} -Zellen im LK im Infektionsverlauf.	102
Abbildung 36: Korrelation der T _{FH} -Zellen mit der Viruslast im Plasma.	103
Abbildung 37: Immunaktivierung der CD4 ⁺ T-Zellen anhand der HLA-DR Expression im Infektionsverlauf.	105
Abbildung 38: Die Immunaktivierung der CD4 ⁺ T-Zellen anhand der CD69 Expression im Infektionsverlauf.	106
Abbildung 39: Prozentzahlen von zentralen und Effektor-Gedächtnis-CD4 ⁺ T-Zellen im Infektionsverlauf.	107
Abbildung 40: Gating-Strategie der B-Zellen in einer exemplarischen Vollblutprobe.	108
Abbildung 41: Prozentzahlen von CD20 ⁺ B-Zellen im	110

Infektionsverlauf.

Abbildung 42: Prozentzahlen von aktivierten Gedächtnis-B-Zellen im Vollblut im Infektionsverlauf.	111
Abbildung 43: Prozentzahlen von CD80 ⁺ B-Zellen im Infektionsverlauf.	112
Abbildung 44: OD der bindenden Antikörper gegen p27 im Plasma im Infektionsverlauf.	114
Abbildung 45: OD der bindenden Antikörper gegen gp130 im Plasma im Infektionsverlauf.	115
Abbildung 46: Anzahl der Gesamt-IgG-sezernierenden Zellen im Infektionsverlauf.	116
Abbildung 47: Prozentzahlen der gp130-ASC im Infektionsverlauf.	117
Abbildung 48: Prozentzahlen der gp130-ASC im Vergleich bei verschiedenen Stimulationsprotokollen (n=5).	118
Abbildung 49: Prozentzahlen der gp130-ASC im Infektionsverlauf.	119
Abbildung 50: Korrelation der aktivierten Gedächtnis-B-Zellen mit den bindenden Antikörpern gegen p27 und gp130 und den gp130-ASC.	120
Abbildung 51: Korrelation der Plasmazellen im Blut und KM mit den gp130-ASC an Woche 52 nach Infektion.	120
Abbildung 52: Korrelation der T _{FH} -Zellen und den Gesamt-IgG-ASC.	121
Abbildung 53: Korrelation der gp130-ASC mit den bindenden Antikörpern gegen gp130.	121
Tabelle 1: Tabellarische Auflistung der verwendeten Medien und Lösungen.	40
Tabelle 2: Analysierte SIV-infizierte Tiere.	43
Tabelle 3: Analysierte SIV-negative Tiere.	44
Tabelle 4: Reaktionsansatz der qRT-PCR.	55
Tabelle 5: Ablauf und Bedingungen der PCR im Rotor-Gene Q zur Quantifizierung der viralen Kopien.	55
Tabelle 6: Tabellarische Auflistung der verwendeten Antikörper für die B-Zellen.	64
Tabelle 7: Tabellarische Auflistung der verwendeten Antikörper für die T-Zellen.	65
Tabelle 8: Tabellarische Auflistung der verwendeten Antikörper für	66

die Plasmazellen.

Tabelle 9: Tabellarische Auflistung der Prozentzahlen der **78**
verschiedenen B-Zellpopulationen und Plasmazellen im Vergleich
zwischen frischen und tiefgefrorenen Proben.

Tabelle 10: Tabellarische Auflistung der Probennahme im **85**
Infektionsverlauf.

Tabelle 11: Prozentzahlen von T- und B-Zell-Populationen in **95**
Zellsuspensionen von Lymphknotenexstirpaten und
Feinnadelaspiraten.

10. Literaturverzeichnis

1. UNAIDS, *UNAIDS report on the global AIDS epidemic*. 2013.
2. Phillips, K.A., Bales, K.L., Capitanio, J.P., Conley, A., Czoty, P.W., 't Hart, B.A., Hopkins, W.D., Hu, S.-L., Miller, L.A., Nader, M.A., Nathanielsz, P.W., Rogers, J., Shively, C.A., and Voytko, M.L., *Why primate models matter*. *Am J Primatol*, 2014. **76**: p. 801-827.
3. Moir, S., and Fauci, A.S., *B cells in HIV infection and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**: p. 235-245.
4. Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A., *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men - evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. *N Engl J Med*, 1981. **305**: p. 1425-1431.
5. Masur, H., Michelis, M.A., Greene, J.B., Onorato, I., Vande Stouwe, R.A., Holzmann, R.S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H.W., and Cunningham-Rundles, S., *An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia - initial manifestation of cellular immune dysfunction*. *N Engl J Med*, 1981. **305**: p. 1431-1438.
6. Siegal, F.P., Lopez, C., Hammer, G.S., Brown, A.E., Kornfeld, S.J., Gold, J., Hassett, J., Hirschman, S.Z., Cunningham-Rundles, C., Adelsberg, B.R., Parham, D.M., Siegal, M., Cunningham-Rundles, S., and Armstrong, D., *Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative Herpes Simplex lesions*. *N Engl J Med*, 1981. **305**: p. 1439-1444.
7. CDC, in *Morbidity and mortality weekly reports*. 1981.
8. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. *Science*, 1983. **220**: p. 868-871.
9. Gallo, R.C., Salahuddin, Z., Popovic, M., Shearer, GM., Kaplan, M., Haynes, B., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., and Marham,

- P.D., *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. Science, 1984. **224**: p. 500-503.
10. Popovic M, S.M., Read E, and Gallo RC, *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and Pre-AIDS*. Science, 1984. **224**: p. 497-500.
 11. Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., and Weiss, R., *Human immunodeficiency viruses*. Science, 1986. **232**: p. 697.
 12. Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J.L., and Montagnier, L., *Isolation of a new human retrovirus from west african patients with AIDS*. Science, 1986. **233**: p. 343-346.
 13. De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P., Willems, B., Taelman, H., Van der Groen, G., Piot, P., Tersmette, T., Huisman, J.G., and Van Heuverswyn, H., *Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin*. J Virol, 1990. **64**: p. 1207-1216.
 14. Gürtler, L.G., Hauser, P.H., Eberle, J., Von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J.M., and Kaptue, L., *A new subtype o human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from cameroon*. J Virol, 1994. **68**: p. 1581-1585.
 15. Simon, F., Mauclore, P., Roques, P., LouSSERT-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barré-Sinoussi, F., and Brun-Vézinet, F., *Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O*. Nat Med, 1998. **4**: p. 1032-1037.
 16. Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D.L., and Simon, F., *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. Nat Med, 2009. **15**: p. 871-872.
 17. Robertson, D.L., Anderson, J.P., Bradac, J.A., Carr, J.K., Foley, B., Funkhouser, R.K., Gao, F., Hahn, B.H., Kalish, M.L., Kuiken, C., Learn, G.H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P.M.,

- Wolinsky, S., and Korber, B., *HIV-1 nomenclature proposal*. Science, 2000. **288**: p. 55-56.
18. Mourez, T., Simon, F., and Plantier, J.C., *Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**: p. 448-461.
19. Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R., *An african primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2*. Nature, 1989. **339**: p. 389-392.
20. Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cumminsk, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M., and Hahn, B.H., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. **397**: p. 436-441.
21. Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L., and Alizon, M., *Genome organisation and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2*. Nature, 1987. **326**: p. 662-669.
22. Whittle, H., Morris, J., Todd, J., Corrah, T., Sabally, S., Bangali, J., Ngom, P.T., Rolfe, M., and Wilkins, A., *HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1 -infected patients*. AIDS, 1994. **8**: p. 1617-1620.
23. Ancelle, R., Blety, O., Baglin, A.C., Brun-Vezinet, F., Rey, M.-A., and Godeau, P., *Long incubation period for HIV-2 infection*. Lancet, 1987. **329**: p. 688-689.
24. Simon, F., Matheron, S., Tamalet, C., Loussert-Ajaka, I., Bartczak, S., Pépin, J.M., Dhiver, C., Gamba, E., Elbim, C., Gastaut, I.A., Saimot, A.G., and Brun-Vézinet, F., *Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2*. AIDS, 1993. **7**: p. 1411-1417.
25. Gottlieb, G.S., Hawes, S.E., Agne, H.D., Stern, J.E., Critchlow, C.W., Kiviat, N.B., and Sow, P.S., *Lower levels of HIV RNA in semen in HIV-2 compared with HIV-1 infection: implications for differences in transmission*. AIDS, 2006. **20**: p. 895-900.
26. Donnelly, C., Leisenring, W., Kanki, P., Awerbuci, T., and Sandberg, S., *Comparison of transmission rates of HIV-1 and HIV-2 in a cohort of prostitutes in Senegal*. Bull Math Biol, 1993. **55**: p. 731-743.

27. Popper, S.J., Sarr, A.D., Guèye-Ndiaye, A., Mboup, A., Essex, M.E., and Kanki, P.J., *Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo*. J Virol, 2000. **74**: p. 1554-1557.
28. De Silva, T.I., Cotten M., and Rowland-Jones, S.L., *HIV-2: the forgotten AIDS virus*. Trend Microbiol, 2008. **16**: p. 588-595.
29. Jaffe, H.W., Bregman, D.J., and Selik, R.M., *Acquired immune deficiency syndrome in the United States: The first 1,000 cases*. J Infect Dis, 1983. **148**: p. 339-345.
30. Harris, C., Butkus Small, C., Klein, R.S., Friedland, G.H., Moll, B., Emeson, E.E., Spigland, I., and Steigbigel, N.H., *Immunodeficiency in female sexual partners of men with the acquired immunodeficiency syndrome*. N Engl J Med, 1983. **308**: p. 1181-1184.
31. Padian, N., Marquis, L., Francis, D.P., Anderson, R.E., Rutherford, G.W., O'Malley, P.M., and Winkelstein, W., *Male-to-female transmission of human immunodeficiency virus*. JAMA, 1987.
32. Curran, J.W., Lawrence, N.D., Jaffe, H., Kaplan, J.E., Zyla, L.D., Chamberland, M., Weinstein, R., Lui, K.-J., Schonberger, L.B., Spira, T.J., Alexander, W.J., Swinger, G., Ammann, A., Solomon, S., Auerbach, D., Mildvan, D., Stoneburner, R., Jason, J.M., Haverkos, H.W., and Evatt, B.L., *Acquired immunodeficiency syndrome associated with transfusions*. N Engl J Med, 1984. **310**: p. 69-75.
33. Des Jarlais, D.C., Friedman, S.R., and Hopkins, W., *Risk reduction for the acquired immunodeficiency syndrome among intravenous drug users*. Ann Intern Med, 1985. **103**: p. 755-759.
34. Cowan, M.J., Hellmann, D., Chudwin, D., Wara, D.W., Chang, R.S., and Amman, A.J., *Maternal transmission of acquired immune deficiency syndrome*. Pediatrics, 1984. **73**: p. 382-386.
35. Ziegler, J.B., Cooper, D.A., Johnson, R.O., and Gold, J., *Postnatal transmission of AIDS-associated retrovirus from mother to infant*. Lancet, 1985. **8434**: p. 896-898.

36. Dunn, D.T., Newell, M.L., Aedes, A.E., and Peckham, C.S., *Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breastfeeding*. Lancet, 1992. **340**: p. 585-588.
37. Friedland, G.H., Saltzman, B.R., Rogers, M.F., Kahl, P.A., Lesser, M.L., Mayers, M.M., and Klein, R.S., *Lack of transmission of HTLV-III/LAV infection to household contacts of patients with AIDS or AIDS-related complex with oral candidiasis*. N Engl J Med, 1986. **314**: p. 344-349.
38. Pantaleo, G., and Fauci, A.S., *Immunopathogenesis of HIV infection*. Annu Rev Microbiol, 1996. **50**: p. 825-854.
39. Cooper, D.A., Gold, J., Maclean, P., Donovan, B., Finlayson, R., Barnes, T.G., Michelmore, H.M., Brooke, P., and Penny, R., *Acute retrovirus infection - definition of a clinical illness associated with seroconversion*. Lancet, 1985. **8428**: p. 537-540.
40. Veazey RS, D.M., Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, Rosenzweig M, Johnson RP, Desrosiers RC, and Lackner AA, *Gastrointestinal tract as a major site of CD4⁺ T cell depletion and viral replication in SIV infection*. Science, 1998. **280**: p. 427-431.
41. Kewenig, S., Schneider, T., Hohloch, K., Lampe-Dreyer, K., Ullrich, R., Stolte, N., Stahl-Hennig, C., Kaup, F.J., Stallmach, A., and Zeitz, M., *Rapid mucosal CD4⁺ T-cell depletion and enteropathy in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques*. Gastroenterology, 1999. **116**: p. 1115-1123.
42. Lim, S.G., Condez, A., Lee, C.A., Johnson, M.A., Elia, C., and Puolter L.W., *Loss of mucosal CD4 lymphocytes is an early feature of HIV infection*. Clin Exp Immunol, 1993. **92**: p. 448-454.
43. Guadalupe, M., Reay, E., Sankaran, S., Prindiville, T., Flamm, J., McNeil, A., and Dandekar, S., *Severe CD4⁺ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus Type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy*. J Virol, 2003. **77**: p. 11708-11717.
44. Brenchley, J.M., Schacker, T.W., Ruff, L.E., Price, D.A., Taylor, J.H., Beilmann, G.J., Nguyen, P.L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A.T., and Douek, D.C., *CD4⁺ T cell*

- depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract.* JEM, 2004. **200**: p. 749-759.
45. Hammer, S.M., Katzenstein, D.A., Hughes, M.D., Gundacker, H., Schooley, R.T., Haubrich, R.H., Henry, W.K., Lederman, M.M., Phair, J.P., Niu, M., Hirsch, M.S., and Merigan, T.C., *A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter.* N Engl J Med, 1996. **335**: p. 1081-1090.
 46. *Delta, Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals* Lancet, 1996. **348**: p. 283-291.
 47. Ho, D.D., *Time to hit HIV: early and hard.* N Engl J Med, 1995. **333**: p. 450-451.
 48. Harrington, M., and Carpenter, C.C.J., *Hit HIV hard, but only when necessary.* Lancet, 2000. **355**: p. 2147-2152.
 49. Hawkins, T., *Understanding and managing the adverse effects of anti-retroviral therapy.* Antiviral Res, 2010. **85**: p. 201-209.
 50. Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müßig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kücherer, C., Blau, O., Blau, I.W., Hofmann, W.K., and Thiel, E., *Long-term control of HIV by CCR5 delta32/delta32 stem-cell transplantation.* N Engl J Med, 2009. **360**: p. 692-698.
 51. Barouche, D.H., *Challenges in the development of an HIV-1 vaccine.* Nature, 2008. **455**: p. 613-619.
 52. Letvin, N.L., Eaton, K.A., Aldrich, W.R., Sehgal, P.K., Blake, B.J., Schlossman, S.F., King, N.W., and Hunt, R.D., *Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys.* Proc Natl Acad Sci USA, 1983. **80**: p. 2718-2722.
 53. Daniel, M.D., Letvin, N.L., King, N.W., Kannagi, M., Sehgal, P.K., Hunt, R.D., Kanki, P.J., Essex, M., and Desrosiers, R.C., *Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques.* Science, 1985. **228**: p. 1201-1204.

54. Van de Woude, S., and Apetrei, C., *Going wild: Lessons from naturally occurring T-lymphotropic lentiviruses*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**: p. 728-762.
55. Müller-Trutwin, M.C., Corbet, S., Tavares, M.D., Hervé, V.M.A., Nerrienet, E., Georges-Courbot, M.C., Saurin, W., Sonigo, P., and Barré-Sinoussi, F., *The evolutionary rate of nonpathogenic simian immunodeficiency virus (SIVagm) is in agreement with a rapid and continuous replication in vivo*. Virology, 1996. **223**: p. 89-102.
56. Keele, B.F., Jones, J.H., Terio, K.A., Estes, J.D., Rudicell, K.S., Wilson, M.L., Li, Y., Learn, G.H., Beasley, T.M., Schumacher-Stankey, J., Wroblewski, E., Mosser, A., Raphael, J., Kamenya, S., Lonsdorf, E.V., Travis, D.A., Mlengeya, T., Kinsel, M.J., Else, J.G., Silvestri, G., Goodall, J., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Pusey, A.E., and Hahn, B.H., *Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz*. Nature, 2009. **460**: p. 515-519.
57. Letvin, N.L., Daniel, M.D., Sehgal, P.K., Desrosiers, R.C., Hunt, R.D., Waldron, L.M., MacKey, J.J., Schmidt, D.K., Chalifoux, L.V., and King, N.W., *Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III*. Science, 1985. **230**: p. 71-73.
58. Shedlock, D.J., Silvestri, G., and Weiner, D.B., *Monkeying around with HIV vaccines: using rhesus macaques to define 'gatekeepers' for clinical trials* Nat Rev Immunol, 2009. **9**: p. 717-728.
59. Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H.S., Özel, M., Pauli, G., and Koch, M.A., *Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins*. Virology, 1987. **156**: p. 171-176.
60. Connor, R.I., Kuan Chen, B., Choe, S., and Landau, N.R., *Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes*. Virology, 1995. **206**: p. 935-944.
61. Sherman, M.P., De Noronha, C.M.C., Heusch, M.I., Greene, S., and Greene, W.C., *Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr*. J Virol, 2001. **75**: p. 1522-1532.

62. Mansky, L.M., *The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene*. Virology, 1996. **222**: p. 391-400.
63. Jowett, J.B.M., Planelles, V., Poon, B., Shah, N.P., Chen, M.-L., and Chen, I.S.Y., *The human immunodeficiency virus type I vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle*. J Virol, 1995. **69**: p. 6304-6313.
64. Laguette, N., Brégnard, C., Hue, P., Basbous, J., Yatim, A., Larroque, M., Kirchhoff, F., Constantinou, A., Sobhian, B., and Benkirane, M., *Premature activation of the SLX4 complex by Vpr promotes G2/M arrest and escape from innate immune sensing*. Cell, 2014. **156**: p. 134-145.
65. Gibbs, J.S., Lackner, A.A., Lang, S.M., Simon, M.A., Sehgal, P.K., Daniel, M.D., and Desrosiers, R.C., *Progression to AIDS in the absence of a gene for vpr or vpx*. J Virol, 1995. **69**: p. 2378-2383.
66. Lang, S.M., Weeger, M., Stahl-Hennig, C., Coulibaly, C., Hunsmann, G., Müller, J., Müller-Hermelink, H., Fuchs, D., Wachter, H., Daniel, M.M., Desrosiers, R.C., and Fleckenstein, B., *Importance of vpr for infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus*. J Virol, 1993. **67**: p. 902-912.
67. Hoch, J., Lang, S.M., Weeger, M., Stahl-Hennig, C., Coulibaly, C., Dittmer, U., Hunsmann, G., Fuchs, D., Müller, J., Sopper, S., Fleckenstein, B., and Überla, K.T., *Vpr deletion mutant of simian immunodeficiency virus induces AIDS in rhesus monkeys*. J Virol, 1995. **69**: p. 4807-4813.
68. Kestler, H.W., Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D., and Desrosiers, R.C., *Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS*. Cell, 1991. **65**: p. 651-662.
69. Deacon, N.J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D.J., McPhee, D.A., Greenway, A.L., Ellett, A., Chatfield, C., Lawson, V.A., Crowe, S., Maerz, A., Sonza, S., Learmont, J., Sullivan, J.S., Cunningham, A., Dwyer, D., Dowton, D., and Mills, J., *Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients*. Science, 1995. **270**: p. 988-991.

70. Kirchhoff, F., Greenough, T.C., Brettler, D.B., Sullivan, J.L., and Desrosiers, R.C., *Brief report: Absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection*. N Engl J Med, 1995. **332**: p. 228-232.
71. Garcia, J.V., and Miller, A.D., *Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef*. Nature, 1991. **350**: p. 508-511.
72. Guy, B., Kieny, M.P., Riviere, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girard, M., Montagnier, L., and Lecocq, J.-P., *HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product*. Nature, 1987. **330**: p. 266-269.
73. Benson, R.E., Sanfridson, A., Ottinger, J.S., Doyle, C., and Cullen, B.R., *Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection*. JEM, 1993. **177**: p. 1561-1566.
74. Little, S.J., Riggs, N.L, Chowers, M.Y., Fitch, N.J.S., Richman, D.D., Spina, C.A., and Guatelli, J.C., *Cell surface CD4 downregulation and resistance to superinfection induced by a defective provirus of HIV-1*. Virology, 1994. **205**: p. 578-582.
75. Schwartz, O., Maréchal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., and Heard, J.-M., *Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 nef protein*. Nat Med, 1996. **2**: p. 338-342.
76. Collins, K.L., Chen, B.K., Kalams, S.A., Walker, B.D., and Baltimore, D., *HIV-1 nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes*. Nature, 1998. **391**: p. 397-401.
77. Bell, I., Ashman, C., Maughan, J., Hooker, E., Cook, F., and Reinhart, T.A., *Association of simian immunodeficiency virus nef with the T-cell receptor (TCR) zeta chain leads to TCR down-modulation*. J Gen Virol, 1998. **79**: p. 2717-2727.
78. Schindler, M., Münch, J., Kutsch, O., Li, H., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Müller-Trutwin, M.C., Novembre, F.J., Peeters, M., Courgnaud, V., Bailes, E., Roques, P., Sodora, D.L., Silvestri, G., Sharp, P.M., Hahn, B.H., and Kirchhoff, F., *Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1*. Cell, 2006. **125**: p. 1055-1067.

79. Bell, I., Schaefer, T.M., Tribble, R.P., Amedee, A., and Reinhart, T.A., *Down-modulation of the costimulatory molecule, CD28, is a conserved activity of multiple SIV Nefs and is dependent on histidine 196 of Nef*. *Virology*, 2001. **283**: p. 148-158.
80. Schindler, M., Schmökel, J., Specht, A., Li, H., Münch, J., Khalid, M., Sodora, D.L., Hahn, B.H., Silvestri, G., and Kirchhoff, F., *Inefficient Nef-mediated downmodulation of CD3 and MHC-I correlates with loss of CD4+ T cells in natural SIV infection*. *Plos Pathog*, 2008. **4**: p. e1000107.
81. Feldmann, J., Leligidowicz, A., Jaye, A., Dong, T., Whittle, H., and Rowland-Jones, S.L., *Downregulation of the T-cell receptor by human immunodeficiency virus Type 2 Nef does not protect against disease progression*. *J Virol*, 2009. **83**: p. 12968-12972.
82. Kaur, A., Grant, R.M., Means, R.E., McClure, H., Feinberg, M., and Johnson, R.P., *Diverse host responses and outcomes following simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection in sooty mangabeys and rhesus macaques*. *J Virol*, 1998. **72**: p. 9597-9611.
83. Münch, J., Janardhan, A., Stolte, N., Stahl-Hennig, C., Ten Haaf, P., Heeney, J.L., Swigut, T., Kirchhoff, F., and Skowronski, J., *T-cell receptor:CD3 down-regulation is a selected in vivo function of simian immunodeficiency virus Nef but is not sufficient for effective viral replication in rhesus macaques*. *J Virol*, 2002. **76**: p. 12360-12364.
84. Dalgleish, A.G., Beverley, P.C.L., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. *Nature*, 1984. **312**: p. 763-767.
85. Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C., and Montagnier, L., *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. *Nature*, 1984. **312**: p. 767-768.
86. Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-protein-coupled receptor*. *Science*, 1996. **272**: p. 872-877.
87. Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littmann,

- D.R., and Landau, N.R., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. Nature, 1996. **381**: p. 661-666.
88. Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collmann, R.G., and Doms, R.W., *A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the b-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors*. Cell, 1996. **85**: p. 1149-1158.
89. Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P., Koup, R.A., Moore, J.P., and Paxton, W.A., *HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. Nature, 1996. **381**: p. 667-673.
90. Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A., and Landau, N.R., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection*. Cell, 1996. **86**: p. 367-377.
91. Freed, E.O., Delwart, E.L., Buchsacher Jr, G.L., and Panganiban, A.T., *A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity*. Proc Natl Acad Sci USA, 1992. **89**: p. 70-74.
92. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., *Immunologie*. 5. Auflage ed. 2002: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
93. Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X., and Reinecker, H.-C., *Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators*. Gastroenterology, 2000. **118**: p. 1001-1011.
94. Kao, C.-Y., Chen, Y., Thai, P., Wachi, S., Huang, F., Kim, C., Harper, R.W., and Wu, R., *IL-17 markedly up-regulates b-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kB signaling pathways*. J Immunol, 2004. **173**: p. 3482-3491.
95. Raffatellu, M., Santos, R.L., Verhoeven, D.E., George, M.D., Wilson, R.P., Winter, S.E., Godinez, I., Sankaran, S., Paixao, T.A., Gordon, M.A., Kolls, J.K., Dandekar, S., and Bäuml, A.J., *Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17*

- deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut.* Nat Med, 2008. **14**: p. 421-428.
96. Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Förster, R., *Follicular B helper T cells express CXC Chemokine Receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production.* J Exp Med, 2000. **192**: p. 1545-1551.
97. Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B., and Mackay, C.R., *Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**: p. 853-865.
98. Greaves, M.F., Hariri, G., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Ritter, M.A., Ritz, J., *Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts.* Blood, 1983. **61**: p. 628-639.
99. Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H., and Reth, M., *Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class.* Nature, 1990. **343**: p. 760-762.
100. Schamel, W.W.A., and Reth, M., *Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor.* Immunity, 2000. **13**: p. 5-14.
101. Lutz, C., Ledermann, B., Kosco-Vilbois, M.H., ochsenbein, A.F., Zinkernagel, R.M., Köhler, G., and Brombacher, F., *IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells.* Nature, 1998. **393**: p. 797-801.
102. Chen, K., Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N.W., Bengten, E., Edholm, E.-S., Santini, P.A., Rath, P., Chiu, A., Cattalini, M., Litzman, J., Bussel, J., Huang, B., Meini, A., Riesbeck, K., Cunningham-Rundles, C., Plebani, A., and Cerutti, A., *Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, pro-inflammatory and B-cell-stimulating programs in basophils.* Nat Immunol, 2009. **10**: p. 889-898.
103. Mattapallii, J.J., Douek, D.C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., and Roederer, M., *Massive infection and loss of memory CD4⁺ T cells in multiple tissues during acute SIV infection.* Nature, 2005. **434**: p. 1093-1097.

104. Sopper, S., Nierwetberg, D., Halbach, A., Sauer, U., Scheller, C., Stahl-Hennig, C., Mätz-Rensing, K., Schäfer, F., Schneider, T., Ter Meulen, V., and Müller, J.G., *Impact of simian immunodeficiency virus (SIV) infection on lymphocyte numbers and T-cell turnover in different organs of rhesus monkeys*. Blood, 2003. **101**: p. 1213-1219.
105. Brenchley, J.M., Price, D.A., Schacker, T.W., Asher, T.E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., Blazar, B.R., Rodriguez, B., Teixeira-Johnson, L., Landay, A., Martin, J.N., Hecht, F.M., Picker, L.J., Lederman, M.M., Deeks, S.G., and Douek, D., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat Med, 2006. **12**: p. 1365-1371.
106. Reimann, K.A., Tenner-Racz, K., Racz, P., Montefiori, D.C., Yasutomi, Y., Lin, W., Ransil, B.J., and Letvin, N.L., *Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques*. J Virol, 1994. **68**: p. 2362-2370.
107. Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Santra, S., Sasseville, V.G., Simon, M.A., Lifton, M.A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B.J., Ghayeb, J., Forman, M.A., Montefiori, D.C., Rieber, E.P., Letvin, N.L., and Reimann, K.A., *Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes*. Science, 1999. **283**: p. 857-860.
108. Lindqvist, M., Van Lunzen, J., Soghoian, D.Z., Kuhl, B.D., Ranasinghe, S., Kranias, G., Flanders, M.D., Cutler, S., Yudanin, N., Muller, M.I., Davis, I., Farber, D., Hartjen, P., Haag, F., Alter, G., Schulze zur Wiesch, J., and Streeck, H., *Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection*. J Clin Invest, 2012. **122**: p. 3271-3280.
109. Petrovas, C., Yamamoto, T., Gerner, M.Y., Boswell, K.L., Wloka, K., Smith, E.C., Ambrozak, D.R., Sandler, N.G., Timmer, K.J., Sun, X., Pan, L., Poholek, A., Rao, S.S., Brenchley, J.M., Alam, S.M., Tomaras, G.D., Roederer, M., Douek, D.C., Seder, R.A., Germain, R.N., Haddad, E.K., and Koup, R.A., *CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection*. J Clin Invest, 2012. **122**: p. 3281- 3294.
110. Schnittman, S.M., Lane, H.C., Higgins, S.E., Folks, T., and Fauci, A.S., *Direct polyclonal activation of human B lymphocytes by the acquired immune deficiency syndrome virus*. Science, 1986. **233**: p. 1084-1086.

111. Moir, S., Malaspina, A., Li, Y., Chun, T.-W., Lowe, T., Adelsberger, J., Baseler, M., Ehler, L.A., Liu, S., Davey Jr, R.T., Mican, J.A.M., and Fauci, A.S., *B cells of HIV-1–infected patients bind virions through CD21–complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells*. J Exp Med, 2000. **192**: p. 637-645.
112. Malaspina, A., Moir, S., Nickle, D.C., Donoghue, E.T., Ogwaro, K.M., Ehler, L.A., Liu, S., Mican, J.A.M., Dybul, M., Chun, T.-W., Mullins, J.I., and Fauci, A.S., *Human immunodeficiency virus type 1 bound to B cells: Relationship to virus replicating in CD4+ T cells and circulating in plasma*. J Virol, 2002. **76**: p. 8855-8863.
113. Shirai, A., Consentino, M., Leitman-Klinman, S.F., and Klinman, D.M., *Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation*. J Clin Invest, 1992. **89**: p. 561-566.
114. Lane, H.C., Masur, H., Edgar, L.C., Whalen, G., Rook, A.H., and Fauci, A.S., *Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome*. N Engl J Med, 1983. **309**: p. 453-458.
115. Moir, S., Malaspina, A., Ogwaro, K.M., Donoghue, E.T., Hallahan, C.W., Ehler, L.A., Liu, S., Adelsberger, J., Lapointe, R., Hwu, P., Baseler, M., Orenstein, J.M., Chun, T.-W., Mican, J.A.M., and Fauci, A.S., *HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals*. PNAS, 2001. **98**: p. 10362-10367.
116. Martínez-Maza, O., Crabb, E., Mitsuyasu, R.T., Fahey, J.L., and Giorgi, J.V., *Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is associated with an in vivo increase in B lymphocyte activation and immaturity*. J Immunol, 1987. **138**: p. 3720-3724.
117. Nagase, H., Agematsu, K., Kitano, K., Takamoto, M., Okubo, Y., Komiyama, A., and Sugane, K., *Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: Circulating memory B-cell reduction with plasmacytosis*. Clin Immunol, 2001. **100**: p. 250-259.
118. Martínez-Maza, O., and Crabb Breen, E., *B-cell activation and lymphoma in patients with HIV*. Curr Opin Oncol, 2002. **14**: p. 528-532.
119. Rieckmann, P., Poli, G., Fox, C.H., Kehrl, J.H., and Fauci, A.S., *Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B*

- lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors.* J Immunol, 1991. **147**: p. 2922-2927.
120. He, B., Qiao, X., Klasse, P.J., Chiu, A., Chadburn, A., Knowles, D.M., Moore, J.P., and Cerutti, A., *HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors.* J Immunol, 2006. **176**: p. 3931-3941.
121. Müller, F., Aukrust, P., Nordoy, I., and Froland, S.S., *Possible role of Interleukin-10 (IL-10) and CD40 ligand expression in the pathogenesis of hypergammaglobulinemia in human immunodeficiency virus infection: Modulation of IL-10 and Ig production after intravenous Ig infusion.* Blood, 1998. **92**: p. 3721-3729.
122. Malaspina, A., Moir, S., Ho, J., Wang, W., Howell, M.L., O'Shea, M.A., Roby, G.A., Rehm, C.A., Mican, J.M., Chun, T.-W., and Fauci, A.S., *Appearance of immature/transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: correlation with increased IL-7.* PNAS, 2006. **103**: p. 2262-2267.
123. Moir, S., Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., DiPoto, A.C., O'Shea, M.A., Roby, G., Kottlil, S., Arthos, J., Proschan, M.A., Chun, T.-W., and Fauci, A.S., *Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals.* J Exp Med, 2008. **205**: p. 1797-1805.
124. Titanji, K., De Milito, A., Cagigi, A., Thorstensson, R., Grützmeiner, S., Atlas, A., Hejdeman, B., Kroon, F.P., Lopalco, L., Nilsson, A., and Chiodi, F., *Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection.* Blood, 2006. **108**: p. 1580-1587.
125. De Milito, A., Mörch, C., Sönnernborg, A., and Chiodi, F., *Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection.* AIDS, 2001. **15**: p. 957-964.
126. Peruchon, S., Chaoul, N., Burelout, C., Delache, B., Brochard, P., Laurent, P., Cognasse, F., Prévot, S., Garraud, O., Le Grand, R., and Richard, Y. *Tissue-specific B-cell dysfunction and generalized memory B-cell loss during acute SIV infection.* PLoS one, 2009. **4**, DOI: e5966.

127. Richman, D.D., Wrin, T., Little, S.J., and Pertopoulos, C.J., *Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection*. PNAS, 2003. **100**: p. 4144-4149.
128. Doria-Rose, N.A., Klein, R.M., Manion, M.M., O'Dell, S., Phogat, A., Chakrabati, B., Hallahan, C.W., Migueles, S.A., Wrhammerst, J., Ahmed, R., Nason, M., Wyatt, R.T., Mascola, J.R., and Connors, M., *Frequency and phenotype of human immunodeficiency virus envelope-specific B cells from patients with broadly cross-neutralizing antibodies*. J Virol, 2009. **83**: p. 188-199.
129. Wrammert, J., Koutsonanos, D., Li, G.-L., Edupuganti, S., Sui, J., Morrissey, M., McCausland, M., Skountzou, I., Hornig, M., Lipkin, W.I., Mehta, A., Razavi, B., Del Rio, C., Zheng, N.-Y., Lee, J.-H., Huang, M., Ali, Z., Kaur, K., Andrews, S., Amara, R.R., Wang, Y., Das, S.R., O'Donnell, C.D., Yewdell, J.W., Subbarao, K., Marasco, W.A., Mulligan, M.J., Compans, R., Ahmed, R., and Wilson, P.C., *Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection*. JEM, 2011. **208**: p. 181-193.
130. Fondere, J.-M., Huguet, M.-F., Yssel, H., Baillat, V., Reynes, J., Van de Perre, P., and Vendrell, J.-P., *Detection of peripheral HIV-1 specific memory B cells in patients untreated or receiving highly active antiretroviral therapy*. AIDS, 2003. **17**: p. 2323-2330.
131. Mestecky, J., *Humoral immune responses to the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) in the genital tract compared to other mucosal sites*. J Reprod Immunol, 2007. **73**: p. 86-97.
132. Tollerud, D.J., Brown, L.M., Clark, J.W., Neuland, C.Y., Mann, D.L., Pankiw-Trost, L.K., and Blattner, W.A., *Cryopreservation and long-term liquid nitrogen storage of peripheral blood mononuclear cells for flow cytometry analysis: effects on cell subset proportions and fluorescence intensity*. J Clin Lab Anal, 1991. **5**: p. 255-261.
133. Romeu, M.A., Mestre, M., Gonzalez, L., Vallas, A., Verdaguer, J., Corominas, M., Bas, J., Massip, E., Buendia, E., *Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation*. J Immunol Meth, 1992. **154**: p. 7-10.

134. Reimann, K.A., Chernoff, M., Wilkening, C.L., Nickerson, C.E., Landay, A.L., The ACTG Immunology Advanced Technology Laboratories, *Preservation of lymphocyte immunophenotype and proliferative responses in cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus type 1-infected donors: Implications for multicenter clinical trials*. Clin Diagn Lab Immunol, 2000. **7**: p. 352-359.
135. Constantini, A., Mancini, S., Giuliodoro, S., Butini, L., Regnery, C.M., Silvestri, G., Montroni, M., *Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function*. J Immunol Meth, 2003. **278**: p. 145-155.
136. Kreher, C.R., Dittrich, M.T., Guerkov, R., Boehm, B.O., and Tary-Lehmann, M., *CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays*. J Immunol Methods, 2003. **278**: p. 79-2003.
137. Weinberg, A., Song, L.-Y., Wilkening, C., Sevin, A., Blais, B., Louzao, R., Stein, D., Defechereux, P., Durand, D., Riedel, E., Reftery, N., Jesser, R., Brown, B., Keller, M.F., Dickover, R., McFarland, E., Fenton, T., *Optimization and limitations of use of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for functional and phenotypic T-cell characterization*. Clin Vacc Immunol, 2009. **16**: p. 1176-1186.
138. Ogunjimi, B., Hens, N., Malfait, R., van Tendeloo, V., Smits, E., *Creating a robust framework for the analysis of cryopreserved samples in quantitative immunological experiments* J Immunol Meth, 2013. **392**: p. 63-67.
139. Aziz, N., Margolick, J.B., Detels, R., Rinaldo, C.R., Phair, J., Jamieson, B.D., Butch, A.W., *Value of a quality assessment program in optimizing cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells in a multicenter study*. Clin and Vacc Imm, 2013. **20**: p. 590-595.
140. Gibbs, J.S., Regier, D.A., and Desrosiers, R.C., *Construction and in vitro properties of SIVmac mutants with deletions in "nonessential" genes*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994. **10**: p. 607-616.
141. Negri, D., R.M., Baroncelli, S., Catone, S., Comini, A., Michelini, Z., Maggiorella, M.T., Sernicola, L., Crostarosa, F., Belli, R., Mancini, M.G., Farcomeni, S., Fagrouch, Z., Ciccozzi, M., Boros, S., Liljestrom, P., Norley, S., Heeney, J., and Titti, F., *Protective efficacy of a multicompetent vector vaccine in cynomolgus monkeys after*

- intrarectal simian immunodeficiency virus challenge*. J Gen Virol, 2004. **85**: p. 1191-1201.
142. Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Werner, E.R., Dierich, M.P., and Wachter, H., *Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV infection*. Immunol Today, 1988. **9**: p. 150-155.
143. Huber, C., Batchelor, J.R., Fuchs, D., Hausen, A., Lang, A., Niederwieser, D., Reibnegger, G., Swetly, P., Troppmair, J., and Wachter, H., *Immune response-associated production of neopterin*. J Exp Med, 1984. **160**: p. 310-316.
144. Schroecksnadel, K., Winkler, C., and Fuchs, D., *Method for urinary neopterin measurements by HPLC*. J Biochem Biophys Methods, 2006. **66**: p. 99-100.
145. Neumann, B., Klippert, A., Raue, K., Sopper, S., Stahl-Hennig, C., *Characterization of B and plasma cells in blood, bone marrow, and secondary lymphoid organs of rhesus macaques by multicolor flow cytometry*. J Leukoc Biol, 2015. **97**: p. 19-30.
146. Neumann, B., Sopper, S., Stahl-Hennig, C., *OMIP-026: Phenotypic analysis of B and plasma cells in rhesus macaques*. Cytometry A, 2015.
147. Titanji, K., Velu, V., Chennareddi, L., Vijay-Kumar, M., Gewirtz, A.T., Freeman, G.J., Amara, R.R., *Acute depletion of activated memory B-cells involves the PD-1 pathway in rapidly progressing SIV-infected macaques*. J Clin Invest, 2010. **120**: p. 3878-3890.
148. Maurer, D., Fischer, G.F., Fae, I., Majdic, O., Stuhlmeier, K., von Jeney, N., Holter, W., Knapp, W., *IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset*. J Immunol, 1992. **148**: p. 3700-3705.
149. Agematsu, K., Nagumo, H., Yang, F.-C., Nakazawa, T., Fukushima, K., Ito, S., Sugita, K., Mori, T., Kobata, T., Morimoto, C., Komiyama, A., *B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production*. Eur J Immunol, 1997. **27**: p. 2073-2079.
150. Demberg, T., Brocca-Cofano, E., Xiao, P., Venzon, D., Vargas-Inchaustegui, D., Lee, E.M., Kalisz, I., Kalyanaraman, V.S., DiPasquale, J., McKinnon, K., and Robert-Guroff, M., *Dynamics of memory B-cell populations in blood, lymph nodes, and bone marrow during antiretroviral therapy and envelope boosting in simian*

- immunodeficiency virus SIVmac251-infected rhesus macaques*. J Virol, 2012. **86**: p. 12591-12604.
151. Wijdenes, J., Vooijs, W.C., Clément, C., Post, J., Morard, F., Vita, N., Laurent, P., Sun, R.-X., Klein, B., and Dore, J.-M., *A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1*. Br J Haematol, 1996. **94**: p. 318-323.
152. Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., González-García, I., and Brieva, J.A., *The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression*. Blood, 2002. **99**: p. 2154-2161.
153. Klippert, A., Stolte-Leeb, N., Neumann, B., Sauermann, U., Daskalaki, M., Gawanbacht, A., Kirchhoff, F., and Stahl-Hennig, C., *Frequencies of lymphoid T-follicular helper cells obtained longitudinally by lymph node fine-needle aspiration correlate significantly with viral load in SIV-infected rhesus monkeys*. J Med Primatol, 2015. **44**: p. 253-262.
154. Russel, W.M.S., and Burch, R.L., *The principles of humane experimental technique*. 1959, London: Methuen.
155. Reimann, K.A., Waite, B.C.D., Lee-Parritz, D.E., Lin, W., Uchanska-Ziegler, B., O'Connell, M.J., Letvin, N.L., *Use of human leucocyte-specific monoclonal antibodies for clinically immunophenotyping lymphocytes of rhesus monkeys*. Cytometry, 1994. **17**: p. 102-108.
156. Sopper, S., Stahl-Hennig, C., Demuth, M., Johnston, I.C.D., Doerries, R., and ter Meulen, V., *Lymphocyte subsets and expression of differentiation markers in blood and lymphoid organs of rhesus monkeys*. Cytometry, 1997. **29**: p. 351-362.
157. van Oers, M.H.J., Pals, S.T., van der Schoot, C.E., Koopman, G., Bonfrer, J.M.G., Hintzen, R.Q., von dem Borner, A.E.G., van Lier, R.A.W., *Expression and release of CD27 in human B-cell malignancies*. Blood, 1993. **82**: p. 3430-3436.
158. Widney, D., Gundapp, G., Said J.W., van der Meijden, M., Bonavida, B., Demidem, A., Trevisan, C., Taylor, J., Detels, R., Martínez-Maza, O., *Aberrant expression of CD27 and soluble CD27 (sCD27) in HIV infection and in AIDS-associated lymphoma*. Clin Immunol, 1999. **93**: p. 114-123.

159. De Milito, A., Aleman, S., Marenzi, R., Sönnnerborg, A., Fuchs, D., Zazzi, M., Chiodi, F., *Plasma levels of soluble CD27: a simple marker to monitor immune activation during potent antiretroviral therapy in HIV-1-infected subjects*. Clin Exp Immunol, 2002. **127**: p. 486-494.
160. van Lier, R.A.W., Borts, J., Vroom, T.M, Klein, H., van Mourik, P., Zeijlemaker, W.P., Melief, C.J.M., *Tissue distribution and biochemical and functional properties of Tp55 (CD27), a novel T cell differentiation antigen*. J Immunol, 1987. **139**: p. 1589-1596.
161. Hintzen, R.Q., de Jong, R., Hack, C.E., Chamuleau, M., de Vries, E.F.R., ten Berge, I.J.M., Borst, J., van Lier, R.A.W., *A soluble form of the human T cell differentiation antigen CD27 is released after triggering of the TCR/CD3 complex*. J Immunol, 1991. **147**: p. 29-35.
162. Loenen, W.A.M., de Vries, E., Gravestein, L.A., Hintzen, R.Q., van Lier, R.A.W., Borst, J., *The CD27 membrane receptor, a lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family, gives rise to a soluble form by protein processing that does not involve receptor endocytosis*. Eur J Immunol, 1992. **22**: p. 447-455.
163. Dekkers, P.E.P., ten Hove, T., Lauw, F.N., Koene, H.R., Lumley, P., van Deventer, S.J.H., van der Poll, T., *The metalloproteinase inhibitor GI5402 inhibits endotoxin-induced soluble CD27 and CD16 release in healthy humans*. Infect Immun, 2000. **68**: p. 3036-3039.
164. Kato, K., Chu, P., Takahashi, S., Hamada, H., Kipps, T.J., *Metalloprotease inhibitors block release of soluble CD27 and enhance the immune stimulatory activity of chronic lymphocytic leukemia cells*. Exp Hematol, 2007. **35**: p. 434-442.
165. De Jong, R., Loenen, W.A.M., Brouwer, M., van Emmerik, L., de Vries, E.F.R., Borts, J., van Lier, R.A.W., *Regulation of expression of CD27, a T cell-specific member of a novel family of membrane receptors*. J Immunol, 1991. **146**: p. 2488-2494.
166. Müller-Schweinitzer, E., Stulz, P., Striffeler, H., Haefeli, W.E., *Functional activity and transmembrane signaling mechanisms after cryopreservation of human internal mammary arteries*. J Vasc Surg, 1998. **27**: p. 528-537.

167. Müller-Schweinitzer, E., Brett, W., Zerkowski, H.R., Haefeli, W.E., *The mechanisms of cryoinjury: in vitro studies on human internal mammary arteries*. Br. J Pharmacol, 2000. **130**: p. 636-640.
168. Bissoyi, A., and Pramanik, K., *Role of the apoptosis pathway in cryopreservation-induced cell death in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood*. Biopreserv Biobank, 2014. **12**: p. 246-254.
169. Kleeberger CA, L.R., Margolick JB, Rinaldo CR, Phair JP, and Giorgi JV, *Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study*. Clin Diagn Lab Immunol, 1999. **6**: p. 14-19.
170. Fowke, K.R., Behnke, J., Hanson, C., Shea, K., and Consentino L.M., *Apoptosis: a method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral blood mononuclear cells*. J Immunol Methods, 2000. **244**: p. 139-144.
171. Owen, R.E., Sinclair, E., Emu, B., Heitmann, J.W., Hirschhorn, D.F., Epling, C.L., Tan, Q.X., Custer, B., Harris, J.M., Jacobson, M.A., McCune, J.M., Martin, J.N., Hecht, F.M., Deeks, S.G., and Norris, P.J., *Loss of T cell responses following long-term cryopreservation*. J Immunol Methods, 2007. **326**: p. 93-115.
172. Smith, J.G., Joseph, H.R., Green, T., Field, J.A., Wooters, M., Kaufhold, R.M., Antonello, J., and Caulfield, M.J., *Establishing acceptance criteria for cell-mediated-immunity assays using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal conditions*. Clin and Vacc Immunol, 2007. **14**: p. 527-537.
173. Weinberg, A., Song L.-Y., Wilkening, C., Fenton, T., Hural, J., Louzao, R., Ferrari, G., Etter, P.E., Berrong, M., Canniff, J.D., Carter, D., Defawe, O.D., Garcia, A., Garrelts, T.L., Gelman, R., Lambrecht, L.K., Pahwa, S., Pilakka-Kanthikeel, S., Shugarts, D.L., and Tustin, N.B., *Optimization of storage and shipment of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected and uninfected individuals for ELISPOT assays*. J Immunol Methods, 2010. **363**: p. 42-50.
174. Germann, A., Oh, Y.-J., Schmidt, T., Schön, U., Zimmermann, H., and von Briesen, H., *Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function*. Cryobiology, 2013. **67**: p. 193-200.

175. Bull, M., Lee, D., Stucky, J., Chiu, Y.-L., Rubin, A., Horton, H., and McElrath, M.J., *Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials*. J Immunol Meth, 2007. **322**: p. 57-69.
176. Seale, A.C., de Jong, B.C., Zaidi, I., Duvall, M., Whittle, H., Rowland-Jones, S., Jaye, A., *Effects of cryopreservation on CD4+CD25+ T cells of HIV-1 infected individuals*. J Clin Lab Anal, 2008. **22**: p. 153-158.
177. Sattui, S., de la Flor, C., Sanchez, C., Lewis, D., Lopez, G., Rizo-Patrón, E., White Jr, A.C., Montes, M., *Cryopreservation modulates the detection of regulatory T cell markers*. Cytometry Part B, 2012. **82B**: p. 54-58.
178. O'Connell, F.P., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., *CD138 (Syndecan-1), a plasma cell marker*. Hematopathology, 2004. **121**: p. 254-263.
179. Pellat-Deceunynck, C., and Bataille, R., *Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression*. Blood cells, molecules & diseases, 2004. **32**: p. 293-301.
180. Bataille, R., Jégo, G., Robillard, N., Barillé-Nion, S., Harousseau, J.-L., Moreau, P., Amiot, M., Pellat-Deceunynck, C., *The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy*. Haematologica, 2006. **91**: p. 1234-1240.
181. Peceliunas, V., Janiulioniene, A., Matuzeviciene, R., and Griskevicius, L., *Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors*. Cytometry B, 2011. **80B**: p. 318-323.
182. Silveira, E.L.V., Kasturi, S.P., Kovalenkov, Y., Rasheed, A.U., Yeiser, P., Jinnah, Z.S., Legere, T.H., Pulendran, B., Villinger, F., and Wrammert, J., *Vaccine-induced plasmablast responses in rhesus macaques: Phenotypic characterization and a source for generating antigen-specific monoclonal antibodies*. J Immunol Methods, 2015. **416**: p. 69-83.
183. Minges Wols, H.A., and Witte, P.L., *Plasma cell purification from murine bone marrow using a two-step isolation approach*. J Immunol Methods, 2008. **329**: p. 219-224.

184. Caraux, A., Klein, B., Paiva, B., Bret, C., Schmitz, A., Fuhler, G.M., Bos, N.A., Johnsen, H.E., Orfao, A., and Perez-Andres, M., *Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138⁻ and CD138⁺ plasma cells.* Haematologica, 2010. **95**: p. 1016-1020.
185. Biesemier, K.W., Dent, G.A., Pryzwansky, K.B., and Folds, J.D., *A comparative study of frozen-section immunoperoxidase and flow cytometry for immunophenotypic analysis of lymph node biopsies.* Clin Diagn Lab Immunol, 1994. **1**: p. 299-303.
186. Cha, I., and Goates, J.J., *Fine-needle aspiration of lymph nodes: use of flow cytometry immunophenotyping.* Pathology (Phila), 1996. **4**: p. 337-364.
187. Chung, J., Gong, G., Huh, J., Kwang Khang, S., and Ro, J.Y., *Flow cytometric immunophenotyping in fine-needle aspiration of lymph nodes.* J Korean Med Sci, 1999. **14**: p. 393-400.
188. Nicol, T.L., Silberman, M., Rosenthal, D.L., and Borowitz, M.J., *The accuracy of combined cytopathologic and flow cytometric analysis of fine-needle aspirates of lymph nodes.* Am J Clin Pathol, 2000. **114**: p. 18-28.
189. Ellison, E., Lapuerta, P., and Martin, S., *Fine needle aspiration (FNA) in HIV+ patients: results from a series of 655 aspirates.* Cytopathology, 1998. **9**: p. 222-229.
190. Grossl, N.A., Mosunjac, M.I., and Wallace, T.M., *Utility of fine needle aspiration in HIV-positive patients with corresponding CD4 counts: Four years' experience in a large inner city hospital.* Acta Cytol, 1997. **41**: p. 811-816.
191. Jayaram, G., and Chew, M.T., *Fine needle aspiration cytology of lymph nodes in HIV-infected individuals.* Acta Cytol, 2000. **44**: p. 960-966.
192. Kumar, N., Gupta, B.B., Sharma, B., Kaushal, M., Rewari, B.B., and Sundriyal, D., *Role of fine-needle aspiration cytology in human immunodeficiency virus-associated lymphadenopathy: a crosssectional study from northern India.* Hong Kong Med J, 2015. **21**: p. 38-44.
193. Martin-Bates, E., Tanner, A., Suvarna, S.K., Glazer, G., and Coleman, D.V., *Use of fine needle aspiration cytology for investigating lymphadenopathy in HIV positive patients.* J Clin Pathol, 1993. **46**: p. 564-566.

194. Michelow, P., Dezube, B.J., and Pantanowitz, L., *Fine needle aspiration of breast masses in HIV-infected patients*. *Cancer Cytopathol*, 2010. **118**: p. 218-224.
195. Michelow, P., Dezube, B.J., and Pantanowitz, L., *Fine needle aspiration of salivary gland masses in HIV-infected patients*. *Diagn Cytopathol*, 2012. **40**: p. 684-690.
196. Nayak, S., Mani, R., Kavatkar, A.N., Puranik, S.C., and Holla, V.V., *Fine-needle aspiration cytology in lymphadenopathy of HIV-positive patients*. *Diagn Cytopathol*, 2003. **29**: p. 146-148.
197. Reid, A., Miller, R., and Kocjan, G., *Diagnostic utility of fine needle aspiration (FNA) cytology in HIV-infected patients with lymphadenopathy*. *Cytopathology*, 1998. **9**: p. 230-239.
198. Rao, J.S., Kumari, S.J., and Kini, U., *Correlation of CD4 counts with the FNAC patterns of tubercular lymphadenitis in patients with HIV: a crosssectional pilot study*. *Diagn Cytopathol*, 2015. **43**: p. 16-20.
199. Schubert, P.T., Cotton, M.F., and Wright, C.A., *Cytomorphological patterns of M.bovis BCG and M. tuberculosis on fine needle aspiration biopsies: does HIV make a difference?* *Diagn Cytopathol*, 2011. **39**: p. 264-269.
200. Bart, P.-A., Meuwly, J.-Y., Corpataux, J.-M., Yerly, S., Rizzardì, P., Fleury, S., Muñoz, M., Knabenhans, C., Welbon, C., Pantaleo, G., Meylan, P.R.A., and the Swiss HIV cohort study, *Sampling lymphoid tissue cells by ultrasound-guided fine needle aspiration of lymph nodes in HIV-infected patients*. *AIDS*, 1999. **13**: p. 1503-1509.
201. Buergisser, P., Spertini, F., Weyrich-Suter, C., Pagani, J.-L., and Meylan P.R.A., *Monitoring responses to antiretroviral treatment in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients by serial lymph node aspiration*. *J Infect Dis*, 1997. **175**: p. 1202-1205.
202. Cajigas, A., Suhrland, M., Harris, C., Chu, F., McGowan, J., Golodner, M., Seymour, A.W., and Lyman, W.D., *Correlation of the ratio of CD4+/CD8+ cells in lymph node fine needle aspiration biopsies with HIV clinical status*. *Acta Cytol*, 1996. **41**: p. 1762-1768.

203. Fleury, S., Rizzardi, G.P., Chapuis, A., Tambussi, G., Knabenhans, C., Simeoni, E., Meuwly, J.-Y., Corpataux, J.-M., Lazzarin, A., Miedema, F., and Pantaleo, G., *Long-term kinetics of T cell production in HIV-infected subjects treated with highly active antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**: p. 5393-5398.
204. Meylan, P.R., Bürgisser, P., Weyrich-Suter, C., and Spertini, F., *Viral load and immunophenotype of cells obtained from lymph nodes by fine needle aspiration as compared with peripheral blood cells in HIV-infected patients*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1996. **13**: p. 39-47.
205. Xu, Y., Fernandez, C., Alcantara, S., Bailey, M., De Rose, R., Kelleher, A.D., Zaunders, J., and Kent, S.J., *Serial study of lymph node cell subsets using fine needle aspiration in pigtail macaques*. J Immunol Methods, 2013. **394**: p. 73-83.
206. Hong, J.J., Amancha, P.K., Rogers, K., Ansari, A.A., and Villinger, F., *Spatial alterations between CD4⁺ T follicular helper, B, and CD8⁺ T cells during simian immunodeficiency virus infection: T/B cell homeostasis, activation, and potential mechanism for viral escape*. J Immunol, 2012. **188**: p. 3247-3256.
207. Perreau, M., Savoye, A.-L., De Crignis, E., Corpataux, J.-M., Cubas, R., Haddad, E.K., De Leval, L., Graziosi, C., and Pantaleo, G., *Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production*. J Exp Med, 2012. **210**: p. 143-156.
208. Xu, Y., Weatherall, C., Bailey, M., Alcantara, S., De Rose, R., Estaquier, J., Wilson, K., Suzuki, K., Corbeil, J., Cooper, D.A., Kent, S.J., Kelleher, A.D., and Zaunders, J., *Simian immunodeficiency virus infects follicular helper CD4 T cells in lymphoid tissues during pathogenic infection of pigtail macaques*. J Virol, 2013. **87**: p. 3760-3773.
209. Cubas, R.A., Mudd, J.C., Savoye, A.-L., Perreau, M., Van Grevenynghe, J., Metcalf, T., Connick, E., Meditz, A., Freeman, G.J., Abesada-Terk Jr, G., Jacobson, J.M., Brooks, A.D., Crotty, S., Estes, J.D., Pantaleo, G., Lederman, M.M., and Haddad, E.K., *Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection*. Nat Med, 2013. **19**: p. 494-501.

210. Salvi, R., Garbuglia, A.R., Di Caro, A., Pulciani, S., Montella, F., and Benedetto, A., *Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor*. J Virol, 1998. **72**: p. 3646-3657.
211. Gorry, P.R., Churchill, M., Learmont, J., Cherry, C., Dyer, W.B., Wesselingh, S.L., and Sullivan J.S., *Replication-dependent pathogenicity of attenuated nef-deleted HIV-1 in vivo* J Acquir Immune Defic Syndr, 2007. **46**: p. 390-394.
212. Greenough, T.C., Sullivan, J.L., and Desrosiers, R.C., *Declining CD4 T-cell counts in a person infected with nef-deleted HIV-1*. N Engl J Med, 1999. **340**: p. 236-237.
213. Baba, T.W., Liska, V., Khimani, A.H., Ray, N.B., Dailey, P.J., Penninck, D.R., Bronson, R., Greene, M.F., McClure, H.M., Martin, L.N., and Ruprecht, R.M., *Live attenuated multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques*. Nat Med, 1999. **5**: p. 194-203.
214. Yu, H., Khalid, M., Heigele, A., Schmökel, J., Usmani, S.M., van der Merwe, J., Münch, J., Silvestri, G., and Kirchhoff, F., *Lentiviral Nef protein manipulate T cells in a subset-specific manner*. J Virol, 2015. **89**: p. 1986-2001.
215. Khalid, M., Yu, X., Sauter, D., Usmani, S.M., Schmökkel, J., Feldman, J., Gruters, R.A., Van der Ende, M.E., Geyer, M., Rowland-Jones, S., Osterhaus, A.D., and Kirchhoff, F., *Efficient Nef-mediated downmodulation of TCR-CD3 and CD28 is associated with high CD4+ T cell counts in viremic HIV-2 infection*. J Virol, 2012. **86**: p. 4906-4920.
216. Kahnt, K., Mätz-Rensing, K., Hofmann, P., Stahl-Hennig, C., and Kaup, F.-J., *SIV-associated lymphomas in rhesus monkeys (Macaca mulatta) in comparison with HIV-associated lymphomas*. Vet Pathol, 2002. **39**: p. 42-55.
217. Schultheiss, T., Schulte, R., Sauermann, U., Ibing, W., and Stahl-Hennig, C., *Strong mucosal immune responses in SIV infected macaques contribute to viral control and preserved CD4+ T-cell levels in blood and mucosal tissues*. Retrovirology, 2011. **8**: p. 1-13.
218. Mothé, B.R., Weinfurter, J., Wang, C., Rehrauer, W., Wilson, N., Allen, T.M., Allison, D.B., and Watkins, D.I., *Expression of the major histocompatibility complex class I*

- molecule Mamu-A*01 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication.* J Virol, 2003. **77**: p. 2736-2740.
219. Pal, R., Venzon, D., Letvin, N.L., Santra, S., Montefiori, D.C., Miller, N.R., Trynieszewska, E., Lewis, M.G., VanCott, T.C., Hirsch, V., Woodward, R., Gibson, A., Grace, M., Dobratz, E., Markham, P.D., Hel, Z., Nasca, J., Klein, M., Tartaglia, J., and Franchini, G., *ALVAC-SIV-gag-pol-env based vaccination and macaque major histocompatibility complex class I (A*01) delay simian immunodeficiency virus SIVmac-induced immunodeficiency.* J Virol, 2002. **76**: p. 292-302.
220. Mühl, T., Krawczak, M., ten Haaf, P., Hunsmann, G., and Sauermann, U., *MHC class I alleles influence set-point viral load and survival time in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys.* J Immunol, 2002. **169**: p. 3438-3446.
221. Yant, L.J., Friedrich, T.C., Johnson, R.C., May, G.E., Maness, N.J., Enz, A.M., Lifson, J.D., O'Connor, D.H., Carrington, M., and Watkins, D.I., *The high-frequency major histocompatibility complex class I allele Mamu-B*17 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication.* J Virol, 2006. **80**: p. 5074-5077.
222. Loffredo, J.T., Maxwell, J., Qi, Y., Glidden, C.E., Borchardt, G.J., Soma, T., Bean, A.T., Beal, D.R., Wilson, N.A., Rehauer, W.M., Lifson, J.D., Carrington, M., and Watkins, D.I., *Mamu-B*08-positive macaques control simian immunodeficiency virus replication.* J Virol, 2007. **81**: p. 8827-8832.
223. Sauermann, U., Stahl-Hennig, C., Stolte, N., Mühl, T., Krawczak, M., Spring, M., Fuchs, D., Kaup, F.-J., Hunsmann, G., and Sopper, S., *Homozygosity for a conserved MHC class II DQ-DRB haplotype is associated with rapid disease progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques: results from a prospective study.* J Infect Dis, 2000. **182**: p. 716-724.
224. Sauermann, U., Siddiqui, R., Suh, Y.-S., Platzer, M., Leuchte, N., Meyer, H., Mätz-Rensing, K., Stoiber, H., Nürnberg, P., Hunsmann, G., and Krawczak, M., *MHC class I haplotypes associated with survival time in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected rhesus macaques.* Genes Immun, 2008. **9**: p. 69-80.
225. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons.* Clin Microbiol Rev, 2001. **14**: p. 778-809.

226. Paun, A., and Pitha, P.M., *The IRF family, revisited*. Biochimie, 2007. **89**: p. 744-753.
227. Okumura, A., Alce, T., Lubyova, B., Ezelle, H., Strebel, K., and Pitha, P.M., *HIV-1 accessory proteins Vpr and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation*. Virology, 2008. **373**: p. 85-97.
228. Doehle, B.P., Hladik, F., McNevin, J.P., McElrath, M.J., and Gale Jr., M., *Human immunodeficiency virus type 1 mediates global disruption of innate antiviral signaling and immune defenses within infected cells*. J Virol, 2009. **83**: p. 10395-10405.
229. Harris, L.D., Tabb, B., Sodora, D.L., Paiardini, M., Klatt, N.R., Douek, D.C., Silvestri, G., Müller-Trutwin, M., Vasile-Pandrea, I., Apetrei, C., Hirsch, V., Lifson, J., Brenchley, J.M., and Estes, J.D., *Downregulation of robust acute type I interferon responses distinguishes nonpathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) infection of natural hosts from pathogenic SIV infection of rhesus macaques*. J Virol, 2010. **84**: p. 7886-7891.
230. Sandler, N.G., Bosinger, S.E., Estes, J.D., Zhu, R.T.R., Tharp, G.K., Boritz, E., Levin, D., Wijeyesinghe, S., Makamdop, K.N., del Prete, G.Q., Hill, B.J., Timmer, K., Reiss, E., Yarden, G., Darko, S., Contijoch, E., Todd, J.P., Silvestri, G., Nason, M., Norgren Jr., R.B., Keele, B.F., Rao, S., Langer, J.A., Lifson, J.D., Schreiber, G., and Douek, D.C., *Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression*. Nature, 2014. **511**: p. 601-605.

Danksagung

Auf diesem Wege möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, die mir diese Doktorarbeit ermöglicht und mich in dieser Zeit begleitet haben.

Als erstes danke ich Frau Dr. Stahl-Hennig am DPZ für die Vergabe des Dissertationsthemas und die Chance, in der Abteilung Infektionsmodelle als Doktorandin und Tierärztin gleichzeitig zu arbeiten. So konnte ich selbstständig in einer verantwortungsvollen Position arbeiten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Sutter für die Übernahme der (stets freundlichen) Betreuung der Doktorarbeit.

Besonders danke ich Dr. Berit Neumann für die Einarbeitung in das Feld der Durchflusszytometrie und die unentbehrliche Unterstützung bei der Analyse der Daten sowie für ihre Freundschaft in dieser Zeit.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Katharina Raue für die gute Einarbeitung in die tierexperimentelle Arbeit.

Ich danke Heidi Meyer, Nicole Leuchte und Dr. Ulrike Sauermann für die Daten zu der Viruslast.

Weiterhin danke ich auch Herrn Prof. Dr. Fuchs für die Bereitstellung der Daten zu den Neopterinwerten.

Dr. Nicole Stolte-Leeb danke ich für ihre Freundschaft und ihr Bemühen, mir immer alle Fragen zur Antragstellung und zur gesetzlichen Lage bei Tierversuchen zu beantworten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kirchhoff (und seiner Arbeitsgruppe) für die Bereitschaft zur Zusammenarbeit bei diesem Projekt, auf dem diese Dissertation zu einem großen Teil basiert, sowie für seine stets hilfreiche Kritik.

Ich danke Tingchuan Shi, Maria Daskalaki, Li Lin Gan und Ahmad Hassan Kotb für ihre Unterstützung und Freundschaft, ohne die ich das alles nicht geschafft hätte.

Maria Daskalaki danke ich auch für ihre enorme Hilfe bei der Probennahme im Tierhaus.

Zudem danke ich Shereen Petersen für das Korrekturlesen der englischen Zusammenfassung.

Den technischen Assistenten Sandra Heine, Judith Hampe, Kerstin Eckelmann, Sebastian Schimkowiak, Simone Lüert und Kathleen Listemann danke ich besonders für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor und für die durchflusszytometrischen Messungen.

Ich danke den Tierpflegern Peter Müller, Gabriele Marschhausen, Thorsten Eggers, Vanessa Böning, Achim Lück und Jessica Daniels sowie den Tierärzten Dr. Tamara Becker, Dr. Karen Lampe und Dr. Anette Schrod für die gute Zusammenarbeit im Tierhaus.

Mein Dank gilt ebenfalls den Mitarbeitern der Infektionspathologie Dr. Kerstin Mätz-Rensing, Wolfgang Henkel, Dr. Karen Lampe und Dr. Martina Bleyer für die gute Zusammenarbeit und die herzliche Atmosphäre bei den Sektionen.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für die Unterstützung in dieser Zeit und besonders meiner Schwester Julia für das Korrekturlesen dieser umfangreichen Arbeit.

Meinem Freund Thomas gilt mein besonderer Dank. Ohne seinen unermüdlichen Beistand während dieser Zeit hätte ich diese Arbeit nicht vollenden können. Ich danke ihm dafür, dass er immer an mich geglaubt hat.