

Charakterisierung von Mikrogliafunktionen im
Simianen Immundefizienzvirus (SIV) -
Rhesusaffentiermodell für AIDS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Tanja Bischoff
aus Guben

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. Hardeland

Korreferent: Prof. Dr. Hunsmann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2008

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Hardeland danke ich für das entgegengebrachte Interesse und die Bereitschaft, die externe Betreuung der vorliegenden Arbeit und deren Vertretung im Fachbereich Biologie der Georg-August-Universität Göttingen zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Hunsmann danke ich für die guten Arbeitsmöglichkeiten in der Abteilung Virologie und Immunologie am Deutschen Primatenzentrum und die große Unterstützung gerade in der Endphase der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Sieghart Sopper. Für die Vergabe des Themas und die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, vor allem aber für die sehr gute Betreuung und die angenehme Zusammenarbeit vielen Dank.

Bei Frau Nicola Schwedhelm möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und all die kleinen Dinge, die das Leben schöner machten, ganz herzlich bedanken. Frau Wiebke Rettberg danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung und die große Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. Christiane Stahl-Hennig, Frau Dr. Monika Franz und Frau Dr. Kerstin Mätz-Rensing, ohne deren Unterstützung die Arbeit am Rhesusaffenmodell für mich nicht umsetzbar gewesen wäre.

Ein ganz herzliches Dankeschön an meine Freunde und Familie, besonders an Ralph. Sie haben, jeder auf seine Weise, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, in den entscheidenden Momenten motiviert, aber auch kritisiert.

Meine Eltern kannten das Ziel schon, bevor ich den Weg gefunden hatte. Für Ihr Vertrauen und die uneingeschränkte Unterstützung werde ich Ihnen immer dankbar sein.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG

1	EINLEITUNG	1
1.1	HIV-1 ASSOZIIERTE DEMENZ.....	1
1.2	INFEKTION UND REPLIKATION VON HIV-1 IM ZENTRALNERVENSYSTEM	3
1.3	MIKROGLIAZELLEN.....	4
1.4	MECHANISMEN DER NEURODEGENERATIVEN PROZESSE	6
1.5	APOBEC3G.....	8
1.6	SIV-RHESUSAFFEN TIERMODELL	9
1.7	ZIEL DER ARBEIT	10
2	MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1	MATERIAL.....	11
2.1.1	Geräte.....	11
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.3	Chemikalien.....	12
2.1.4	Medien, Puffer, Enzyme	12
2.1.5	Kommerzielle RNA Isolations- und PCR-Kits	13
2.1.6	Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper	13
2.1.7	Software.....	16
2.2	VERSUCHSTIERE, VIREN	16
2.2.1	Entnahme von Vollblut und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) im experimentellen Zeitverlauf	16
2.2.2	Entnahme von Vollblut, Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) und zentralnervösem Gewebe zum Zeitpunkt der Sektion	17
2.3	METHODEN	18
2.3.1	Isolierung von Leukozyten aus peripherem Blut.....	18
2.3.2	Aufarbeitung der Cerebrospinalflüssigkeit	18
2.3.3	Isolierung von Mikrogliazellen und anderen Leukozyten aus Gehirngewebe	19
2.3.4	Kultivierung, Stimulation und Dokumentation von primären Mikroglia-	21
2.3.5	Durchflusszytometrische Analysen	22
2.3.5.1	Färbeschemata	22
2.3.5.2	Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration	23
2.3.5.3	Erstellung einer Kompensation	23
2.3.5.4	Färbungen für die durchflusszytometrische Analyse von Vollblut	24
2.3.5.5	Färbungen für die durchflusszytometrische Analyse von isolierten Zellen.....	24
2.3.5.6	Färbungen für die durchflusszytometrische Analyse mit Biotin markierten Antikörpern.....	24
2.3.5.7	Probenmessung im Durchflusszytometer und Datenverarbeitung	25
2.3.6	Molekulargenetische Methoden	26
2.3.6.1	Isolierung der gesamtRNA aus Mikrogliazellen und Gehirngewebe	26
2.3.6.2	Isolierung von Virus-RNA aus Cerebrospinalflüssigkeit-Überständen und Mikrogliakulturüberständen	28
2.3.6.3	Absolute Quantifizierung der Viruslast mittels Echtzeit reverser Transkriptions- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	29
2.3.6.4	Relative Quantifizierung der Genexpression mittels Zweischritt Echtzeit reverser Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	30
2.3.7	Datenauswertung und statistische Analyse	33

3	ERGEBNISSE	34
3.1	VERGLEICHENDE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER LEUKOZYTEN IN GEHIRN UND BLUT.....	36
3.1.1	Definition der Leukozytensubpopulationen.....	36
3.1.2	Zusammensetzung der Leukozyten bei uninfizierten Tieren	41
3.1.3	Veränderungen der Mikrogliazellpopulation im Gehirn von SIV infizierten Tieren.....	43
3.1.4	Veränderte Expression von Oberflächenmolekülen auf Mikrogliazellen im Verlauf der SIV-Infektion	44
3.1.5	Veränderungen der Makrophagenpopulation im Blut und im Gehirn von SIV infizierten Tieren	56
3.1.6	Veränderte Expression von Oberflächenmolekülen auf Makrophagen im Verlauf der SIV-Infektion	58
3.1.7	Zusammensetzung der infiltrierenden Lymphozyten im Gehirn von SIV infizierten Tieren	59
3.1.8	Veränderte Expression von Oberflächenmolekülen auf B-Zellen im Verlauf der SIV- Infektion.....	63
3.1.9	Veränderte Expression von Oberflächenmolekülen auf NK-Zellen im Verlauf der SIV- Infektion.....	65
3.1.10	Veränderte Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen im Verlauf der SIV- Infektion.....	71
3.2	MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN IM GEHIRN.....	87
3.2.1	Bestimmung der Viruslast.....	88
3.2.2	Expression der Gene APOBEC3G und MxA.....	90
4	DISKUSSION.....	94
5	LITERATURVERZEICHNIS	113
	ANHANG	
	LEBENS LAUF	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Die wichtigsten Schritte des Isolierungsverfahrens von Mikrogliazellen und anderen Leukozyten aus Gehirngewebe von Rhesusaffen....	21
Abb. 2.2	Beispielhafte Darstellung der gemessenen Signale in einem Histogramm und in einem Streudiagramm	25
Abb. 2.3	Die wichtigsten Schritte des Isolierungsverfahrens von RNA aus Mikrogliazellen oder RNA later stabilisiertem Gehirngewebe.....	27
Abb. 3.1	Altersverteilung in Jahren für die 53 Tiere umfassende Untersuchungsgruppe unterteilt in uninfizierte und infizierte Tiere	34
Abb. 3.2	Mikrogliazellkultur eines an AIDS erkrankten Tieres mit Virus induzierten Veränderungen des ZNS	35
Abb. 3.3	Infektionsdauer in Jahren sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	36
Abb. 3.4	Auswertungsschemata der durchflusszytometrischen Messungen vergleichend für Blut und Gehirn eines uninfizierten Tieres	39
Abb. 3.5	Auswertungsschemata der durchflusszytometrischen Messungen vergleichend für Blut und Gehirn eines infizierten Tieres	40
Abb. 3.6	Aufteilung der Leukozytensubpopulationen, mononukleäre Zellen, bei nicht SIV infizierten Tieren vergleichend für Blut und Gehirn	41
Abb. 3.7	Aufteilung der Lymphozytensubpopulationen bei nicht SIV infizierten Tieren vergleichend für Gehirn, Blut und Cerebrospinalflüssigkeit.....	42
Abb. 3.8	Anteil der Mikrogliazellen an den mononukleären Leukozyten im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	44
Abb. 3.9	Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von drei Oberflächenantigenen auf Mikrogliazellen eines uninfizierten Tieres	45
Abb. 3.10	Korrelation der für MHCII gemessenen Fluoreszenzintensitäten im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	45
Abb. 3.11	Expression der Oberflächenantigene CD29, CD45RB, CD63, CD64 im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	49
Abb. 3.12	Expression der Oberflächenantigene CD31, CD80, CD86 und CD11b im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	51

Abb. 3.13	Expression der Oberflächenantigene CD11a, CD45, CD95 in APC und MHCII in APC-Cy7 im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	54
Abb. 3.14	Expression der Oberflächenantigene CD14 in PerCP-Cy5.5 und CD69 in ECD im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	56
Abb. 3.15	Anteil der Makrophagen an den mononukleären Leukozyten in Gehirn und Blut sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	57
Abb. 3.16	Anteil der CD16+ Zellen an den Makrophagen in Gehirn und Blut sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion ..	58
Abb. 3.17	Anteil der Lymphozyten an den mononukleären Leukozyten in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	60
Abb. 3.18	Anteil der B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen an den Lymphozyten in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	62
Abb. 3.19	Anteil der CD21+ und der CD23+ Zellen an den B-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	64
Abb. 3.20	Anteil der CD80+ Zellen an den B-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	65
Abb. 3.21	Anteil der CD16+ Zellen beziehungsweise der CD16- Zellen an den NK-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	66
Abb. 3.22	Anteil der NKG2a+ Zellen beziehungsweise der NKG2a- Zellen an den CD16+ NK-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	68
Abb. 3.23	Anteil der CD16+ NK-Zellen an den Lymphozyten im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	69
Abb. 3.24	Vergleich der Zusammensetzung der NK-Zellen in Abhängigkeit zum Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten	70
Abb. 3.25	Anteil der $\alpha\beta$ TCR+ Zellen beziehungsweise der $\gamma\delta$ TCR+ Zellen an den T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	71
Abb. 3.26	Anteil der CD4+ Zellen beziehungsweise der CD8+ Zellen an den T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	73

Abb. 3.27	Anteil der CD4+ Zellen beziehungsweise der CD8+ Zellen an den T-Zellen im CSF vor und nach Infektion	75
Abb. 3.28	Anteil der CD28, CD69, CD183 und MHCII positiven Zellen an den CD4+ T-Zellen beziehungsweise den CD8+ T-Zellen bei nicht SIV infizierten Tieren vergleichend für Blut, Gehirn und CSF	77
Abb. 3.29	Anteil der CD28 positiven an den CD4+ beziehungsweise den CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	78
Abb. 3.30	Anteil der CD69 positiven an den CD4+ beziehungsweise den CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	79
Abb. 3.31	Anteil der CD183 positiven an den CD4+ beziehungsweise den CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	80
Abb. 3.32	Anteil der MHCII positiven an den CD4+ beziehungsweise den CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	81
Abb. 3.33	Aufteilung der Zellen durch Kombination der Marker CD28 und CD95 in naive Zellen, Effektorzellen und zentrale Gedächtniszellen für die CD4+ beziehungsweise die CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn	82
Abb. 3.34	Anteil der naiven Zellen, Effektorzellen und zentralen Gedächtniszellen an den CD4+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	83
Abb. 3.35	Anteil der naiven Zellen, Effektorzellen und zentralen Gedächtniszellen an den CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	85
Abb. 3.36	Darstellung der CD95+/CD28+/CD49d- T-Zellen durch Kombination der Marker CD49d und CD95 für CD4+ beziehungsweise die CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn	86
Abb. 3.37	Anteil der CD95+/CD28+/CD49d- Zellen an den CD4+ beziehungsweise den CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	87
Abb. 3.38	Anzahl der Virus-RNA-Kopien.....	89
Abb. 3.39	Vergleich der Viruslasten in Mikrogliazellen/Gehirn beziehungsweise Mikrogliazellen/CSF sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion	90

Abb. 3.40	Transkriptionslevel von APOBEC3G und MxA normalisiert gegen GAPDH vergleichend für Gehirn und Mikrogliazellen sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion.....	91
Abb. 3.41	Vergleich der APOBEC3G- und MxA-Expressionslevel, Viruslast und normalisierten Fluoreszenzintensität von MHCII von Mikrogliazellen zum Zeitpunkt der Sektion	93

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Übersicht verwendeter Fluoreszenzfarbstoffe, der zur Messung im Durchflusszytometer verwendeten Laser und Filter, sowie der Absorptions- und Emissionsmaxima.....	14
Tab. 2.2	Übersicht verwendeter muriner anti-human Antikörper, der Fluoreszenzfarbstoffe an die sie gekoppelt sind und Bezugsquellen.....	14
Tab. 2.3	Übersicht verwendeter Percoll-dichten und entsprechender Mischungsverhältnisse.....	20
Tab. 2.4	Übersicht verwendeter Kombinationen von Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten zur Charakterisierung von Mikrogliazellen und anderen Leukozyten isoliert aus Gehirngewebe.....	22
Tab. 2.5	Reaktionsansatz für RT-PCR zur Bestimmung der Viruslast.....	30
Tab. 2.6	Verwendete Primer und TaqMan-Sonde der RT-PCR zur Bestimmung der Viruslast.....	30
Tab. 2.7	Reaktionsansatz für cDNA Synthese (SuperScript First Strand Synthesis System) zur Bestimmung der Genexpression.....	31
Tab. 2.8	Reaktionsansatz für PCR zur Bestimmung der Genexpression.....	32
Tab. 2.9	Verwendete Primer der PCR zur Bestimmung der Genexpression.....	32
Tab. 3.1	Definition der analysierten Zellpopulationen anhand der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle.....	38
Tab. 3.2	Auf Mikrogliazellen untersuchte Oberflächenantigene.....	47

Anhang

Tab. 1	Zusammenfassung Tiere I
Tab. 2	Zusammenfassung Tiere II
Tab. 3	Zusammenfassung Leukozyten und Lymphozyten
Tab. 4	Zusammenfassung Cerebrospinalflüssigkeit
Tab. 5	normalisierte Fluoreszenzintensitäten - FITC
Tab. 6	normalisierte Fluoreszenzintensitäten - PE
Tab. 7	normalisierte Fluoreszenzintensitäten - APC
Tab. 8	normalisierte Fluoreszenzintensitäten – ECD, PerCP-Cy5.5, APC-Cy7
Tab. 9	Zusammenfassung Makrophagen
Tab. 10	Zusammenfassung B-Zellen
Tab. 11	Zusammenfassung NK-Zellen
Tab. 12	Zusammenfassung T-Zellen I
Tab. 13	Zusammenfassung CD4 positive T-Zellen - Gehirn
Tab. 14	Zusammenfassung CD4 positive T-Zellen - Blut
Tab. 15	Zusammenfassung CD8 positive T-Zellen - Gehirn
Tab. 16	Zusammenfassung CD8 positive T-Zellen - Blut
Tab. 17	Zusammenfassung PCR

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADC	engl. AIDS dementia complex
AIDS	engl. acquired immunodeficiency syndrome
ANOVA	engl. analysis of variance
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cy7
APOBEC3G	engl. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
BBB	engl. Brain blood barrier
bp	Basenpaare
BSA	engl. bovine serum albumin
CCR	engl. CC chemokine receptor
CD	engl. cluster of differentiation
CDC	engl. Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	engl. complementary DNA
ca.	circa
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CT	engl. cycle threshold
CXCR	engl. CXC chemokine receptor
CX3CR	engl. CX3C chemokine receptor
D	Dichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ECD	Texas-Red PE
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
env	engl. Envelope, retrovirales Gen
engl.	englisch
et al.	lat. et alii beziehungsweise et aliae
etc.	lat. et cetera
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting
Fas	CD95
FBS	engl. fetal bovine serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	engl. forward scatter
g	Gramm / Erdbeschleunigung
gag	retrovirales Gen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HAART	engl. highly active antiretroviral therapy
HIVE	engl. HIV-1 associated encephalitis
HAD	engl. HIV-1 associated dementia
HIV	Humanes Immundefizienzvirus

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
lat.	lateinisch
LECAM-1	CD62L
LFA-1	CD11a
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mM	Millimolar
MCMD	engl. minor cognitive motor disorder
MCP-1	engl. chemokine ligand 2 (CCL2)
MHC	engl. major histocompatibility complex
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Microliter
mRNA	engl. messenger RNA
MxA	engl. myxovirus resistance A
ng	Nanogramm
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PARP	Poly-(ADP Ribose)-Polymerase
PBMC	engl. peripheral blood mononuclear cells
PBS	engl. phosphate buffered saline
PcP	<i>Pneumocystis carinii</i> -Pneumonie
PCR	engl. polymerase chain reaction
PE	Phycoerithrin
PE-Cy7	Phycoerithrin-Cy7
PECAM-1	engl. platelet endothelial cell adhesion molecule1
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
PMT	engl. photomultiplier tube
pol	engl. polymerase
PTPase	Protein-Tyrosin-Phosphatase
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
Q	Quartilabstand
RT	Reverse Transkription
RNA	Ribonukleinsäure
SSC	engl. side scatter
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
SIVmac	engl. simian immunodeficiency virus of macaques
Tab,	Tabelle
Tat	engl. transactivator of transcription
TCR	engl. T-cell receptor

TNF α	engl. tumor necrosis factor α
U	engl. units (aktive Einheit eines Enzyms)
Vif	engl. virion infectivity factor
VLA-4	engl. very late antigen-4
Vpr	engl. viral protein R
ZNS	Zentralnervensystem

Zusammenfassung

Rund 60% der HIV-infizierten Patienten sind von neurologischen und psychiatrischen Symptomen betroffen. Die unter dem Begriff HIV-1 assoziierte Demenz zusammengefassten motorischen und kognitiven Einschränkungen, sowie Verhaltensänderungen, lassen sich durch einen signifikanten Funktionsverlust der Neuronen erklären. Als Ursachen werden die Freisetzung neurotoxischer Faktoren von infizierten Mikrogliazellen, Makrophagen und Astrozyten, sowie neurotoxische HIV-1 Proteine vermutet. Für Studien der neurodegenerativen Prozesse repräsentiert die Infektion von Rhesusaffen mit dem Simianen Immundefizienzvirus das wichtigste Tiermodell.

Den Mikrogliazellen als immunkompetenten Zellen des ZNS und gleichzeitige Zielzellen einer produktiven HIV-1 Infektion wird eine zentrale Funktion in der Pathogenese zugeordnet. Mikrogliazellen wurden zusammen mit anderen Leukozytenpopulationen aus dem Gehirn isoliert und die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle mit Hilfe der polychromatischen Durchflusszytometrie bestimmt. Neben schon bekannten Oberflächenantigenen konnte die Expression von weiteren neun Antigenen auf den Mikrogliazellen nachgewiesen werden. In den infizierten Tieren kommt es zu einer höheren Expression vieler Oberflächenantigene sowie zu einer de novo Expression von CD45RB, CD69, CD86 und CD95, was auf eine erhöhte Aktivierung der Mikroglia hinweist. Die Expression einzelner Oberflächenmoleküle, wie dem MHCII, korreliert mit der Viruslast in den Mikrogliazellen. Intrazellulär wurde die Transkription Interferon induzierter Gene und des antiretroviralen Faktors APOBEC3G im Gehirngewebe und in Mikrogliazellen mit Hilfe der Echtzeit PCR untersucht. Diese zeigen ebenfalls eine positive Korrelation zur Viruslast.

Neben den Mikrogliazellen konnten in allen Tieren Makrophagen und eine kleine Population infiltrierender Lymphozyten detektiert werden. Die Zusammensetzung der Lymphozyten im Gehirn unterscheidet sich signifikant von der im Blut. Die Anteile der NK-Zellen und der $\gamma\delta$ positiven T-Zellen sind erhöht. Beide werden der angeborenen Immunantwort zugeordnet. Parallel ist aber auch der Anteil der Effektor-T-Zellen im Vergleich zur Peripherie erhöht. Nach Infektion kommt es zu einem signifikanten Verlust der CD16 positiven NK-Zellen und einem signifikanten Anstieg der CD8 positiven Effektor-T-Zellen.

1 Einleitung

Im Juni 1981 veröffentlichte die US-Gesundheitsbehörde Centers for Disease Control (CDC) einen Bericht, der die Beobachtung außergewöhnlicher Fälle von Kaposi-Sarkomen und die signifikante Häufung von *Pneumocystis carinii*-Pneumonien (PcP), später als *Pneumocystis jirovecii* identifiziert, zusammenfasste (CDC, 1981). Nach mehreren Berichten über schwere Immunschwächen bei homosexuellen Männern (Gottlieb et al., 1981; Masur et al., 1981; Siegal et al., 1981), aber auch bei Empfängern von Bluttransfusionen (CDC, 1982) wurde die Erkrankung ab 1982 als erworbenes Immunschwächesyndrom (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) bezeichnet.

Nach Berichten des AIDS-Programms der Vereinten Nationen UNAIDS waren 2006 weltweit 39,5 Millionen Menschen mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) infiziert. Es kommt jährlich zu geschätzten 4,3 Millionen Neuinfektionen mit HIV und 2,9 Millionen Todesfällen verursacht durch AIDS (UNAIDS/WHO, 2006). Insgesamt sind in den letzten 25 Jahren mehr als 25 Millionen Menschen an den Folgen von AIDS verstorben. Charakteristisch für das Krankheitsbild ist die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit opportunistischen Krankheitserregern, das Entstehen von Tumoren (Schnittman and Fauci, 1994), zum Beispiel von B-Zell-Lymphomen, sowie motorische und kognitive Ausfallserscheinungen als Folge neurologischer Komplikationen bis hin zur HIV assoziierten Demenz (HAD) (Kaul et al., 2001; Ghafouri et al., 2006).

1.1 HIV-1 assoziierte Demenz

Der Begriff Demenz dient der Beschreibung verschiedener Symptome, welche zur Schädigung oder zu Fehlfunktionen im Gehirn führen. Diese Symptome können durch eine Vielzahl von Erkrankungen verursacht werden und sind abhängig von den jeweils betroffenen Gehirnregionen (Ghafouri et al., 2006). Neben Schädigungen ausgelöst durch Verletzungen, Tumore, Infarkte (Starkstein and Jorge, 2005) und neurodegenerative Erkrankungen, verursacht durch Protein-Aggregation, wie Alzheimer und Parkinson (Forman et al., 2004), treten infektiöse Erkrankungen des ZNS auf. Die Erreger können Proteine (Kreuzfeldt-Jakob-Erkrankung), Bakterien (Syphilis), Parasiten (Toxoplasmose) (Almeida and Lautenschlager, 2005) und Viren

(HIV-1, Herpes-simplex-Virus Typ1, Epstein-Barr-Virus) (Wang et al., 2006) sein. Bei den unter 60jährigen gilt Neuro-AIDS, verursacht durch eine HIV-1 Infektion, als am häufigsten auftretende Form der Demenz (McArthur et al., 1999). HAD ist ein unabhängiger signifikanter Risikofaktor, infolge einer AIDS-Erkrankung zu sterben (Ellis et al., 1997).

Rund 60% der HIV-infizierten Patienten sind von neurologischen und psychiatrischen Symptomen betroffen (Fischer-Smith and Rappaport, 2005). Unter den Begriffen AIDS Demenz-Komplex (AIDS dementia complex, ADC) beziehungsweise HIV-1 assoziierte Demenz (HIV-1 associated dementia, HAD) ist ein Krankheitsbild zusammengefasst, welches motorische und kognitive Fehlfunktionen wie Einschränkungen des Kurzzeitgedächtnisses, verminderte Konzentrationsfähigkeit, verlangsamte Hand- und Laufbewegungen, Schwäche in den Beinen umfasst (Janssen, 1992; Reger et al., 2002). Zusätzlich kommt es zu Verhaltensänderungen, Persönlichkeitsveränderungen, Apathie und Depressionen und zu opportunistischen Infektionen mit Kryptokokken, Cytomegaloviren, Epstein-Barr-Viren, Varicella-zoster-Viren und anderen (Almeida and Lautenschlager, 2005). Nach der Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (highly active antiretroviral therapy, HAART) im Jahre 1995 zur Behandlung von HIV/AIDS sank der Anteil von Patienten im AIDS-Endstadium, die HAD entwickelten von 30% auf 10% (Lawrence and Major, 2002). Aber auch diese Therapie bietet keinen kompletten Schutz vor HAD oder gar eine Heilung (Dore et al., 1997; Major et al., 2000). Auch wird es wahrscheinlich zu einem verstärkten Auftreten von Demenz bei AIDS-Patienten kommen, da sich die Überlebensdauer durch HAART deutlich erhöht hat (Lipton, 1997; Clifford, 2000). Des Weiteren tritt eine abgeschwächte Form der Erkrankung des ZNS, die minor cognitive motor disorder (MCMD), seit Einführung von HAART gehäuft in HIV-Patienten auf (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005). Dieser nicht so stark ausgeprägte Verlust an motorischen und kognitiven Funktionen wurde bei rund 30% der Infizierten festgestellt. Da HIV-Proteaseinhibitoren und viele der Nukleosidanalogue nur unzureichend ins Gehirn eindringen, erlaubt eine frühe Infektion des ZNS eine unabhängige Entwicklung über einen langen Zeitraum in einem geschützten Reservoir (Kaul et al., 2001).

Die Pathologie der HIV-1 Infektion des ZNS ist unter dem Begriff HIV-1 assoziierte Enzephalitis (HIV-1 associated encephalitis, HIVE) zusammengefasst. Sie ist

charakterisiert durch die Infiltration von Makrophagen ins Gehirn, die Ausbildung von Mikroglia-Knötchen und vielkernigen Riesenzellen, sowie die Aktivierung und Schädigung von Astrozyten (Ghafouri et al., 2006). Die pathologischen Merkmale sind assoziiert mit einer erhöhten Anzahl an Mikrogliazellen (Glass et al., 1995), dem Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ mRNA in Mikrogliazellen und Astrozyten (Wesselingh et al., 1997), dem Nachweis von Exotoxinen (Giulian et al., 1996), einer Reduzierung der Synapsen (Everall et al., 1999) und dem selektiven Verlust von Neuronen (Masliah et al., 1992). Der Verlust an Neuronen findet hauptsächlich im Hippocampus, den Basalganglien und damit verbunden im Nucleus Caudatus statt. In der weißen Substanz kommt es zur großflächigen Schädigung des Myelin bis zu den Axonen (Lawrence and Major, 2002).

1.2 Infektion und Replikation von HIV-1 im Zentralnervensystem

Der Eintritt von HIV ins Gehirn erfolgt in der frühen Phase der Infektion (Kramer-Hammerle et al., 2005) über infiltrierende Zellen. Diese infizierten Zellen exprimieren den HIV-1 Rezeptor CD4 auf ihrer Oberfläche und verschiedene, als Ko-Rezeptoren dienende Chemokinrezeptoren. Diese Rezeptoren ermöglichen die Anheftung des Virus an die Zielzelle, die Membranfusion und letztendlich den Eintritt in die Zelle (Zaitseva et al., 2003). HIV-1 spezifische CD4 positive T-Helferzellen und CD8 positive zytotoxische T-Lymphozyten konnten vier bis sechs Wochen nach Inokulation im Blut nachgewiesen werden (Lichterfeld et al., 2005). Die Blut-Hirn-Schranke (BBB), eine Schicht aus mikrovaskulären Endothelzellen, dient der Abtrennung des ZNS vom Blutkreislauf. Sie ist selektiv permeabel und reguliert den Austausch von Zellen und Substanzen zwischen Parenchym und Blut (Gendelman et al., 1994; Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005). Der Mechanismus, mit dem das Virus diese Barriere überwindet, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Das allgemein am meisten vertretene Modell ist die „Trojan Horse hypothesis“ (Peluso et al., 1985). Demzufolge sind im Blut zirkulierende, infizierte CD4 positive T-Zellen und Monozyten die Quelle der Infektion des Gehirns (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005). Andere Studien belegen die Expression von CD4 (Stins et al., 2003) und den Co-Rezeptoren CXCR4 und CCR5 auf den mikrovaskulären Endothelzellen (Mukhtar et al., 2002). Eine weitere Hypothese diskutiert die Migration des Virus

zwischen den Endothelzellen hindurch, oder durch Transzytose (Bomsel, 1997; Banks et al., 2001).

Die Chemokinrezeptoren CXCR4 auf Lymphozyten und CCR5 auf Monozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen sind entscheidend für den Viruseintritt in die Zelle (Moore et al., 2004). Weiterhin spielt die intrazelluläre Umgebung eine wichtige Rolle für die Virusreplikation von HIV-1 (Trkola, 2004). Im ZNS kann es zu einer produktiven Infektion von Zellen oder zu einer eingeschränkten Infektion kommen, bei der keine oder eine sehr niedrige Virusreplikation stattfindet (Gorry et al., 2003). Mikrogliazellen und perivaskuläre Makrophagen gelten als Hauptquellen einer produktiven HIV-1 Infektion im Gehirn (Kaul et al., 2001; Anderson et al., 2002). Mehrere Studien zeigen eine Infektion von Astrozyten mit HIV-1 durch die Anwesenheit von virusspezifischen Nukleinsäuren (Takahashi et al., 1996) und den Nachweis von HIV-Strukturproteinen (Brack-Werner, 1999), wobei es nicht zur Produktion von Viruspartikeln kommt. Die Infektion von Oligodendrozyten und Neuronen wird kontrovers diskutiert. In vitro Infektionen von humanen Oligodendrozyten deuten auf eine eingeschränkte Infektion mit HIV-1 hin (Albright et al., 1996). Es wird vermutet, dass der Nachweis infizierter Neuronen im ZNS durch den Verlust dieser Population erschwert ist (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005), mit Studien an Primärkulturen gelang jedoch der Nachweis einer eingeschränkten Infektion (Ensoli et al., 1995).

Als Hauptursache für HAD wird die Aktivierung von Zellen monozytären Ursprungs, Makrophagen und Mikroglia, und die sich anschließende Sezernierung von Toxinen durch diese Zellen vermutet, die zur Schädigung von Neuronen und Astrozyten führt (Kaul et al., 2001).

1.3 Mikrogliazellen

Mikrogliazellen sind immunkompetente Zellen im Gehirn, deren Hauptfunktion in der Reaktion auf jegliche Form von Veränderung im lokalen Milieu liegt. Circa 15% der Zellen im ZNS sind Mikrogliazellen (Streit and Kincaid-Colton, 1995). Dabei zeigten Studien zur lokalen Verteilung, dass der Anteil von 0,5 bis 16,6% in verschiedenen Bereichen des Parenchyms variiert (Mittelbronn et al., 2001). Die Mikrogliapopulation stammt von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab, die in zwei Schüben in das Gehirn migrieren. Die ersten während der fötalen Periode, die zweiten wenige Tage

nach der Geburt bevor sich die BBB ausbildet. Nur zwei Subpopulationen, die perivaskulären und die submeningealen Mikrogliazellen, werden auch nach Ausbildung der BBB durch infiltrierende Monozyten ergänzt (Hickey and Kimura, 1988; Williams et al., 2001). Die Mikrogliazellen im Parenchym durchlaufen drei Phasen, welche durch ihre Formveränderungen reflektiert werden. Die amöboide Phase ist im Fötus nachweisbar. Die ramifizierte (ruhende) Phase ist typisch für die Grundstruktur des ZNS, gefolgt von der Wiederherstellung der amöboiden Form und der Motilität nach Aktivierung (del Rio-Hortega, 1932).

Die Mikrogliazellen werden durch die HIV-Infektion an sich, virale Proteine, Immunstimulation einer gleichzeitigen opportunistischen Infektion oder andere Faktoren aktiviert (Gendelman et al., 1994). Mehrere Studien haben belegt, dass die HIV-1 Infektion von Mikrogliazellen im Parenchym teilweise sehr ausgedehnt ist. Sie kann aber auch nur auf den perivaskulären Raum beschränkt sein (Morris et al., 1999). Es ist noch unklar ob es sich bei den HIV-1 immunpositiven Mikrogliazellen um infiltrierende infizierte Zellen aus dem Blut handelt oder um eine Folge der Langzeitinfektion des ZNS. In vitro Studien konnten die HIV-1 Replikation in Mikroglia-Primärkulturen von Erwachsenen (Albright et al., 2000), Kindern (Brinkmann et al., 1992) und fötalem Gehirn (Sundar et al., 1995; McCarthy et al., 1998) bestätigen. Studien zum Verlauf einer HIV-1 Infektion an Primärkulturen von humanen Mikrogliazellen zeigten eine frühere Etablierung einer produktiven Infektion durch CCR5-trope Virusstämme im Vergleich zu CXCR4-tropen Virusstämmen (Ioannidis et al., 1995). Ähnlich zu den Makrophagen exprimieren Mikrogliazellen CD4, bei Rhesusaffen nicht. Neben dem Ko-Rezeptor CCR5 (Jordan et al., 1991; Vallat et al., 1998) werden als weitere Chemokinrezeptoren CCR3, CCR2b, CCR8, CXCR6 und CX3CR exprimiert, die vom Virus aber weniger effektiv genutzt werden (Albright et al., 1999; Martin-Garcia et al., 2002).

Der Anteil an Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren steigt im Gehirn von HIV-Patienten besonders in Bereichen mit neurologischen Veränderungen an. Dort tragen sie zur Formation von Mikroglia-Knötchen und zur Infiltration inflammatorischer Zellen bei. Die produktive Infektion von Mikrogliazellen führt häufig zur Ausbildung von Synzytien (Watkins et al., 1990). Bei den CD4 exprimierenden vielkernigen Riesenzellen, ein Merkmal von HIV, handelt es sich vermutlich um Fusionsprodukte von Mikrogliazellen untereinander oder mit infizierten Monozyten,

die nach dem Eintritt in das Gehirn zu Makrophagen ausdifferenzierten (Dickson, 1986).

1.4 Mechanismen der neurodegenerativen Prozesse

In Ermangelung einer signifikanten neuronalen Infektion müssen verschiedene indirekte Mechanismen, ausgelöst durch infizierte Mikrogliazellen, perivaskuläre Makrophagen und eventuell Astrozyten, aber auch durch neurotoxische HIV-1 Proteine, als Ursache für die ausgedehnte neuropathologische Schädigung nach Infektion des Gehirns mit HIV-1 in Betracht gezogen werden.

In direktem Zusammenhang mit dem HI-Virus kann die Interaktion der Neuronen mit viralen Proteinen wie gp120, Vpr (viral protein R) und Tat (transactivator of transcription) stehen, welche von infizierten Zellen freigesetzt wurden (Ghafouri et al., 2006). Das Virusprotein gp120 ist Bestandteil des HIV-1 Hüllproteins Env, gp160, dem in mehreren Studien ein toxischer Effekt auf Neuronen nachgewiesen wurde (Dreyer et al., 1990; Kaul and Lipton, 1999). Dopaminerge Neuronen scheinen besonders anfällig auf das in großen Mengen von infizierten Zellen freigesetzte Virusprotein zu reagieren (Bennett et al., 1995). Neurodegenerative Prozesse können direkt durch Interaktion von gp120 mit dem NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor oder indirekt durch Interaktion mit Chemokin-Rezeptoren induziert werden (Barks et al., 1997; Corasaniti et al., 2000). Als Beispiel sei CXCR4 genannt, welcher in der gp120 vermittelten Neurotoxizität direkt durch Aktivierung neuronaler Rezeptoren oder indirekt durch Stimulation von Gliazellen wirkt, die als Konsequenz mehr neurotoxische Faktoren freisetzen. Weiterhin hat gp120 einen Einfluss auf die neurodegenerativen Prozesse, da es Mikrogliazellen, Makrophagen, und Astrozyten aktiviert (Lipton et al., 1995; Kaul and Lipton, 1999).

Auch Vpr könnte an verschiedenen Stellen als Auslöser neurodegenerativer Prozesse wirken. Durch Aktivierung von Caspase-8 (Pomerantz, 2004) und BRCA-1, sowie die Hochregulierung von GADD45a (Andersen et al., 2005) kommt es zur Apoptose der betroffenen Zellen. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass Vpr einen Stillstand in der G2/M Phase des Zellzyklus induziert, was zum Zelltod führt (Stewart et al., 2000). Weitere Studien zeigten Interaktionen zwischen Vpr und den Mitochondrien auf. Eine Überexpression von Vpr führt zur Dislokation von HAX-

1, einem antiapoptotischen mitochondrialen Protein, was zur Destabilisierung der Mitochondrien und zu Apoptose führt (Yedavalli et al., 2005).

Sezerniertes Tat kann direkt oder indirekt zu Schädigung der Neuronen beitragen (Nath, 2002). Unter anderem löst es durch Aktivierung von Caspasen apoptotische Prozesse aus (Nath, 2002; Song et al., 2003). Des Weiteren wird die Expression von Claudin-1 und Claudin-5 (tight junction-Proteine) in den cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen beeinflusst (Toborek et al., 2005), was zur Zerstörung der BBB und somit dem unkontrollierten Einströmen inflammatorischer Zellen führt (Andras et al., 2003; Toborek et al., 2005). Weiterhin ist Tat in die inflammatorischen Prozesse involviert, da es in Monozyten und Makrophagen eine verstärkte $TNF\alpha$ und IL-1 Produktion verursacht (Nath, 2002).

Die HIV-Neuropathogenese ist verbunden mit inflammatorischen Prozessen als Folge veränderter Sekretionsfunktionen von Mikrogliazellen und Makrophagen im Gehirn. Die Freisetzung inflammatorischer Zytokine, reaktiver Sauerstoffspezies und anderer Neurotoxine führt zur Zerstörung normaler zellulärer Funktionen, modifizierten Einsätzen der Neurotransmitter, Leukoencephalopathie und neuronaler Apoptose (Panek and Benveniste, 1995; Boven et al., 1999).

Stickstoffmonoxid (NO) wird in Makrophagen, aber auch in Endothelzellen und Neuronen synthetisiert, ist neurotoxisch und im Gehirn von HAD-Patienten konnten große Mengen induzierbarer NO-Synthase nachgewiesen werden (Adamson et al., 1996). $TNF\alpha$ wird von HIV-1 infizierten Mikrogliazellen, Makrophagen und vereinzelt auch von Oligodendrozyten freigesetzt (Wilt et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die $TNF\alpha$ Transkription im Gehirn von HAD-Patienten erhöht war im Vergleich zu AIDS-Patienten ohne neurologische Symptome (Wesselingh et al., 1997). Weiterhin bestätigen Versuche in vivo die Schädigung der BBB durch $TNF\alpha$ (Fiala et al., 1996). In AIDS-Patienten sind aber nicht nur die Mengen der proinflammatorischen Zytokine ($TNF\alpha$, IL-1, $IFN\gamma$) und löslicher Zytokin-Rezeptoren erhöht, sondern die Zytokinproduktion korreliert auch mit der Ausprägung der Neuropathologie (Yoshioka et al., 1995; Griffin, 1997).

Die Infektion von Mikrogliazellen und Makrophagen ist möglicherweise nicht ausreichend, um die neurodegenerativen Prozesse zu initiieren (Gartner, 2000). Es wird vermutet, dass Faktoren die mit einem fortschreitenden Krankheitsverlauf in der Peripherie assoziiert sind, auch Ausbruch und Fortschreiten der Demenz fördern.

Zum Beispiel führt die Aktivierung zirkulierender Monozyten zur Expression von CD16 und CD69. Diese Oberflächenantigene wiederum ermöglichen die Adhäsion an das Endothel der ZNS-Mikrovaskulatur, was zu einer verstärkten Transmigration führt (Gartner, 2000). Weiterhin werden von aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten Chemokine wie MCP-1 verstärkt sezerniert, welche die Migration von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut regulieren (Asensio and Campbell, 1999). Zusätzlich bestätigen histologische Studien die Infiltration von Lymphozyten und Monozyten (Kalams and Walker, 1995; Prospero-Garcia et al., 1996). Die pathophysiologische Relevanz der einwandernden Lymphozyten für den Verlauf von HAD ist noch nicht geklärt.

1.5 APOBEC3G

Als Reaktion nach Infektion erfolgt unter anderem die Aktivierung viraler Restriktionsfaktoren, die eine wichtige Komponente der angeborenen Immunantwort darstellen. Dabei sind Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) und verwandte Cytidin-Deaminasen als eine Klasse von Restriktionsfaktoren, sowie die Aktivierung von HIV-1 Vif (virion infectivity factor) als spezifischer APOBEC3G Antagonist, besonders in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt (Chiu and Greene, 2008). APOBEC3G hemmt die retrovirale Replikation (Sheehy et al., 2002). Das Protein wird im Replikationszyklus in die Virionen eingebaut und induziert nach erneuter Infektion Guanosen zu Adenosin Hypermutationen in der viralen DNA, die während der Reversen Transkription synthetisiert wird (Harris et al., 2003). Zusätzlich wurden von der Cytidin-Deaminierung unabhängige antivirale Mechanismen für APOBEC3G aufgezeigt (Bishop et al., 2006). Das vom Virus synthetisierte Vif-Protein beschleunigt die proteosomale Degradation von APOBEC3G, was einen reduzierten Einbau von APOBEC3G in die Virionen zur Folge hat (Stopak et al., 2003). Die Produktion von APOBEC3G in Lymphozyten und Monozyten wurde bereits nachgewiesen (Mariani et al., 2003). Ebenso konnten Guanosen zu Adenosin Hypermutationen im Gehirn während HIV-1 Infektion nachgewiesen werden (Simmonds et al., 1990; Monken et al., 1995; Liu et al., 2000). Bisher wurde weder die Rolle dieses intrinsischen Faktors im Gehirn aufgeklärt, noch wurde überzeugend dargestellt welche Zellen im Gehirn APOBEC3G produzieren (Depboylu et al., 2007).

1.6 SIV-Rhesusaffen Tiermodell

Als Auslöser für die Erkrankung an AIDS konnte ein 1983 isoliertes Retrovirus, HIV-1, bestimmt werden (Barre-Sinoussi et al., 1983). Zwei Jahre später wurde bei mehreren immundefizienten Makaken einer amerikanischen Zuchtkolonie ein T-Zell tropes Retrovirus isoliert, dessen Morphologie, Wachstums-Charakteristika und Wirkungsweise der von HIV-1 entsprechen (Daniel et al., 1985). Durch Übertragung von Lentiviren einer anderen Primatenspezies, war es zur Erkrankung gekommen. Bei den asiatischen Primatenspezies, wie den Makaken, kommt eine natürliche Infektion mit Immundefizienzviren nicht vor. Das Virus-Isolat wurde dementsprechend als SIV_{mac} (simian immunodeficiency virus of macaques) bezeichnet (Coffin et al., 1986). HIV und SIV gehören zur Gruppe der komplexen Retroviren, die der Gattung der Lentiviridae zugeordnet werden (Murphy FA, 1990).

Die Infektion von Rhesusaffen mit SIV ist das am häufigsten gebrauchte Tiermodell zum Studium der HIV-Infektion im Menschen, da Virus und Wirt eine große genetische Übereinstimmung aufweisen und die Erkrankung alle Aspekte von AIDS widerspiegelt (Persidsky et al., 1995; Burudi and Fox, 2001). Der einzige signifikante Unterschied zwischen diesen lentiviral induzierten Syndromen besteht im deutlich verkürzten Zeitverlauf von ein paar Monaten bis wenige Jahre bei den SIV infizierten Rhesusaffen (Letvin and King, 1990). Beide Viren haben CD4 positive T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen als Hauptzielzellen für eine Infektion (Desrosiers, 1990).

Die SIV-Infektion von Rhesusaffen ist ein sehr gutes Modell, um die Pathogenese von HIV induzierten Erkrankungen des ZNS zu untersuchen. Für HIV und SIV konnte nachgewiesen werden, dass eine Infektion des Gehirns sehr zeitig nach Infektion in der Peripherie erfolgt (Chakrabarti et al., 1991; Sharer et al., 1991). Auch bleibt für SIV-Stämme mit Tropismus für Monozyten/Makrophagen die Korrelation mit verstärkter Inflammation und degenerativen Veränderungen im Gehirn bestehen. Neuropathologische Veränderungen konnten in 30 bis 60% der SIV infizierten Makaken entdeckt werden (Lackner, 1994). Rhesusaffen infiziert mit SIV_{mac} entwickeln motorische und kognitive Defizite, ähnlich denen in HIV-1 infizierten Patienten (Murray et al., 1992). Entsprechend wurden auch Übereinstimmungen bei den pathologischen Veränderungen im ZNS der Makaken gefunden. Es wurden perivaskuläre, Virus infizierte Makrophagen, parenchymale Mikroglia-Nodule und

vielkernige Riesenzellen unter anderem in der zentralen weißen Substanz und den Basalganglien identifiziert (Sharer, 1994).

Die Nutzung eines Tiermodells erlaubt Studien von lentiviralen Erkrankungen schon in der frühen asymptomatischen Phase der Infektion, sowie den Fortgang bis hin zur manifesten neurologischen Erkrankung. Die Tiere können mit gut charakterisierten Virusstämmen zu definierten Zeitpunkten inokuliert werden, um spezifische virale Gene, die für die Entwicklung eines Krankheitsgeschehens im ZNS relevant sind, zu identifizieren. Weiterhin ermöglicht es die wiederholte Probenentnahme verschiedener Körperflüssigkeiten, sowie die Analyse von Gewebematerial aus verschiedenen Krankheitsstadien (Sopper et al., 2002). Von Vorteil ist auch die Kreuzreaktivität vieler humaner Antikörper, die sich somit problemlos im Tiermodell verwenden lassen.

1.7 Ziel der Arbeit

Die Mechanismen, die zur HIV-Demenz und anderen neurologischen Ausfallerscheinungen führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Da die Mikrogliazellen als immunkompetente Zellen des ZNS und gleichzeitige Zielzellen einer produktiven HIV-1 Infektion gelten, ist eine genauere Charakterisierung dieser Zellpopulation das Ziel der Arbeit.

Zur Definition des Phänotyps der Mikroglia soll eine Untersuchung der Expression verschiedener Oberflächenantigene auf den Zellen mit Hilfe der polychromatischen Durchflusszytometrie erfolgen. Damit sollen Veränderungen im Aktivierungszustand und der funktionellen Eigenschaften der Mikrogliazellen im Laufe der SIV-Infektion bestimmt und im Kontext der Immunantwort auf die Infektion analysiert werden.

Parallel dazu sollen intrazelluläre Mechanismen, welche die Replikation von HIV-1 inhibieren könnten, untersucht werden. Zu diesem Zweck wird die Expression Interferon induzierter Gene und des antiretroviralen Restriktionsfaktors APOBEC3G mittels quantitativer PCR bestimmt werden.

Neben den im ZNS residenten Mikrogliazellen könnten infiltrierende Makrophagen und Lymphozytenpopulationen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der HIV-Demenz spielen. Eine Untersuchung dieser Zellpopulationen soll ergänzend stattfinden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agilent2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
CO ₂ -Inkubator HeraCell240	Heraeus
Durchflussszytometer BD LSRII	BD Biosciences
Inversmikroskop Axiovert25	Carl Zeiss AG
Kühl-/Gefrierkombination	Liebherr
Laminarbank	HeraSafe Heraeus
Mixer Mill MM300 (Tissue Lyser)	Qiagen
NanoDrop ND-1000 Photospectrometer	peqLab Biotechnologie GmbH
Pipetten	Eppendorf AG
Pipettierhilfe (pipetus-akku)	Hirschmann
7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Thermal Cycler (My Cycler)	Biorad
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf AG
Ultra low temperature Freezer	New Brunswick Scientific
Vortex	Laborbedarf Schütt
Waagen	Satorius AG
Wasserbad	GFL
Zählkammer (Neubauer)	Roth
Zentrifuge Multifuge 3SR	Heraeus

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

BD Falcon 5ml Rundboden Rörchen	BD Biosciences
BD Microlance 3 (0,9mm x 40mm)	BD Biosciences
BD Vacutainer EDTA oder Zitrat	BD Biosciences
CryoTubes 1,8ml	Nunc
Einmalspritze (Soft-Ject) 1ml	HenkeSassWolf
Einmalspritze (Norm-Ject) 20ml	HenkeSassWolf
Kompensationsbeads	Spherotech
Leucosep-Rörchen	BD Biosciences
MicroAmp (optical tubes/optical caps)	Applied Biosystems
PCR Softtubes 0,2ml	Biozym Scientific
Petrischalen (Ø 145mm)	Greiner
Pinzetten	Roth
Reaktionsgefäße 0,5 und 1,5ml	Greiner
Rörchen 15ml (Cellstar)	Greiner
Rörchen 50ml (Cellstar)	Greiner
Rundsieb (Rotilabo)	Roth
Serologische Pipetten 5ml, 10ml und 25ml	Sarstedt
Zellkulturflasche 75cm ² (Cellstar)	Sarstedt
Zellkulturplatten 12well und 24well	Greiner

2.1.3 Chemikalien

CaCl ₂	Merck
Ethanol ≥99,8%	Roth
Formaldehyd 37%	Roth
Heparin-Natrium (25000 I.E./5ml)	Ratiopharm
KCl	Roth
KH ₂ PO ₄	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck
MgCl ₂	Merck
Natriumazid	Sigma
NaCl	Roth
Na ₂ HPO ₄	Merck
Trypanblau	Aldrich

2.1.4 Medien, Puffer, Enzyme

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
DNase 100mg (2000U/mg)	Roche
FACS Lösungen (FACS-Flow, FACS-Rinse, FACS-Safe)	BD Biosciences
Ficoll (Lymphocyte Separation Medium)	PAA
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAN Biotech
Kollagenase NB8 Broad Range (1,08U/mg)	Serva
Penicillin (10000U/ml)	PAN Biotech
Percoll	Amersham Biosciences
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)1640 mit L-Glutamin	PAN Biotech
Streptomycin (10mg/ml)	PAN Biotech
Trypsin/EDTA	PAN Biotech
DNase/Kollagenase Puffer (DK-Puffer)	42mM MgCl ₂ , 23mM CaCl ₂ , 50mM KCl, 153mM NaCl in H ₂ Odest
FACS Lyse-Puffer	BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences) 1:10 verdünnt in H ₂ Odest
FACS Puffer	PBS supplementiert 0,5% Bovinem Serumalbumin (BSA) und 0,03% Natriumazid

Kulturmedium	RPMI 1640 supplementiert mit hitzeinaktiviertem 10% FBS (30min bei 56°C), 1% Penicillin, 1% Streptomycin
NaCL-Lösung	1,5M
Perfusionslösung	RPMI supplementiert mit hitzeinaktiviertem 3% FBS (30min bei 56°C)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	120mM NaCl, 17mM Na ₂ HPO ₄ , 3mM KH ₂ PO ₄ pH7.2
Trypanblaulösung	PBS mit 0,5% [w/v] Trypanblau

2.1.5 Kommerzielle RNA Isolations- und PCR-Kits

RNAlater RNA stabilization reagent	Qiagen
RNeasy Plus Mini	Qiagen
RNeasy Midi	Qiagen
RNase free DNase Set	Qiagen
RNA6000 NanoLabChip Kit	Agilent Technologies
Stainless steel beads 5mm	Qiagen
SuperScript First Strand Synthesis System	Invitrogen
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen
Quantitect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
QuantiTect Probe RT PCR Kit	Qiagen

2.1.6 Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe für die durchflusszytometrischen Analysen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Die an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörper zur Untersuchung von Oberflächenantigenen sind, anhand der Differenzierungscluster (cluster of differentiation – CD) sortiert, in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tab. 2.1: Übersicht verwendeter Fluoreszenzfarbstoffe, der zur Messung im Durchflusszytometer verwendeten Laser und Filter, sowie der Absorptions- und Emissionsmaxima

Fluoreszenzfarbstoff	Laser [nm]	Langpassfilter ¹ [nm]	Bandpassfilter ² [nm]	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Alexa 405	405		440/40	401	421
Alexa 700	635	685	725/50	696	720
AmCyan	405	470	510/40	460	489
APC (Allophycocyanin)	635		660/20	650	660
APC-Cy7	635	750	780/60	651	779
ECD (Texas Red -PE)	488	600	610/20	496	615
FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)	488	505	530/30	495	519
Pacific Blue	405		440/40	403	455
Pacific Orange	405	470	525/50	402	551
PE (Phycoerythrin)	488	550	575/26	408/565	578
PE-Cy7	488	735	780/60	480/565	785
PerCP-Cy5.5 (Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex)	488	635	695/20	482	695

¹ Langpassfilter ermöglichen die Transmission von Licht längerer Wellenlänge, als auf dem Filter angegeben.

² Bandpassfilter ermöglichen die Transmission von Licht angegebener Wellenlänge um den Mittelwert.

Tab. 2.2: Übersicht verwendeter muriner anti-human Antikörper, der Fluoreszenzfarbstoffe an die sie gekoppelt sind und Bezugsquellen

mAK-Spezifität	Ig- (Sub) Klasse	Klon	Fluorochrom	Quelle
CD1c	IgG2a	AD5-8E7	APC	5
CD3	IgG1 I	SP34-2	Alexa 700	1
CD4	IgG1 I	L200	PerCP-Cy5.5	1
CD4	IgG1 I	SK3	APC-Cy7	1
CD4	IgG1 I	SK3	Alexa 405	1

mAK-Spezifität	Ig- (Sub) Klasse	Klon	Fluorochrom	Quelle
CD8	IgG2a	3B5	PO	3
CD11a	IgG1 I	HI 111	APC	1
CD11b	IgG2a	D12	PE	1
CD11b	IgG1 I	ICRF44	Pacific Blue	1
CD11c	IgG2b I	S-HCL-3	PE	1
CD14	IgG2a I	M5E2	PerCP-Cy5.5	1
CD16	IgG1 I	3GB	APC-Cy7	1
CD20	IgG1 I	L27	Pe-Cy7	1
CD21	IgG1	B-IY4	FITC	7
CD22	IgG2b I	S-HCL-1	APC	1
CD23	IgG1 I	9P25	ECD	2
CD25	IgG1 I	M-A251	Pe-Cy7	1
CD28	IgG1 I	CD28.2	FITC	1
CD28	IgG1 I	L293	PerCP-Cy5.5	1
CD29	IgG1 I	4B4LDC9LDH9	FITC	2
CD31	IgG1 I	WM59	PE	1
CD40	IgG1 I	5C3	FITC	1
CD45	IgG1	MB4-6D6	FITC	5
CD45	IgG1	MB4-6D6	APC	5
CD45RA	IgG1 I	2H4LDH11LDB9	ECD	2
CD45RB	IgG1	PD7/26	FITC	4
CD49d	IgG1 I	9F10	PE	1
CD56	IgG2b I	NCAM 16.2	FITC	1
CD62L	IgG2a I	SK11	PE	1
CD63	IgG1 I	H5C6	FITC	1
CD64	IgG1	22	FITC	2
CD69	IgG2b I	TP1.55.3	ECD	2
CD69	IgG1 I	L7B	APC	1
CD80	IgG1 I	L307.4	PE	1
CD83	IgG1	HB15e	FITC	3
CD86	IgG1 I	B70/B72	PE	1
CD86	IgG1 I	2331 (FUN-1)	APC	1
CD95	IgG1 I	DX2	Biotin	1
CD95	IgG1 I	DX2	APC	1
CD103	IgG1	2G5	FITC	2
CD123	IgG2a I	7G3	PE	1
CD127	IgG1 I	hIL-7R-M21	PE	1
CD163	IgG1 I	GHI/61	PE	1
CD183	IgG1 I	1C6/CXCR3	PE	1
CD195	IgG2a I	3A9	APC	1
CD197	IgG2a I	3D12	Pe-Cy7	1
b7	IgG2a I	FIB 504	APC	1
gd	IgG1	5A6.E9	FITC	3
NKG2a	IgG2b I	Z199	PE	2
HLA-DR	IgG2a I	L243	PE	1
HLA-DR	IgG2a I	L243	APC-Cy7	1
PD1	IgG	-	Biotin	6
IL15	IgG	-	Biotin	6
Streptavidin			Pe-Cy7	1

1 BD Biosciences Pharmingen

2 Beckman Coulter

3 Caltag

4 DakoCytomation

5 Miltenyi

6 R&D Systems

7 IQProducts

2.1.7 Software

Neben den Microsoft Office Programmen wurden für die Datenanalyse, Bearbeitung und Darstellung folgende Programme genutzt:

2100 Bioanalyzer Expert Software	Agilent Technologies
Endnote, Version 8.0	Thomson Scientific
BD FACSDiva Software	Becton Dickinson
FlowJo, Version 6.0 bis 8.7.1	Tree Star Inc.
Graph Pad Prism, Version 4	Graph Pad Software Inc.
7500 Sequence Detection System	Applied Biosystems

2.2 Versuchstiere, Viren

Die Untersuchungen wurden an adulten Affen der Art *Macaca mulatta* durchgeführt. Die Rhesusaffen, indischer oder chinesischer Subspezies, stammen aus der Zucht des Deutschen Primatenzentrums oder wurden von Züchtern aus England oder China importiert. Alle Tiere wurden am Deutschen Primatenzentrum gehalten und von Veterinären und Tierpflegern der Abteilung Virologie und Immunologie betreut, gemäß den Richtlinien des Deutschen Primatenzentrums und des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 in der aktuellen Fassung.

Für die Infektion der Tiere wurden die SIV Klone SIV_{mac}239 (Kestler et al., 1990), tonsilläre Applikation, und SIV_{mac}251 (Le Grand et al., 1992), intravenös, verwendet.

2.2.1 Entnahme von Vollblut und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) im experimentellen Zeitverlauf

Die Abnahme des Vollblutes erforderte eine Sedierung der Tiere mit 10mg Ketamin pro Kilogramm Körpergewicht, intramuskulär injiziert. Durch Punktion der Vena femoralis mittels BD Vacutainer-Blutentnahmeröhrchen, versetzt mit EDTA oder Zitrat zur Vermeidung der Koagulation wurde das Blut entnommen.

Die CSF wurde durch Punktion zwischen dem Hinterhauptsknochen und dem ersten Halswirbel gewonnen und für den Zeitraum bis zur Weiterverarbeitung in 15ml

Röhrchen auf Eis gelagert. Die Subokzipitalpunktion erfolgte unter Narkose. Dafür wurde den Tieren eine Kombination aus 2mg Xylazin, 10mg Ketamin und 0,02mg Atropin pro Kilogramm Körpergewicht intramuskulär injiziert. Die Arbeiten führten Veterinäre und Tierpfleger der Abteilung Virologie und Immunologie des Deutschen Primatenzentrums durch.

2.2.2 Entnahme von Vollblut, Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) und zentralnervösem Gewebe zum Zeitpunkt der Sektion

Am Sektionstag bekamen die Tiere für eine tiefere Anästhesie eine Kombination aus 2mg Xylazin, 10mg Ketamin und 0,02mg Atropin pro Kilogramm Körpergewicht intramuskulär injiziert.

Die CSF wurde durch Subokzipitalpunktion gewonnen und für den Zeitraum bis zur Weiterverarbeitung in 15ml Röhrchen auf Eis gelagert.

Nach Öffnung des Brustraumes wurde das Gehirn, um Kontaminationen mit Zellen des peripheren Blutes zu vermeiden, perfundiert. Dies erfolgte über einen in die Aorta ascendens eingeführten Katheter, so dass unter mässigem Druck circa zwei Liter Perfusionslösung über die Arteria carotis in die Kopfgefäße eingeleitet und über einen Entlastungsschnitt der abführenden Vene steril abgesaugt wurden.

Zuvor erfolgte die Abnahme des Vollblutes aus der Aorta abdominalis infrarenalis in eine 250ml Zellkulturflasche versetzt mit Heparin. In einigen Fällen wurde das Vollblut auch am Sektionstag durch Punktion der Vena femoralis mittels BD Vacutainer-Blutentnahmeröhrchen versetzt mit EDTA oder Zitrat gewonnen.

Nach Beendigung der Perfusion wurde die Schädelkalotte freipräpariert, steril mit einer elektrischen Säge geöffnet und das Gehirn entnommen. Es wurden Kleinhirn und Hirnstamm auf Höhe des Mittelhirns vom Großhirn abgetrennt. Nach Halbierung von Kleinhirn und Hirnstamm, sagittal, wurden die linke Kleinhirnhälfte und ein basaler Teil der rechten Kleinhirnhälfte abgetrennt. Das Großhirn wurde mittels Durchtrennung des Balkens in der Saggitalebene in zwei Hälften geteilt. Von der rechten Großhirnhemisphäre wurden äußere Anteile des Frontal- und des Occipitalpols entfernt. Von der linken Großhirnhemisphäre wurden die beiden Frontal- und Occipitalpole exakt am Balkenende vom mittleren Teil abgetrennt. Zusätzlich wurden noch Rindenbereiche parietal und temporolateral entfernt. Bis

zur Weiterverarbeitung wurden die Gewebestücke in 50ml Röhrchen, gefüllt mit Kulturmedium, auf Eis gelagert.

Für die Isolation von RNA aus Gehirngewebe wurde entweder ein circa 1cm x 0.5cm x 0.5cm grosses Stück vom präfrontalen Kortex für die sofortige Aufarbeitung eisgekühlt oder in 1,5ml RNAlater gegeben und, nach 24 Stunden Einwirkzeit bei 4°C, bis zur Aufarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Sämtliche Arbeiten haben Veterinäre der Abteilung Virologie und Immunologie und Veterinäre und technische Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Pathologie der Primaten, Abteilung Infektionspathologie des Deutschen Primatenzentrums durchgeführt.

2.3 Methoden

2.3.1 Isolierung von Leukozyten aus peripherem Blut

Die Auftrennung des Blutes erfolgte über einen Ficollgradienten. In einem Leucosep-Röhrchen wurden 3ml Ficoll (Dichte 1,077g/ml) vorgelegt und bei 300g für 10 min unter die Leucosep-Membran zentrifugiert. Im Anschluss wurde mit der doppelten Menge unverdünntem Blut überschichtet und bei 1000g und Raumtemperatur für 20 min zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde vorsichtig abgenommen und teilweise bei -20°C eingefroren. In der Interphase zwischen Plasma und Ficoll befanden sich die Lymphozyten und Makrophagen. Diese wurden vorsichtig abpipettiert und in 10ml PBS aufgenommen. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 300g und 4°C wurden die Zellen in 3ml Kulturmedium suspendiert. Eine Zählprobe wurde zur Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Dieser Farbstoff akkumuliert nur in toten Zellen. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde der Anteil an lebenden Zellen ermittelt. Dementsprechend wurde eine lebend Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.3.2 Aufarbeitung der Cerebrospinalflüssigkeit

Der Liquor cerebrospinalis wurde bei 300g und 4°C für 10min zentrifugiert. Zuvor erfolgte eine mikroskopische Begutachtung mit Auszählung der Zellen zur Bewertung der Kontamination durch Blut. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das

Zellpellet in 50µl des vorher abgenommenen Überstandes suspendiert. Die Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Vom Überstand wurde erst das Volumen bestimmt, dann portioniert und bei -80°C eingefroren.

2.3.3 Isolierung von Mikrogliazellen und anderen Leukozyten aus Gehirngewebe

Für die Aufarbeitung des Gehirngewebes zur Gewinnung von Mikrogliazellen wurde eine bekannte Methode (Sedgwick et al., 1991) am Institut etabliert und modifiziert.

Die erhaltenen Gewebstücke wurden in einer großen Petrischale gesammelt und nach Entfernung des Mediums gewogen. Auf Eis und unter Zugabe von Kulturmedium wurden die Meningen mittels zweier Greifpinzetten entfernt und anschließend das Gewebe mit dem Stempel einer 20ml Plastikspritze durch ein Stahlsieb gerieben, wobei unterstützend mit eisgekühltem Kulturmedium gespült wurde. Die so gewonnene Suspension wurde bei 400g für zehn Minuten zentrifugiert um das überschüssige Medium zu entfernen. Nach Zugabe von 400U DNase und 0.5U Kollagenase, versetzt in 1ml DK-Puffer pro Gramm Gewebe, fand ein einstündiger enzymatischer Verdau bei 37°C unter leichtem Schwenken statt.

Der erste Dichtegradientenzentrifugationsschritt diente zur Abtrennung des leichteren Myelin und einer vorläufigen Anreicherung von Mikrogliazellen auf einem Percollkissen mit einer Dichte von 1,088g/ml. In sechs 50ml Röhren wurden parallel je 39,5ml Zellsuspension, eventuell durch Zugabe von Kulturmedium, diesem Volumen angepasst, mit soviel Percoll der Dichte 1,124g/ml versetzt, dass sich eine Dichte von 1,033g/ml ergab und anschließend mit 5ml Percoll der Dichte 1,088g/ml unterschichtet. Die Zentrifugationsbedingungen waren 1200g für 20min, nach Erreichen der 1200g, bei minimaler Beschleunigungs- und Bremseinstellung, und 4°C . Nach vorsichtigem Abpipettieren der Myelinschicht wurden von der Grenzschicht maximal 15ml abgenommen und in einem 50ml Röhren mit Kulturmedium aufgefüllt, um das Percoll so stark zu verdünnen, dass die Zellen durch Zentrifugation bei 400g für 10min pelletierten.

Die erhaltenen Zellen der ersten Dichtegradientenzentrifugation wurden in 10ml Kulturmedium vereint und für einen zweiten Dichtegradientenzentrifugationsschritt verwendet. Dieser erhöhte die Reinheit der Mikrogliazellen, wobei hauptsächlich Fragmente toter Zellen und Myelinreste entfernt wurden. Es wurden zwei

Hauptgradienten folgender Zusammensetzung, 15 ml Percoll der Dichte 1,088g/ml, überschichtet mit 25ml Percoll der Dichte 1,050g/ml, überschichtet mit 5ml Zellsuspension, erneut bei 1200g für 20min, nach Erreichen der 1200g, bei minimaler Beschleunigungs- und Bremseneinstellung und 4°C zentrifugiert. Von der 1,088g/ml / 1,050g/ml Percoll-Grenzschicht wurden erneut maximal 15ml abgenommen, in einem 50ml Röhrchen mit Kulturmedium aufgefüllt und durch Zentrifugation bei 400g für 10min die Zellen pelletiert. Die isolierten Zellen wurden in 5ml Kulturmedium vereint.

Das verwendete Percoll wurde mit 1,5M NaCl-Lösung im Verhältnis 10:1 versetzt und besaß dann eine Dichte von 1,124g/ml. Die Berechnung der Percolldichten für die Gradienten erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Vol\% Percoll (1,124g/ml)} = \frac{D \text{ (g/ml)} - 1,005}{1,194} \times 1000$$

Tab. 2.3: Übersicht verwendeter Percolldichten und entsprechender Mischungsverhältnisse

Dichte in g/ml	isotonisches Percoll (1,124g/ml) in ml	RPMI (+FKS und P/S) in ml
1,088	69,5	30,5
1,050	37,7	62,3

Nach Auszählung der lebenden Mikrogliazellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop, mittels Trypanblaufärbung, wurde eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

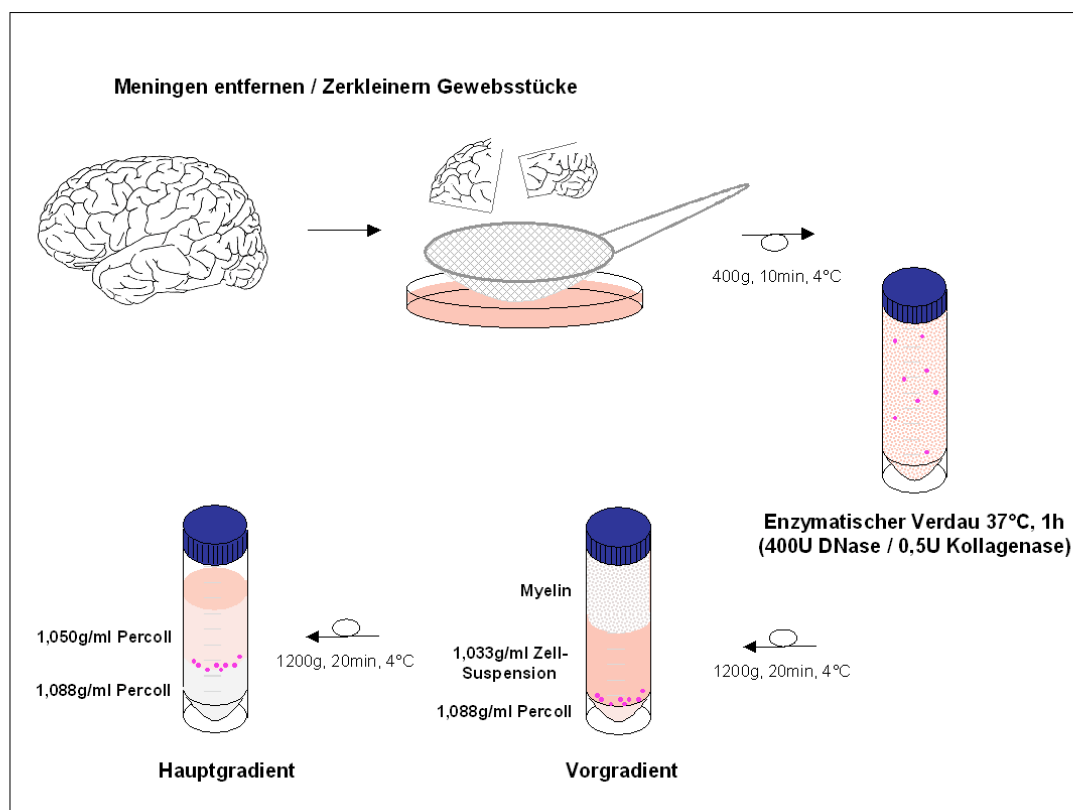


Abb. 2.1 Die wichtigsten Schritte des Isolierungsverfahrens von Mikrogliazellen und anderen Leukozyten aus Gehirngewebe von Rhesusaffen

2.3.4 Kultivierung, Stimulation und Dokumentation von primären Mikrogliazellkulturen

Von jeder Mikrogliazellisolierung wurde zur Begutachtung der Aufarbeitung ein Kontrollnapf mit 1×10^6 Zellen, aufgenommen in 0,5ml Kulturmedium in einer 24well Zellkulturplatte, angelegt. Die Kultivierung fand unter sterilen Bedingungen bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten CO₂-Atmosphäre (5%) statt. Routinemäßig erfolgte nach 20 Stunden ein erster Wechsel des Kulturmediums, sowie eine mikroskopische Untersuchung. Beim Mediumwechsel wurden zuerst die 0,5ml altes Medium vorsichtig abgenommen und für Folgeuntersuchungen, zum Beispiel Bestimmung der Viruslast, bei -80°C eingefroren und dann 0,5ml frisches Kulturmedium zugegeben. Spätere Mediumwechsel fanden circa im 72 Stunden Rhythmus statt. Da die Mikrogliazellen nach durchschnittlich 48 Stunden adhärent waren, konnten die Kulturen ab diesem Zeitpunkt auch gespült werden.

Die Kulturen wurden photographisch dokumentiert, vor allem wenn Infektionsbedingte Besonderheiten wie vielkernige Riesenzellen auftraten.

2.3.5 Durchflusszytometrische Analysen

Die polychromatische Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS) ermöglicht die Analyse einzelner Zellen oder Zellsubpopulationen innerhalb einer heterogenen Zellsuspension. Das für die Datenaufnahme verwendete Durchflusszytometer LSRII kann in der vorhandenen Konfiguration zehn Fluorochrome plus Vorwärtsstreulicht im Forward Scatter (FSC) und Seitwärtsstreulicht im Side Scatter (SSC) gleichzeitig detektieren und analysieren. Zur Fluoreszenzanregung dienen ein Coherent VioFlame Diodenlaser (Wellenlänge 405nm), ein Coherent Sapphire Argonionenlaser (Wellenlänge 488nm) und ein JDS Uniphase Helium-Neon-Laser (Wellenlänge 635nm).

2.3.5.1 Färbeschemata

Für die Messungen wurden monoklonale Antikörper gegen verschiedene humane Proteine verwendet, die mit den entsprechenden Antigenen der Rhesusaffen kreuzreagieren (Sopper et al., 1997).

Tab. 2.4: Übersicht verwendeter Kombinationen von Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten zur Charakterisierung von Mikrogliazellen und anderen Leukozyten isoliert aus Gehirngewebe

Färbung	Fluorochrom									
	FITC	PE	ECD	Per-Cy5.5	Pe-Cy7 [#]	APC	Alexa 700	APC-Cy7	Alexa 405 / Pacific Blue	AmCyan / Pacific Orange
1	γ/δ	NKG2a	CD45RA	CD14	CD20	CD45	CD3	CD16	CD11b	CD8
2	CD29	CD183	CD45RA	-	CD197	CD195	CD3	HLA DR	CD11b	CD8
3	CD45	CD11b	CD69	CD28	PD1	CD195	CD3	-	CD4	CD8
4	CD21	CD80	CD23	CD4	CD20	CD86	CD3	-	CD11b	CD8
5	CD29	CD86	CD45RA	CD4	CD20	CD69	CD3	-	CD11b	CD8
6	CD64	CD163	-	CD4	IL15	CD45	CD3	HLA DR	CD11b	CD8
7	CD63	CD127	CD45RA	CD4	-	CD95	CD3	-	CD11b	CD8
8	CD103	HLA DR	-	CD14	CD25	CD45	CD3	CD4	CD11b	CD8
9	CD28	CD49d	-	CD4	CD95*	β7	CD3	-	CD11b	CD8
10	CD83	CD11c	-	CD14	CD20	CD45	CD3	HLA DR	CD11b	CD8
11	CD40	CD123	-	CD14	CD20	CD1c	CD3	HLA DR	CD11b	CD8
12	CD56	CD62l	-	CD4	CD20	CD22	CD3	-	CD11b	CD8
13	CD45RB	CD31	-	CD4	-	CD11a	CD3	-	CD11b	CD8

[#] Fluorochrom ist mit Streptavidin konjugiert

* anti CD95 Antikörper ist biotinyliert

Zur Identifizierung von Mikrogliazellen und anderen Leukozytenpopulationen, isoliert aus Gehirngewebe, erfolgte die Markierung verschiedener Oberflächenantigene mit Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten. Dafür wurden die einzelnen Antikörper-Fluorochrom-Konjugate in definierten Färbungen kombiniert. Die verwendeten Färbungen sind in Tabelle 2.4 dargestellt. Parallel wurden die gleichen Färbungen für Leukozyten isoliert aus peripherem Blut durchgeführt.

Im Verlauf der Experimente kamen weitere Fragestellungen auf, welche eine Abwandlung der Kombinationen von Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten erforderten. Diese wurden nicht gesondert aufgelistet, finden jedoch im Ergebnis- und Diskussionskapitel Erwähnung.

2.3.5.2 Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration

Bevor die Antikörper in den Färbungen von Probenmaterial verwendet wurden, musste durch Titration die optimale Konzentration bestimmt werden. Die angesetzten Verdünnungsreihen gingen von der vom Hersteller empfohlenen Konzentration aus, welche dann viermal 1:2 verdünnt wurde. Nach Zugabe von 50µl Vollblut zu den einzelnen Verdünnungsstufen erfolgte die Färbung nach dem Standardprotokoll für Vollblut (siehe 2.3.5.4). Bei der anschließenden Messung wurde die Konzentration gewählt, welche bei geringem Hintergrund noch ein deutliches Signal anzeigte.

2.3.5.3 Erstellung einer Kompensation

Beim Einsatz von mehreren Fluoreszenzfarbstoffen in einer Färbung kann es in bestimmten Bereichen zu Überlappungen der Fluoreszenzspektren der verschiedenen Fluorochrome kommen, denn die Strahlen eines Fluorochroms erstrecken sich in einem weiten Bereich um den Maximalwert. Deshalb wurde darauf geachtet, dass die Emissionsspektren möglichst verschieden sind (Baumgarth and Roederer, 2000) und eine Kompensationsmessung durchgeführt, da sich Überlagerungen der Emissionsspektren nicht vollkommen verhindern lassen. Die dafür verwendeten Polystyrolkugeln (beads, 3.0µm) sind mit einem Antiserum gegen Maus IgG beschichtet und konnten somit alle verwendeten Antikörper binden. Pro Ansatz wurden die Polystyrolkugeln mit einem einzelnen Fluorochrom gefärbt, im Dunkeln für 30min bei 4°C, und direkt im Anschluss gemessen. Die Kompensationselektronik der FACSDiva Software ermittelte die auftretenden Signale

in allen Detektoren, verrechnete den Anteil der Überlappungen und subtrahierte diesen Wert von den Signalen bei den folgenden Messungen der Proben.

2.3.5.4 Färbungen für die durchflusszytometrische Analyse von Vollblut

Die in den Färbeschemata (siehe 2.3.5.1) festgelegten Kombinationen von Antikörpern wurden für die einzelnen Färbungen, in ihren austitrierten Volumina, in BD 5ml Rundboden Röhrchen pipettiert. Nach Zugabe von 50µl Vollblut pro Röhrchen wurde der Ansatz durchmischt. Danach wurde für 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 1ml FACS Lyse-Puffer (hypotone Ammonium-Chlorid Lösung) zur Lyse der Erythrozyten, kurzem Durchmischen und einer weiteren Inkubation für 10min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde bei 310g für 5min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 1,5ml FACS Puffer aufgenommen und anschließend durch Zugabe von 1,5ml 7% Formaldehyd und Inkubation für 10min bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 310g für 5min wurden die Zellen in 50µl FACS Puffer suspendiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.3.5.5 Färbungen für die durchflusszytometrische Analyse von isolierten Zellen

Auch für die pelletierten Zellen aus der CSF und die isolierten Zellen aus Vollblut und Gehirn wurden zuerst die für die Färbungen festgelegten Antikörperkombinationen, in ihren austitrierten Volumina, in BD 5ml Rundboden Röhrchen pipettiert. Für die Messungen wurden $2-5 \times 10^6$ Zellen, aufgenommen in 50µl PBS, eingesetzt. Nur vom Liquor wurden wegen deutlich niedrigerer Zellzahlen, alle pelletierten Zellen, in 50µl Überstand suspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C im Dunkeln folgte die Fixierung. Hierfür wurde der Färbeansatz erst mit 1,5ml FACS Puffer versetzt und nach Zugabe von 1,5ml 7% Formaldehyd für 10min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 310g für 5min wurden die Zellen in 50µl FACS Puffer suspendiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.3.5.6 Färbungen für die durchflusszytometrische Analyse mit Biotin markierten Antikörpern

Fanden in den Färbungen Biotin markierte Antikörper Verwendung, wurden die Zellen nach der 30 minütigen Inkubation vom Antikörpermix abgetrennt, durch Zugabe von 1,5ml FACS Puffer, kurzem Durchmischen und Zentrifugation bei 310g für 5min, 4°C. Das Zellpellet wurde mit 50µl Streptavidin konjugiert an ein Fluorochrom versetzt (1:1000 verdünnt in FACS Puffer). Nach einer weiteren Inkubation für 30min bei 4°C und im Dunkeln wurde weiter nach den Standardprotokollen für Vollblut beziehungsweise isolierte Zellen verfahren.

2.3.5.7 Probenmessung im Durchflusszytometer und Datenverarbeitung

Bei den Messungen wurden die Antikörper-Fluorochrom-Konjugat markierten Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch die Messzelle des Durchflusszytometers geleitet und dabei mit Laserlicht definierter Wellenlänge bestrahlt. Die durch das Laserlicht angeregte Emission der Fluorochrome wurde, nach Weiterleitung zu den entsprechenden Detektoren, in elektrische Impulse umgewandelt. Um das intensitätsärmere Seitwärtsstreu- und Fluoreszenzlicht zu erfassen wurden Photodetektoren (photomultiplier tube – PMT), welche die Impulse verstärken, genutzt. Hierbei wurden die Signalhöhe auf 16384 Ebenen und die Signalweite in 10MHz Rastern erfasst. Aus Signalhöhe und –weite ergaben sich Signalfläche und Zeitverlauf des gemessenen Ereignisses. Für die anschließenden, Rechner gestützte Multiparameteranalysen wurde die FlowJo Software verwendet.

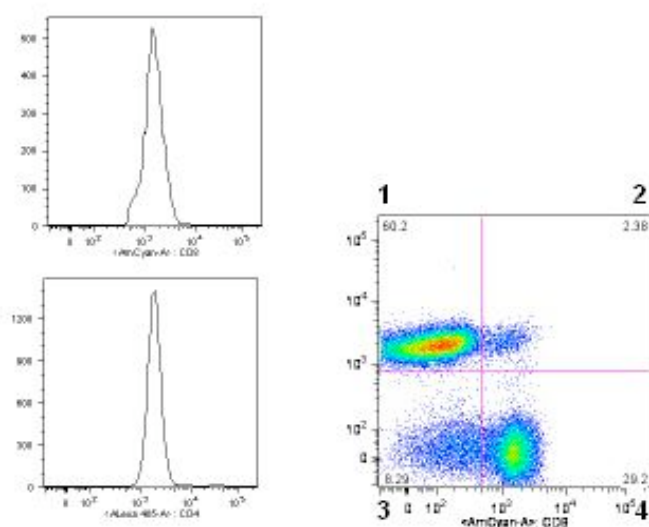


Abb. 2.2 Beispielhafte Darstellung der gemessenen Signale in einem Histogramm und in einem Streudiagramm

Die Messdaten können im Histogramm, Auftragung Anzahl gemessener Ereignisse gegen Signalintensität, oder im Streudiagramm, Ereignis durch paarweise Auftragung von Signalen, dargestellt werden. In Abbildung 2.2 sind beide Darstellungsweisen für ein nicht infiziertes Tier beispielhaft für die CD4 und die CD8 Expression auf T-Zellen aufgezeigt. Die Histogramme bilden die Häufigkeitsverteilungen der Messdaten ab. Durch Auftragung der Zahl an Ereignissen (y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse, logarithmisch) lässt sich die Stärke der Expression eines Antigens auf der Zelloberfläche, in diesem Fall für CD4 beziehungsweise CD8, bestimmen. Im Streudiagramm ist die Auswertung der beiden Marker kombiniert. Auf der y-Achse ist die Fluoreszenzintensität von CD4 und auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität von CD8, beide logarithmisch, dargestellt. Jeder einzelne Punkt steht für ein bei der durchflusszytometrischen Messung detektiertes Ereignis. In diesem Beispiel ist die Gesamtheit der im Streudiagramm abgebildeten Ereignisse als T-Zellen definiert. Der Farbverlauf ändert sich, von blau nach rot, je mehr Ereignisse mit derselben Kombination der Fluoreszenzintensitäten für CD4 und CD8 detektiert wurden. Im Streudiagramm wurde durch Eintragung eines Kreuzes eine Aufteilung in vier Quadranten vorgenommen. Für diese Quadranten, mit 1,2,3,4 beschriftet, erfolgt automatisch eine Berechnung des prozentualen Anteils der Ereignisse an den im Diagramm dargestellten Gesamtereignissen. So lassen sich einfach positive Zellen, Quadrant 1 und 3, von doppelt positiven, Quadrant 2, und doppelt negativen, Quadrant 4, abtrennen. Die eingegrenzten Subpopulationen können auf weitere Eigenschaften wie Größe (FSC), Granularität (SSC) und die Expression anderer Antigene untersucht werden.

2.3.6 Molekulargenetische Methoden

2.3.6.1 Isolierung der gesamtRNA aus Mikrogliazellen und Gehirngewebe

Die RNA Isolation aus Mikrogliazellen und Gehirngewebe erfolgte mit den Kits RNeasy Plus Mini und RNeasy Midi. An den Sektionstagen wurden $1 - 5 \times 10^6$ isolierte Mikrogliazellen in 600µl RLTplus Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Vom Gehirngewebe wurden 1cm x 0.5cm x 0.5cm große Stücke in 1,5ml RNAlater gegeben und nach 24 Stunden Einwirkzeit bei 4°C

bis zur Aufarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Die Tage bis Wochen später erfolgte Isolation der RNA ist in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt.

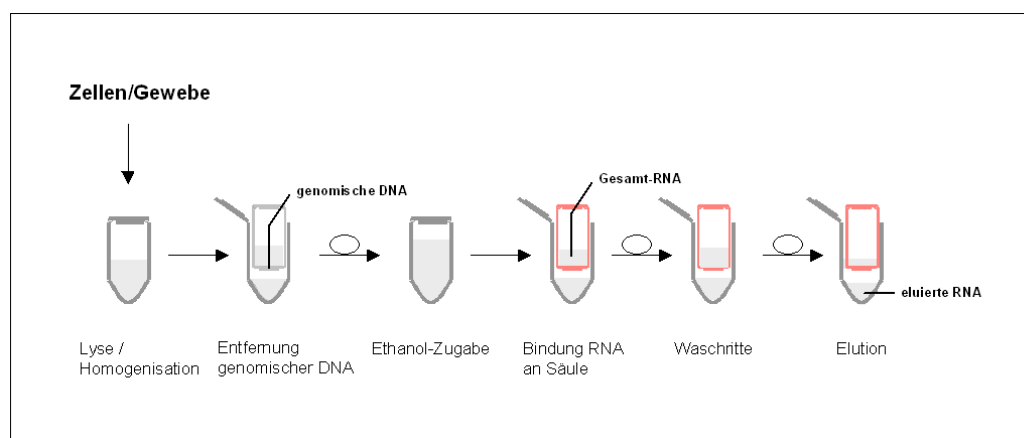


Abb. 2.3 Die wichtigsten Schritte des Isolierungsverfahrens von RNA aus Mikrogliazellen oder RNAlater stabilisiertem Gehirngewebe

Die Lyse der Mikrogliazellen wurde durch fünfmaliges Aufziehen und Entlassen einer 1ml Einmalspritze mit 0,9mm Kanüle mit der Zellsuspension erreicht. Von dem RNAlater stabilisierten Gehirngewebe wurden 10mg Stücke in 600 μl RLTplus Puffer aufgenommen und nach Zugabe einer Stahlkugel zweimal für 2min bei 25Hz in der Mixer Mill MM 300 homogenisiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation des Homogenates bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur. Die folgenden Aufarbeitungsschritte sind für den erhaltenen Überstand und das Lysat der Mikrogliazellen gleich.

Das Lysat wurde auf eine gDNA Eliminator Säule gegeben und bei 8000g für 0,5min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit dem gleichen Volumen, 600 μl , Ethanol (70%) gemischt. Nach der Fällung fand durch zweimalige Zugabe von 600 μl Probe und anschließender Zentrifugation bei 8000g für 0,25min die Beladung einer RNeasy Säule mit der gesamtRNA statt. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgten drei Waschritte. Der erste mit 700 μl RW1-Puffer. Nach fünf minütiger Inkubation wurde für 0,25min bei 8000g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der zweite mit 500 μl RPE-Puffer und erneuter Zentrifugation für 0,25min bei 8000g. Der dritte mit 500 μl RPE-Puffer und zwei minütiger Zentrifugation bei 8000g. Bei den RPE-Puffer Waschritten wurde auch der Durchfluss verworfen und im Anschluss die Säule zur Entfernung von Pufferresten 1min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach zweimaliger Eluation der RNA mit 20 μl RNase freiem Wasser und

Zentrifugation bei 8000g für 1min wurde das Probenvolumen bestimmt, portioniert und die RNA bei -80°C eingefroren.

Um die Effizienz der RNA Isolation aus Gehirnstücken zu steigern wurde auf das RNeasy Midi Kit gewechselt. Die RNA wurde direkt am Sektionstag aus etwa 80mg eisgekühltem Gehirngewebe isoliert. Nach Zugabe von 4ml RLT Puffer und einer Stahlkugel wurde die Probe homogenisiert, zweimal für 5min bei 25Hz in der Mixer Mill MM 300. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4500g für 10min bei 4°C , wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen, 4ml, Ethanol (70%) durchmischt. Die RNeasy Midi Säule wurde durch zweimalige Zugabe von 4ml Probe und anschließender Zentrifugation mit 4500g für 5min bei 4°C beladen. Es folgten, wie beim RNeasy Mini Kit, die drei Waschschrte. Beim ersten Waschschrte wurde der DNA Verdau mit dem RNase free DNase Set eingebaut. Nach Zugabe von 7,5ml RW1 Puffer und fünf minütiger Zentrifugation bei 4500g, wurden 20 μl DNase, verdünnt in 140 μl RDD Puffer, direkt auf die Membran gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 7,5ml RW1 Puffer zugegeben und für weitere 5 Minuten inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4500g für 5min folgten die zwei Waschrte mit 10ml RPE Puffer. Zentrifugiert wurde jeweils mit 4500g für 5min bei 4°C . Zur Entfernung von Pufferresten wurde 5min bei 4500g zentrifugiert. Durch zweimalige Zugabe von 150 μl RNase freiem Wasser und Zentrifugation bei 4500g für 5min wurde eluiert. Zum Abschluss wurde das Probenvolumen bestimmt, portioniert und die RNA bei -80°C eingefroren.

Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit der RNA erfolgten photospektrometrisch bei 260nm mit dem NanoDrop ND-1000 Photospektrometer und parallel mit dem Agilent2100 Bioanalyzer unter Verwendung des RNA 6000 NanoLabChip Kits. Es wurden nur Proben mit einem RIN-Wert >5 auf einer Skala von 1 bis 10 verwendet.

2.3.6.2 Isolierung von Virus-RNA aus Cerebrospinalflüssigkeit-Überständen und Mikrogliakulturüberständen

Die Verwendung des QIAamp Viral RNA Mini Kits ermöglichte es, durch Verwendung einer Carrier RNA, auch sehr geringe Mengen Virus RNA aus CSF-Überständen und Mikrogliakulturüberständen zu isolieren. Hierfür wurde die in AVE Puffer gelöste Carrier RNA 1:100 in AVL Puffer verdünnt. Es folgte eine Inkubation für 10min von

140µl Proben-Überstand durchmischt mit 560µl des Carrier RNA / AVL Puffers. Die Carrier RNA diene der verbesserten Bindung der Virus RNA an die Säule und stabilisierte die Virus RNA. Im Anschluss wurde die Probe mit dem gleichen Volumen, 560µl, Ethanol (96%) versetzt und gut durchmischt. Die Beladung der QIAamp Mini spin Säule erfolgte durch zweimalige Zugabe von 560µl Probe mit anschließender Zentrifugation bei 6000g für 1min. Für die Waschschriffe wurden erst 500µl AW1 Puffer, Zentrifugation bei 6000g für 1min, und dann 500µl AW2 Puffer, Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 3min, verwendet. Zur Entfernung von Pufferesten wurde 1min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Um die RNA zu eluieren wurde nach Zugabe von 50µl AVE Puffer für 1min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 6000g für 1min zentrifugiert. Zum Abschluss wurde das Probenvolumen bestimmt, portioniert und die RNA bei -80°C eingefroren.

2.3.6.3 Absolute Quantifizierung der Viruslast mittels Echtzeit reverser Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die quantitative Bestimmung der SIV spezifischen RNA erfolgte mittels TaqMan basierter RT-PCR. Hierfür wurde das QuantiTect Probe RT-PCR Kit mit RNA Standards von 50, 10^2 , 10^3 , 10^4 und 10^6 SIV-RNA Kopie Equivalenten pro Titration verwendet. Das Protokoll zur Herstellung der Standards aus pSTBlue Plasmiden, die ein 349bp grosses SIVgag Insert beinhalten, wurde nach einer bereits beschriebenen Methode (Hofmann-Lehmann et al., 2000) am Institut etabliert. Bei den verwendeten Proben handelte es sich um RNA Isolate aus Mikrogliakultur-Überständen und CSF-Überständen, welche mit 5µl RNA pro PCR-Ansatz eingesetzt wurden, sowie um RNA Isolate aus Mikrogliazellen und Gehirngewebestücke, welche wegen deutlich höherer RNA Konzentrationen mit 20ng RNA pro PCR-Ansatz eingesetzt wurden. Die Reaktionsansätze (siehe Tabelle 2.5) wurden unter folgenden PCR Bedingungen verwendet: Reverse Transkription bei 50°C , 30min; initiale Aktivierung bei 95°C , 10min; 45 Zyklen Denaturierung bei 95°C , 0,25min und Annealing / Elongation bei 60°C , 1min. Das verwendete 7500 Real-time PCR System führte die Datenaufnahme während der Annealing / Elongationsschritte durch. Jede RT-PCR beinhaltete eine negativ Kontrolle. Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden wurden übernommen (Negri et al., 2004) und sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tab. 2.5: Reaktionsansatz für RT-PCR zur Bestimmung der Viruslast

Komponenten	Reaktionsansatz	Endkonzentration	Firma
2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12,5µl	1x	Qiagen
10µM SIVgag forward Primer	0,625µl	250nM	Biomers GmbH
10µM SIVgag reverse Primer	0,625µl	250nM	Biomers GmbH
10µM TaqMan Probe	0,375µl	150nM	Biomers GmbH
QuantiTect RT Mix	0,25µl		Qiagen
RNase freies H ₂ O	5,625µl		
RNA	5µl bzw. 20ng aufgefüllt mit RNase freiem H₂O		
	25µl		

Tab. 2.6: Verwendete Primer und TaqMan-Sonde der RT-PCR zur Bestimmung der Viruslast

	Region	Oligonucleotid Sequenz
SIVgag forward	1104 - 1130	5'-ACC CAG TAC AAC AAA TAG GTG GTA ACT-3' (TM 55°C; GC 40%; Länge 27mer)
SIVgag reverse	1077 - 1053	5'-TCA ATT TTA CCC AGG CAT TTA ATG T-3' (TM 55°C; GC 32%; Länge 25mer)
TaqMan Probe	1078 - 1102	FAM-5'-TGT CCA CCT GCC ATT AAG CCC GAG-3'-TAMRA (TM 65°C; GC 58%; Länge 24mer)

Auswertung

Die Ergebnisse der RT-PCR wurden mit der 7500 System SDS-Software von Applied Biosystems ausgewertet. Die amplifizierte RNA wurde als SIV-RNA Kopien/ml für Mikroglia-Kulturüberstände und Cerebrospinalflüssigkeit-Überstände berechnet. Für die Mikrogliazellen wurden die eingesetzten 20ng RNA als SIV-RNA Kopien auf 1×10^6 Zellen ausgewertet. Für die Gehirngewebsstücken wurden die eingesetzten 20ng RNA als SIV-RNA Kopien/mg ausgewertet.

2.3.6.4 Relative Quantifizierung der Genexpression mittels Zweischnitt Echtzeit reverser Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

cDNA-Synthese

Mit dem SuperScript First Strand Synthesis System erfolgte die Umschreibung von 100ng RNA, isoliert aus Mikrogliazellen oder Gehirngewebe, in einzelsträngige cDNA. Für die Denaturierung wurde ein Mix aus 100ng RNA, mit Nuklease freiem Wasser auf 8µl aufgefüllt, 1µl Random Hexamer-Primern und 1µl dNTPs für fünf Minuten bei 65°C inkubiert. Es wurde zusätzlich eine Negativkontrolle, ohne RNA Zugabe, gemessen. Nach Zugabe des cDNA Synthese-Mix (siehe Tabelle 2.7) fand die Umschreibung, unterteilt in Annealing für 10min, 25°C; Synthese für 50min, 50°C und finale Reaktion für 5min, 85°C in einem Thermal Cycler statt. Es wurden von jeder Probe zusätzlich –RT Kontrollen, ohne Zugabe Reverser Transkriptase, untersucht. Die erhaltene cDNA wurde entweder sofort in einer PCR eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei –20°C eingefroren.

Tab. 2.7: Reaktionsansatz für cDNA Synthese (SuperScript First Strand Synthesis System) zur Bestimmung der Genexpression

	Komponenten	Reaktionsansatz	Endkonzentration
Denaturierung	RNA	8µl	100ng
	Random Hexamer Primer	1µl	2,5ng
	dNTP Mix	1µl	0,5mM
cDNA Synthese Mix	10x RT Puffer	2µl	1x
	MgCl ₂	4µl	5mM
	DTT	2µl	10mM
	RNase Out™	1µl	2U
	Super Script™ III RT	1µl	10U
		20µl	

Quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit dieser PCR wurde die Expression der APOBEC3G und MxA-Gene, normalisiert auf das Haushalts-Gen GAPDH, analysiert. Für die Messungen wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit verwendet. Die Reaktionsansätze (siehe Tabelle 2.8) wurden unter folgenden PCR Bedingungen eingesetzt: initiale Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase bei 95°C, 15min und 40 Zyklen Denaturierung bei 94°C, 0,25min und Annealing / Elongation bei 55°C, 1min. Das verwendete 7500 Real-time PCR System führte die Datenaufnahme während der Annealing /

Elongationsschritte aus. Jede PCR beinhaltete eine negativ Kontrolle und für jede Probe eine –RT Kontrolle von GAPDH und APOBEC3G. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 2.9 aufgeführt. Die Primer für GAPDH und APOBEC3G wurden am Institut entworfen, die für MxA übernommen (Abel et al., 2001).

Tab. 2.8: Reaktionsansatz für PCR zur Bestimmung der Genexpression

Komponenten	Reaktionsansatz	Endkonzentration
2x QuantiTect SYBR Green Master Mix	13µl	1x
0,01µM forward Primer*	1µl	0,4nM
0,01µM reverse Primer*	1µl	0,4nM
RNase freies H ₂ O	8µl	
RNA	2µl	
	25µl	

* für GAPDH, APOBEC3G oder MxA

Tab. 2.9: Verwendete Primer der PCR zur Bestimmung der Genexpression

	Region	Oligonucleotid Sequenz
GAPDH forward	510 - 529	5`-CCT GCA CCA CCA ACT GCT TA-3` (TM 58°C; GC 55%; Länge 20mer)
GAPDH reverse	562 - 583	5`-CAT GAG TCC TTC CAC GAT ACC A-3` (TM 58°C; GC 50%; Länge 22mer)
APOBEC3G forward	702 - 720	5`-TCT ACG CAA CCA GGC TCC A-3` (TM 59°C; GC 58%; Länge 19mer)
APOBEC3G reverse	760 - 779	5`-GGA ATC AGG TCC AGG AAG CA-3` (TM 59°C; GC 55%; Länge 20mer)
MxA forward	295 - 313	5`-AGG AGT TGC CCT TCC CAG A-3` (TM 58°C; GC 58%; Länge 19mer)
MxA reverse	348 - 372	5`-TCG TTC ACA AGT TTC TTC AGT TTC A-3` (TM 59°C; GC 36%; Länge 25mer)

Auswertung

Die Daten der PCR Läufe wurden mit der 7500 System SDS-Software von Applied Biosystems analysiert. Für alle Proben erfolgte eine Doppelbestimmung und somit wurden neben den CT-Werten, die Mittelwerte samt Standardabweichung

angegeben. Im Anschluss erfolgte die Normalisierung gegen die GAPDH CT-Mittelwerte.

Für den weiteren Vergleich erfolgte eine Umrechnung der Δ CT Werte in APOBEC3G-beziehungsweise MxA-Kopien auf eine Million GAPDH-Kopien und entsprechend der prozentuale Anteil der APOBEC3G- beziehungsweise MxA-Kopien an den exprimierten GAPDH-Kopien.

2.3.7 Datenauswertung und statistische Analyse

Die Darstellung, Auswertung und statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism. Für die graphische Darstellung wurden die Werte jedes Tieres als Perzentile angegeben. Zusammenfassend wurde für die Ergebnisse aller Tiere der Median (Q_{50}) berechnet, mit dem Quartilabstand ($Q_{75}-Q_{25}$) als Maß für die Streuung. Für die vergleichenden Auswertungen zwischen zwei Gruppen wurde der nicht parametrische Mann-Whitney-Test (zweiseitig) verwendet und zwischen mehreren Gruppen der nicht parametrische Kruskal-Wallis-Test mit sich anschließendem Dunn-Test. Es wurde ein Konfidenzintervall von 95% gewählt. Für den Tier internen Vergleich von Blut und Gehirn wurde der nicht parametrische gepaarte Wilcoxon-Test gewählt, zweiseitig und ebenfalls mit einem Konfidenzintervall von 95%. Als statistisch signifikant wurden bei allen Tests Ergebnisse mit p-Werten $<0,05$ definiert. Für Korrelationsanalysen wurde die nicht parametrische Spearman-Korrelation, zweiseitig mit einem Konfidenzintervall von 95%, durchgeführt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer SIV-Infektion des ZNS auf die Leukozytenpopulationen, speziell die Mikrogliazellen, im Rhesusaffenmodell untersucht.

Für die Erhebung der im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden insgesamt 53 Tiere untersucht (siehe Anhang, Zusammenfassung Tiere I). Diese stammen aus acht unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Zielsetzungen, Immunisierungsprotokollen und zur Infektion verwendeten Virusisolaten. Zusätzliche Ausnahmen bilden ein Großteil der uninfizierten Tiere, die durch Alter oder Krankheit bedingt direkt aus der Zucht kamen. Von den Tieren wurde zum Zeitpunkt der Sektion Gehirngewebe, Blut und Cerebrospinalflüssigkeit entnommen, aufgearbeitet und durchflusszytometrisch und molekulargenetisch analysiert.

Die Untersuchungsgruppe bestand aus 11 weiblichen Tieren (21%) und 42 männlichen Tieren (79%). Das durchschnittliche Alter (Median) zum Zeitpunkt der Sektion betrug fünf Jahre und neun Monate. Innerhalb der Gruppe waren 10 Tiere (19%) nicht mit SIV infiziert. Von den 43 infizierten Tieren wurden 22 Tiere (51%) mit SIV_{mac239} und 21 Tiere (49%) mit SIV_{mac251} infiziert.

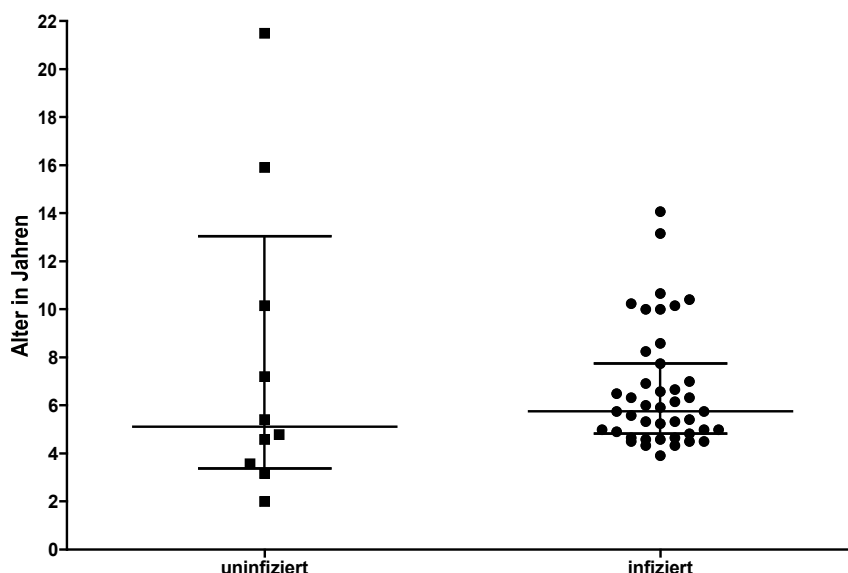


Abb. 3.1 Altersverteilung in Jahren für die 53 Tiere umfassende Untersuchungsgruppe unterteilt in uninfizierte und infizierte Tiere. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Beide Virusstämme rufen einen vergleichbaren Krankheitsverlauf hervor, unterscheiden sich aber in ihrem Zelltropismus und damit in der Fähigkeit Mikrogliazellen produktiv zu infizieren.

Aus der Gruppe der SIV infizierten Tiere konnten anhand der klinischen und pathologischen Befunde zwei Teilgruppen gebildet werden, asymptomatisch und AIDS. Bei in der AIDS Gruppe eingestuftem Tieren wurden neben Gewichtsverlust, verringerter Nahrungsaufnahme, andauernden Durchfallerkrankungen, durch opportunistische Erreger wie *Pneumocystis jirovecii* (Respirationstrakt) oder Mykobakterien (Digestionstrakt) hervorgerufene Krankheiten und/oder deutliche Auswirkungen auf das lymphatische System (hochgradige generalisierte Hyperplasie, Involution) und/oder ein deutlicher Verlust an CD4 positiven T-Helferzellen diagnostiziert. Bei einem Teil der Tiere mit AIDS konnten zusätzlich durch die SIV-Infektion induzierte Veränderungen des ZNS nachgewiesen werden. Entweder wurde bei der histopathologischen Untersuchung des Gehirngewebes eine durch SIV induzierte Enzephalopathie gefunden und/oder es konnten bei der Kultivierung der isolierten Mikrogliazellen vielkernige Riesenzellen dokumentiert werden. Ein Beispiel für eine solche vielkernige Riesenzelle ist in Abbildung 3.2 für das Tier 13249 gegeben. Diese Tiere wurden als eigenständige Gruppe, Neuro-AIDS, abgegrenzt.

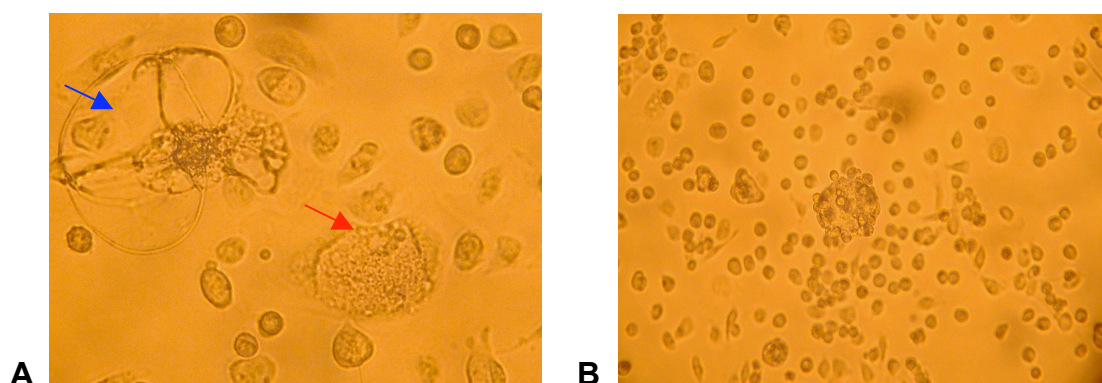


Abb. 3.2 Mikrogliazellkultur eines an AIDS erkrankten Tieres mit Virus induzierten Veränderungen des ZNS Dokumentation vom elften Tag in Kultur **A**) Aufnahme von vielkernigen Riesenzellen in einem frühen Stadium (roter Pfeil) und kurz vor der Auflösung (blauer Pfeil), x200 **B**) Aufnahme der Mikrogliazellkultur, x100

Als asymptomatisch wurden 14 Tiere (33%) eingestuft, 21 Tiere (48%) hatten AIDS und 8 Tiere (19%) hatten AIDS und wiesen durch das Virus induzierte Veränderungen des ZNS auf. Die durchschnittliche Infektionsdauer (Median) lag bei einem Jahr. Es muss aber erwähnt werden, dass die Krankheitsverläufe von Tier zu

Tier variierten und zum Beispiel durch eine Immunisierung beeinflusst werden konnten. Eine detaillierte Auflistung aller Tiere befindet sich im Anhang, Zusammenfassung Tiere II. In Abbildung 3.3 ist die Infektionsdauer aller Tiere sortiert nach Ausprägung der Infektion zum Zeitpunkt der Sektion aufgeführt.

Von den an AIDS erkrankten Tieren wiesen acht Tiere mit maximal zehn Monaten Infektionsdauer einen schnellen Krankheitsverlauf auf. Von diesen acht Tieren waren sechs mit SIV_{mac}251 infiziert, von denen wiederum drei Tiere von SIV induzierten Veränderungen des ZNS betroffen waren. Dreizehn der an AIDS erkrankten Tiere zeigten mit über zwei Jahren Infektionsdauer einen langsamen Krankheitsverlauf. Nur eines der Tiere war mit SIV_{mac} 251 infiziert. Dieses Tier und vier der SIV_{mac}239 infizierten Tiere sind als Neuro-AIDS-Tiere definiert.

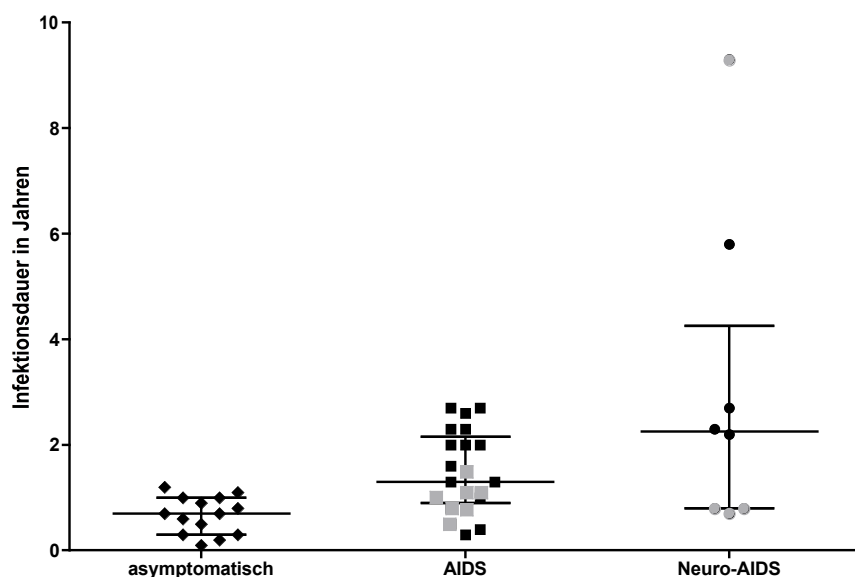


Abb. 3.3 Infektionsdauer in Jahren sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für eines der 43 infizierten Tiere. Die grau markierten Tiere in der AIDS und der Neuro-AIDS-Gruppe sind SIV_{mac}251 infiziert. Für die asymptotische Gruppe erfolgte keine Markierung (10 Tiere SIV_{mac}251 infiziert). Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

3.1 Vergleichende durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten in Gehirn und Blut

3.1.1 Definition der Leukozytensubpopulationen

Die aus Gehirngewebe und Vollblut über Dichtegradienten isolierten Zellen und die Zellen der CSF sollten in einem ersten Schritt phänotypisch charakterisiert werden.

Die hierfür genutzte Durchflusszytometrie mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern ermöglicht eine gleichzeitige Abfrage von zehn wählbaren Fluoreszenz-Parametern, sowie der Größe und Granularität einer Zelle. Das für die Auswertung verwendete Eingrenzungsschema zur Festlegung einzelner Zellpopulationen ist für ein uninfiziertes Tier (siehe Anhang, Zusammenfassung Tiere, 7760) in Abbildung 3.4 und für ein an AIDS erkranktes Tier mit Virus induzierten Veränderungen des ZNS (siehe Anhang, Zusammenfassung Tiere, 13255) in Abbildung 3.5 dargestellt. In beiden Abbildungen sind die Teilschritte zur Eingrenzung der einzelnen Subpopulationen im Tier zuerst für die Blutfärbung und dann für die Gehirnfärbung dargestellt. Nur für das uninfizierte Tier wurde die Reihenfolge der Auswertung mit Pfeilen markiert, war aber bei dem infizierten Tier gleich.

Für die Analyse der Leukozyten wurden alle vom Laser des Durchflusszytometers einzeln erfassten Ereignisse bezüglich ihrer CD45 und CD11b Fluoreszenzintensität untersucht. CD45 gilt als allgemeiner Marker für Zellen haematopoetischen Ursprungs. CD11b wird hauptsächlich auf Zellen der myeloiden Reihe, Mikrogliazellen und NK-Zellen exprimiert. Alle Ereignisse die CD45 hochpositiv oder CD11b und CD45 positiv waren, wurden als Leukozyten und nach einer weiteren Eingrenzung über Größe und Granularität als mononukleäre Zellen definiert. Es folgte die Aufteilung der Leukozyten in Mikrogliazellen, Makrophagen und Lymphozyten für die Gehirnfärbung beziehungsweise Makrophagen und Lymphozyten für die Blutfärbung. Mikrogliazellen sind CD11b und CD45 positiv. Alle CD45 hochpositiven Ereignisse wurden als Lymphozyten festgelegt, mit der Einschränkung, dass Ereignisse, welche für CD11b und CD45 eine höhere Fluoreszenzintensität als Mikrogliazellen aufweisen, Makrophagen sind. Die Makrophagen wurden zusätzlich über die CD14 Expression definiert (nicht in den Abbildungen 3.4 und 3.5 dargestellt). Von den Lymphozyten konnten, nach einer weiteren Eingrenzung über Größe und Granularität, alle CD20 positiven Ereignisse als B-Zellen abgegrenzt werden. Für die verbleibenden Ereignisse der Lymphozytenpopulation folgte die Bestimmung aller CD16 positiven und gleichzeitig CD3 negativen, sowie aller NKG2a positiven und gleichzeitig CD3 negativen Ereignisse. Diese CD16 und/oder NKG2a positiven, CD3 negativen Zellen wurden über eine boolesche Verknüpfung als NK-Zellen definiert. Diese Verknüpfung ermöglichte auch eine Unterteilung der NK-Zellen in CD16 einfachpositive, CD16/NKG2a doppelpositive und NKG2a einfachpositive NK-Zellen. Durch eine

weitere boolesche Verknüpfung innerhalb der Lymphozytenpopulation ließen sich alle CD20 negativen Ereignisse, welche auch nicht als NK-Zellen definiert wurden aber CD3 exprimierten, als T-Zellen festlegen. Nach einer Eingrenzung über Größe und Granularität erfolgte die endgültige Einteilung der T-Zellen in $\alpha\beta$ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen oder alternativ in CD4 positive oder CD8 positive T-Zellen.

Aufgrund der sehr niedrigen Zellzahlen in der Cerebrospinalflüssigkeit wurde die Darstellung des Eingrenzungsschemas weggelassen. Für die Definition der Lymphozyten und ihrer Subpopulationen wurden aber dieselben Marker verwendet und innerhalb der Lymphozytenpopulation auch die gleichen Auswertungswege eingehalten.

In Tabelle 3.1 sind die einzelnen Zellpopulationen und die zu ihrer Definition verwendeten Oberflächenantigene noch einmal zusammengefasst.

Tab. 3.1: Definition der analysierten Zellpopulationen anhand der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle

	CD45	CD11b	CD3	CD4	CD8	TCR $\gamma\delta$	CD14	CD16	CD20	NKG2a
Leukozyten	+									
Mikroglia	+	++								
Makrophagen	++	++					+			
Lymphozyten	++									
B-Zellen	++								+	
NK-Zellen	++							+		
T-Zellen	++		+							+
$\gamma\delta$ T-Zellen	++		+			+				
$\alpha\beta$ T-Zellen	++		+							
T-Helferzellen	++		+	+						
zytotoxische T-Zellen	++		+		+					

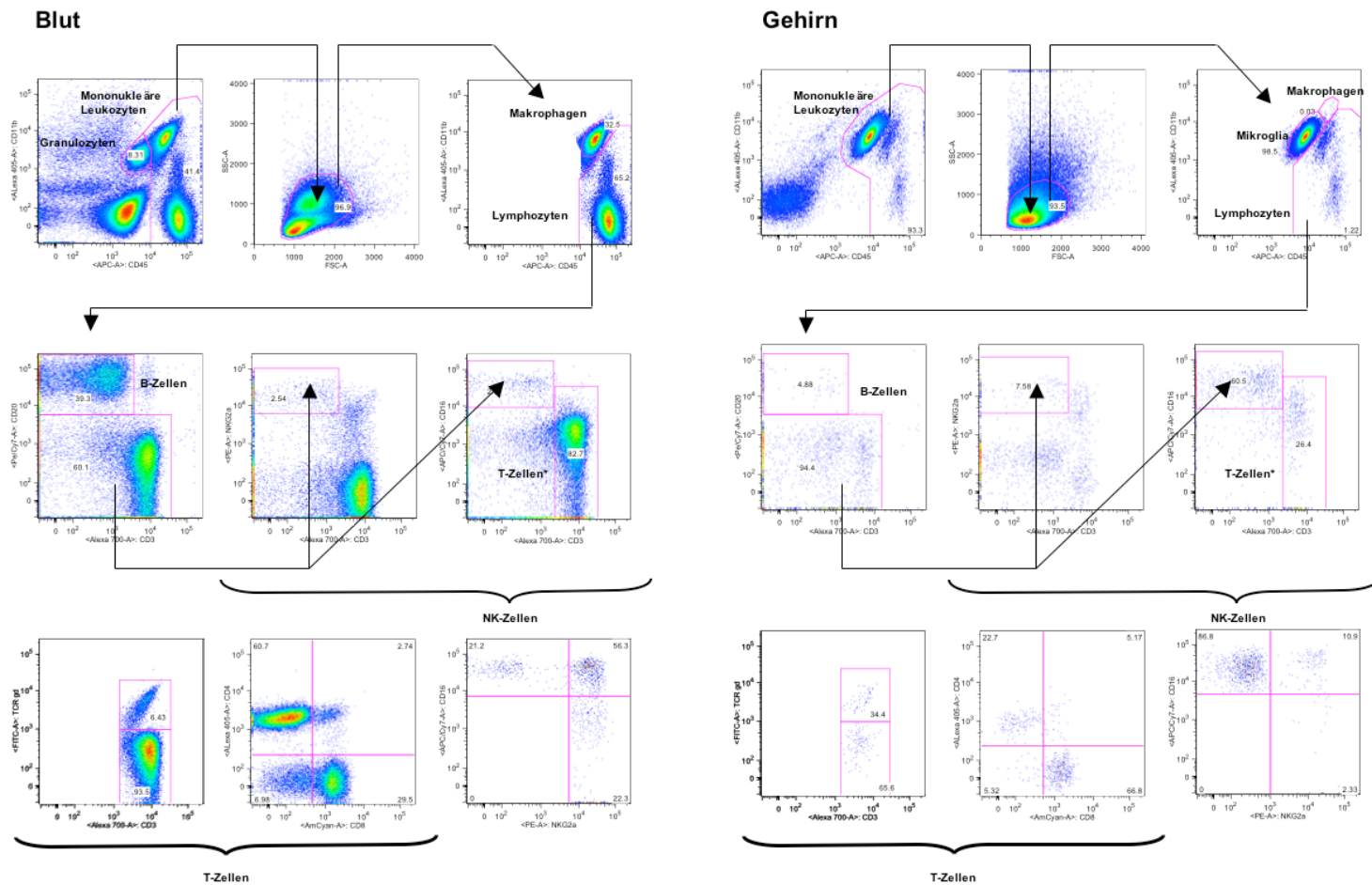


Abb. 3.4

Auswertungsschemata der durchflusszytometrischen Messungen vergleichend für Blut und Gehirn eines uninfizierten Tieres. Links oben mit der Definition der mononukleären Leukozyten beginnend, zeigen die Pfeile die Auswertungswege zur Einteilung in Makrophagen, Lymphozyten und zusätzlich Mikrogliazellen für das Gehirn, sowie in die Lymphozytensubpopulationen B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen* an. Die Definition der NK-Zellen und der T-Zellen erfolgte über boolesche Verknüpfungen, die mit * markierte T-Zell-Population entspricht nicht exakt den über die Verknüpfung definierten T-Zellen.

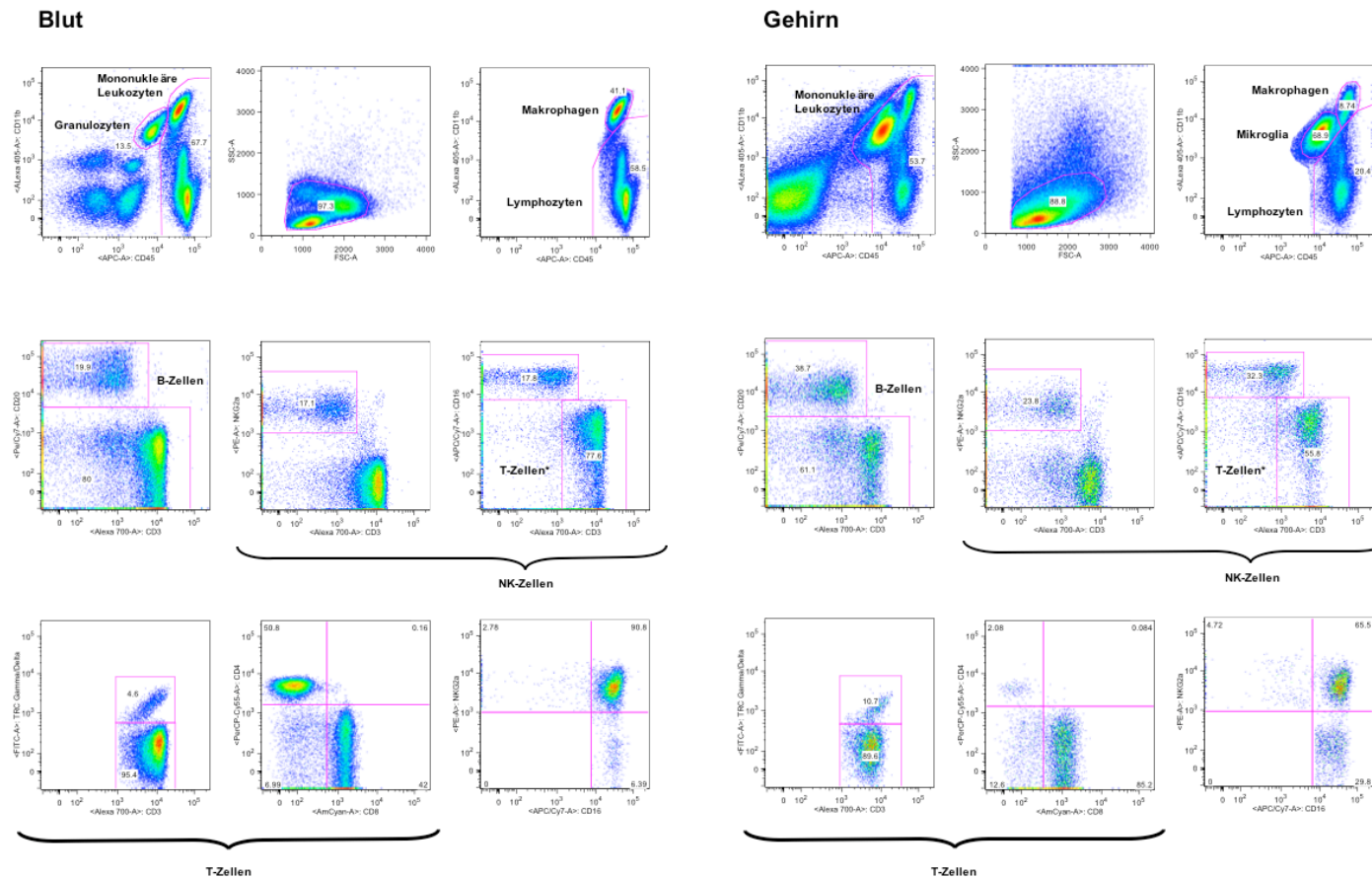


Abb. 3.5

Auswertungsschemata der durchflusszytometrischen Messungen vergleichend für Blut und Gehirn eines infizierten Tieres. Links oben mit der Definition der mononukleären Leukozyten beginnend, erfolgte über die gleichen Auswertungswege wie beim uninfizierten Tier (siehe Abb. 3.4) die Einteilung in Makrophagen, Lymphozyten und zusätzlich Mikrogliazellen für das Gehirn, sowie in die Lymphozytensubpopulationen B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen*. Die Definition der NK-Zellen und der T-Zellen erfolgte über boolesche Verknüpfungen, die mit * markierte T-Zell-Population entspricht nicht exakt den über die Verknüpfung definierten T-Zellen.

3.1.2 Zusammensetzung der Leukozyten bei uninfizierten Tieren

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten von nicht SIV infizierten Tieren ermöglicht eine Definition der Normalwerte. Diese dienen als Ausgangspunkt, um Veränderungen nach Infektion verdeutlichen zu können.

Verglichen wurde die Zusammensetzung der mononukleären Zellen in Blut und Gehirn, da durch die Aufarbeitung der Zellen über Dichtegradienten und durch Ausschluss bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten die Granulozyten nicht mit einbezogen sind. In Abbildung 3.6 sind die Einzelwerte aller Tiere für jede Subpopulation der Leukozyten aufgeführt. Für die acht analysierten Tiere zeigt sich, dass mit 65,94% (Median) an den mononukleären Leukozyten des Blutes der Anteil an Lymphozyten, gegenüber 34,06% (Median) für die Makrophagen, überwiegt. Mit durchschnittlich 96,76% (Median) der mononukleären Leukozyten im Gehirn bilden die Mikrogliazellen den Hauptanteil. Mit einem Anteil von 2,94% (Median) für Lymphozyten und 0,32% (Median) für Makrophagen sind diese beiden Populationen im Vergleich zum Blut deutlich unterrepräsentiert.

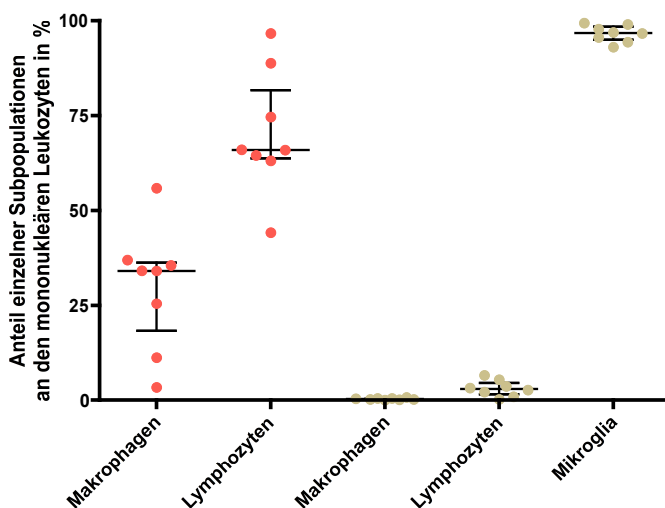


Abb. 3.6 Aufteilung der Leukozytensubpopulationen, mononukleäre Zellen, bei nicht SIV infizierten Tieren vergleichend für Blut und Gehirn. Jeder Punkt steht für eines der acht untersuchten Tiere. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Betrachtet man in einem weiteren Schritt die Lymphozytensubpopulationen, vergleichend für Blut, Gehirn und zusätzlich Cerebrospinalflüssigkeit zeigen sich auch hier deutliche Unterschiede (Abbildung 3.7). Durchschnittlich (Median) liegt der

Anteil an den Lymphozyten im Blut für B-Zellen bei 33,84%, für NK-Zellen bei 3,29% und für T-Zellen bei 61,79%. Für die mononukleären Zellen des Gehirns verschiebt sich die Zusammensetzung der Lymphozyten zugunsten der NK-Zellen. Ihr Anteil beträgt 48,69% (Median). Der Anteil der T-Zellen, 38,90% (Median) ist im Vergleich zum Blut fast um die Hälfte erniedrigt. Die B-Zellen bilden mit 4,03% (Median) die kleinste Lymphozytensubpopulation im Gehirn. Zusätzlich erfolgte für zehn andere uninfizierte Tiere eine Untersuchung der Cerebrospinalflüssigkeit (siehe Anhang, Daten Cerebrospinalflüssigkeit). Hier stellen die T-Zellen mit 93,39% (Median) den weitaus größten Anteil der Lymphozyten. Da sich aber nur sehr wenige Makrophagen und keine Granulozyten im Liquor befinden, bilden die T-Zellen sogar den Hauptanteil aller Zellen. Da dementsprechend der Anteil an B-Zellen mit 5,09% (Median) sehr gering ausfällt, findet man hier eine Übereinstimmung mit dem Gehirn. Der ebenfalls sehr niedrige Anteil an NK-Zellen, 2,37% (Median) zeigt wiederum eine Übereinstimmung mit dem Blut.

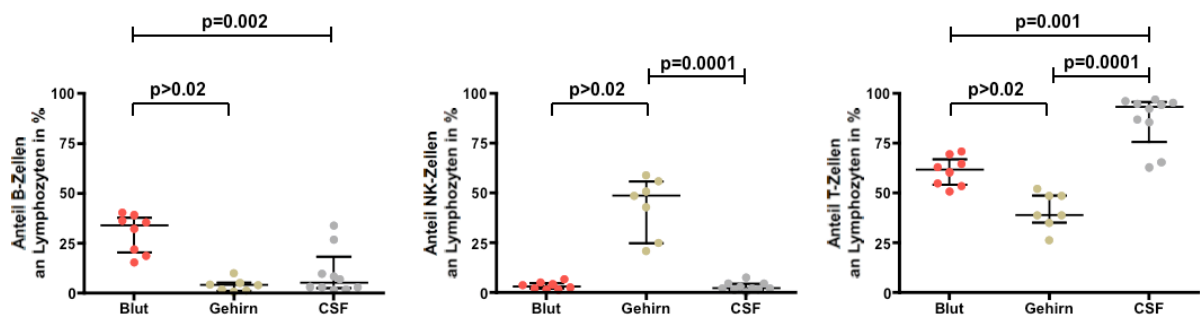


Abb. 3.7: Aufteilung der Lymphozytensubpopulationen bei nicht SIV infizierten Tieren vergleichend für Gehirn, Blut und Cerebrospinalflüssigkeit. Jeder Punkt steht für eines der acht untersuchten Tiere. Von einem Tier konnten keine Daten für das Gehirn erhoben werden. Für den Liquor konnten von zehn anderen Tieren Daten erhoben werden. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun und die für die CSF in grau dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet entweder einen signifikanten Unterschied zwischen Blut und Gehirn (gepaarter, nicht parametrischer Wilcoxon-Test) oder in Bezug auf die CSF (Mann-Whitney-Test). Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Die Anteile der B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen an den Lymphozyten wurden vergleichend für Gehirn und Blut mit dem gepaarten, nicht parametrischen Wilcoxon-Test (zweiseitig) statistisch überprüft. Die Unterschiede sind mit p-Werten von <0,02 signifikant. Des Weiteren konnten mit dem Mann-Whitney Test (zweiseitig) signifikante Unterschiede im Vergleich zwischen Gehirn und CSF in Bezug auf die Anteile der NK-Zellen und der T-Zellen, p-Werte von 0,0001, an den Lymphozyten

gezeigt werden. Auch im Vergleich zum Blut ist der Anteil der T-Zellen im Liquor signifikant erhöht mit $p=0,001$, dafür ist der Anteil der B-Zellen signifikant erniedrigt mit $p=0,002$ (beides zweiseitiger Mann-Whitney-Test).

3.1.3 Veränderungen der Mikrogliazellpopulation im Gehirn von SIV infizierten Tieren

Für die Zusammensetzung der Leukozyten im Gehirn konnte bei den uninfizierten Tieren gezeigt werden, dass die Mikrogliazellen den Hauptanteil stellen. Anhand dieses Normalwertes folgte eine Untersuchung der infizierten Tiere. Der Vergleich des durchschnittlichen Anteils (Median) der Mikrogliazellen an den Leukozyten zeigt für die Gruppe der asymptomatischen Tiere, 95,34%, und für die Gruppe der an AIDS erkrankten Tiere, 96,23%, keinen Unterschied in Bezug auf die Gruppe der uninfizierten Tiere, 96,76%, auf (siehe Abbildung 3.8).

Für die Gruppe der Neuro-AIDS Tiere fällt der Anteil der Mikrogliazellen an den Leukozyten auf 76,03% (Median). Damit liegt der Anteil der Mikrogliazellen an den Leukozyten für jedes einzelne Tier in dieser Gruppe unter 92,15%, dem Mittelwert mit doppelter Standardabweichung der uninfizierten Tiere. Die statistische Analyse mit dem Mann-Whitney-Test (zweiseitig) ergab einen p-Wert von 0,0007. Dieser signifikante Unterschied ist auf die Infektions bedingten Entzündungen zurückzuführen, welche zur Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten in das Gehirn führen. In der Gruppe der Neuro-AIDS Tiere gibt es einen seit über neun Jahren infizierten Langzeitüberlebenden (Abbildung 3.8 dunkelblau). Bei diesem Tier beträgt der Anteil der Mikrogliazellen an den Leukozyten nur noch 47,78%. Drei der verbleibenden fünf Tiere der Neuro-AIDS-Gruppe waren mit SIV_{mac251} infiziert und wurden nach spätestens 10 Monaten seziert. Die Sektion der zwei mit SIV_{mac239} infizierten Tiere erfolgte erst nach über zwei Jahren, was Virusstamm spezifische Unterschiede im Krankheitsverlauf im Gehirn aufzeigt. In der AIDS-Gruppe gibt es ebenfalls vier Tiere bei denen der Anteil der Mikrogliazellen auf unter 92,15% abgefallen ist. Diese Tiere sind in Abbildung 3.8 hellblau hervorgehoben. Zwei der Tiere wurden mit SIV_{mac251} infiziert und nach einem Jahr Infektion seziert. Für die zwei SIV_{mac239} infizierten Tiere fand die Sektion nach zwei jähriger Infektion statt. Auch bei einem asymptomatischen Tier ist der Anteil der Mikrogliazellen mit 84,33% deutlich reduziert.

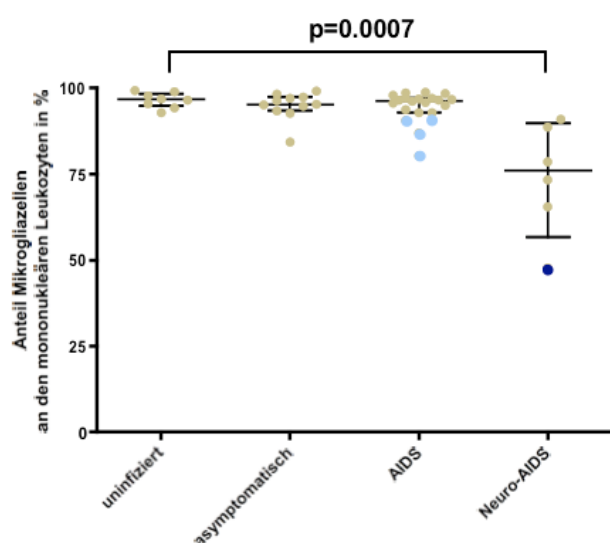


Abb. 3.8: Anteil der Mikrogliazellen an den mononukleären Leukozyten im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion. Jeder Punkt steht für eines der 46 untersuchten Tiere. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-Test) zwischen der uninfizierten und der Neuro-AIDS-Gruppe. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

3.1.4 Veränderte Expression von Oberflächenmolekülen auf Mikrogliazellen im Verlauf der SIV-Infektion

Für insgesamt 46 Tiere, sieben nicht SIV infizierte, zwölf asymptomatische, 20 an AIDS erkrankte und sieben an AIDS erkrankte Tiere mit SIV induzierten Veränderungen des ZNS, fand eine genauere durchflusszytometrische Untersuchung der Mikrogliazellpopulation statt. Die Färbung war so konzipiert, dass von 36 verschiedenen Oberflächenantigenen die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (geometrisches Mittel) auf den Mikrogliazellen ermittelt werden konnte. Es wurden aber nicht für alle Tiere alle 36 Oberflächenantigene untersucht. Eine Auflistung der Oberflächenantigene sortiert nach den an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen befindet sich in Tabelle 3.2. In Abbildung 3.9 sind Beispiele für ein nicht auf Mikrogliazellen exprimiertes Antigen, CD21, ein schwach exprimiertes Antigen, CD29 und ein stark exprimiertes Antigen CD64 gegeben. Für alle drei wurde der Antikörper an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt. Im Anschluss wurden die Fluoreszenzintensitäten für jeden Fluoreszenzfarbstoff für jedes Tier einzeln gegen eine Negativkontrolle normalisiert. Als positiv galten alle

normalisierten Werte, die über dem Mittelwert plus doppelte Standardabweichung der Negativkontrollen lagen.

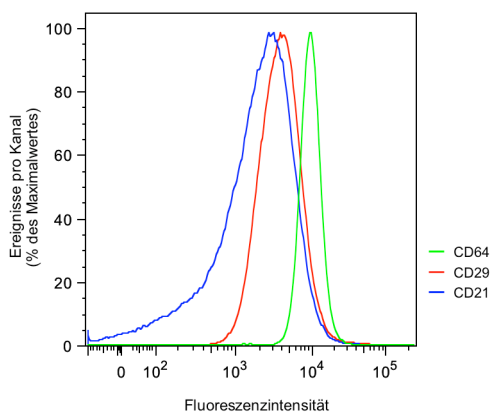


Abb. 3.9: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von drei Oberflächenantigenen auf Mikrogliazellen eines uninfizierten Tieres. Das Histogramm zeigt die unterschiedliche Expression der Antigene CD21, CD29 und CD64 anhand der Fluoreszenzintensität der an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelten Antikörper auf.

Die normalisierten Werte konnten dann innerhalb der nach Ausprägung der SIV Infektion sortierten Gruppen zusammengefasst und verglichen werden. Eine Auflistung aller Einzelwerte befindet sich im Anhang (Zusammenfassung Fluoreszenzintensitäten). Für manche Antigene konnte durch Kopplung der Antikörper an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe eine Mehrfachbestimmung erfolgen.

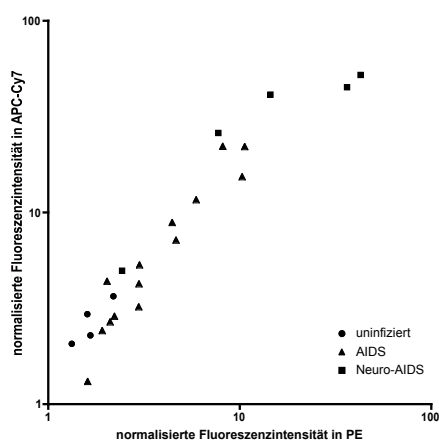


Abb. 3.10: Korrelation der für MHCII gemessenen Fluoreszenzintensitäten im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion. Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Auf der x-Achse sind die normalisierten Fluoreszenzintensitäten gemessen für den Fluoreszenzfarbstoff PE und auf der y-Achse für den Fluoreszenzfarbstoff APC-Cy7 dargestellt.

Am Beispiel von MHCII wird in Abbildung 3.10 verdeutlicht, dass diese mehrfach erhobenen Daten für jedes Antigen korrelieren ($p < 0,0001$, Spearman-Korrelation) und somit die Darstellung des Antigens bezogen auf einen Fluoreszenzfarbstoff ausreicht.

Auf nicht infizierten Mikrogliazellen findet man eine sehr starke Expression, Fluoreszenzintensität mehr als fünffach über der Negativkontrolle, von CD11b, CD45, CD64 und eine starke Expression, Fluoreszenzintensität zwei bis dreifach über der Negativkontrolle, von CD11a, CD14 und MHCII. Die normalisierten Fluoreszenzintensitätswerte sind aber als relativ zu betrachten, da sie je nach verwendetem Fluoreszenzfarbstoff variieren. So zeigt CD45 in FITC eine zwei bis dreifach, in APC eine mehr als fünffach höhere Fluoreszenz als die Kontrolle. Weiterhin werden CD29, CD31, CD49d, CD62L, CD63, CD80, CD103, CD123, CD195 auf den Mikrogliazellen uninfizierter Tiere exprimiert.

Nach Infektion bleibt die Expression von CD49d, CD62L, CD103, CD123, CD195 unverändert niedrig (Tabelle 3.1). Das Resultat ist für CD123 aber nicht eindeutig, da nur bei sechs infizierten Tieren Daten erhoben wurden. Bei drei Tieren, darunter der SIV_{mac}251 infizierte Langzeitüberlebende aus der Neuro-AIDS-Gruppe, zeigte sich eine Erhöhung gegenüber den uninfizierten Tieren. Alle Oberflächenantigene, die nach Infektion eine erhöhte Expression aufweisen, werden im Folgenden sortiert nach Fluoreszenzfarbstoffen detailliert betrachtet. Als relevante Erhöhung wurde ein Anstieg der durchschnittlichen (Median) normalisierten Fluoreszenzintensität um mindestens 0,5 in mindestens einer der drei Gruppen nach Infektion festgelegt. Weiterhin werden vier erst nach Infektion exprimierte Antigene, CD45RB, CD69, CD86, CD95, untersucht. Die beiden Antigene CD11c und CD183 bilden einen Grenzfall, da sie nur auf den Mikrogliazellen des SIV_{mac}251 infizierten Tieres mit langsamen Krankheitsverlauf aus der Neuro-AIDS-Gruppe nachgewiesen werden konnten.

Zusätzlich wird CD11b mit aufgeführt. Es ist eines der am stärksten exprimierten Oberflächenproteine auf Mikrogliazellen und weist nach der Infektion als einziges untersuchtes Antigen eine Tendenz zu niedrigerer Expression auf. Für die mehrfach untersuchten Antigene erfolgt die Darstellung bei CD86 nur in PE, CD45 nur in APC, MHCII nur in APC-Cy7 und CD69 nur in ECD.

Über die Expression von sieben auf den Mikrogliazellen nachgewiesenen Oberflächenantigenen wurden noch keine Studien publiziert.

Tab. 3.2: Auf Mikrogliazellen untersuchte Oberflächenantigene Einteilung erfolgte anhand der an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe. Dargestellt sind die normalisierten Daten der Fluoreszenzintensität vergleichend für uninfizierte und infizierte Tiere mit Bezug auf die Literatur.

Floureszenzfarbstoff	Oberflächenantigen	Ergebnisse		Expression bekannt
		Expression uninfiziert	infiziert	
FITC	TCRgd	-	-	nein
	CD21	-	-	nein
	CD28	-	-	ja
	CD29	+	↑	ja
	CD40	-	-	ja
	CD45	++	↑	ja
	CD45RB	-	↑	ja
	CD56	-	-	nein
	CD63	+	↑	nein
	CD64	++++	↑	ja
	CD83	-	-	nein
	CD103	+	→	nein
	PE	NKG2a	-	-
MHCII		+	↑	ja
CD11b		++++	→	ja
CD11c		-	-/+	ja
CD31		+	↑	nein
CD49d		+	→	ja
CD62L		+	→	nein
CD80		+	↑	ja
CD86		-	↑	ja
CD123		+	→	nein
CD127		-	-	nein
CD163		-	-	ja
CD183		-	-/+	nein
APC	beta7	-	-	nein
	CD1c	-	-	ja
	CD11a	++	↑	ja
	CD22	-	-	nein
	CD45	++++	↑	ja
	CD69	-	↑	nein
	CD86	-	↑	ja
	CD95	-	↑	ja
	CD195	+	→	ja
ECD	CD45RA	-	-	nein
	CD69	-	↑	nein
PerCP-Cy5.5	CD4	-	-	nein
	CD14	++	↑	nein
	CD28	-	-	ja
APC-Cy7	MHCII	++	↑	ja
	CD4	-	-	nein

- keine Expression
+ <2 fache Expression
++ 2-3 fache Expression
+++ 3-5 fache Expression

Es handelt sich dabei um die bei uninfizierten Tieren schwach exprimierten Proteine CD31, CD62L, CD63, CD103 und 123, um CD69 nach Infektion sowie CD183 nur im SIV_{mac}251 infizierten Langzeitüberlebenden (Neuro-AIDS-Gruppe).

Die statistische Analyse wurde folgendermaßen aufgebaut. Nach Überprüfung der Normalverteilung, fand für jedes der 14 Oberflächenantigene ein Vergleich aller vier Teilgruppen gegeneinander statt. Dabei wurde die Übereinstimmung der Signifikanz von zwei Teilgruppen mit dem Mann-Whitney-Test (zweiseitig) überprüft. Das Signifikanzniveau wurde mit 0,05 festgelegt. Konnte nur für einen Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, wurde das Resultat akzeptiert. Wurde für zwei oder mehr Gruppenvergleiche mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney-Test (zweiseitig) ein p-Wert <0,05 erreicht, erfolgte eine einfache univariate Varianzanalyse (one way ANOVA). Da es sich um nicht parametrische Daten handelt wurde der Kruskal-Wallis-Test, mit anschließendem DUNN-Test verwendet. Dieser Test berücksichtigt die Begrenzung des Gesamtrisikos der multiplen Gruppenvergleiche.

Im Folgenden sind innerhalb der AIDS-Gruppe die vier Tiere mit ersten Anzeichen SIV induzierter Veränderungen des ZNS hellblau hervorgehoben und innerhalb der Neuro-AIDS-Gruppe das Tier mit langsamerem Krankheitsverlauf dunkelblau.

Für die Analyse der Expression der Oberflächenantigene CD29, CD45RB, CD63 und CD64 wurden FITC-gekoppelte Antikörper verwendet (siehe Abbildung 3.11). Für das Oberflächenprotein CD29 (Median 2,05) konnte schon in der Gruppe der uninfizierten Tiere eine erhöhte Fluoreszenzintensität gegenüber der Negativkontrolle aufgezeigt werden. Doch weder für die asymptomatischen (Median 1,99) noch für die an AIDS erkrankten Tiere (Median 1,91) kam es zu einer Erhöhung der Expression. Für die Neuro-AIDS-Gruppe ist ein Anstieg des Median auf 2,8 zu verzeichnen, verursacht durch zwei der mit SIV_{mac}251 infizierten Tiere, 13255 und 13262, der aber nicht als signifikanter Unterschied bestätigt werden konnte.

CD45RB ist eines der Oberflächenantigene, das erst nach Infektion nachweisbar gegenüber der Negativkontrolle exprimiert wird. Die Gruppe der uninfizierten Tiere umfasst bei der Analyse dieses Markers nur drei Tiere, asymptomatische Tiere wurden gar nicht mit einbezogen. In der AIDS-Gruppe (Median 1,04) befindet sich die durchschnittliche Fluoreszenzintensität noch auf dem Niveau der Negativkontrolle, bei den drei Tieren der Neuro-AIDS-Gruppe (Median 2,54) ist ein

Anstieg aufgezeigt. Die drei Tiere sind mit SIV_{mac}251 infiziert und es konnte mit dem Mann-Whitney-Test ein signifikanter Unterschied ($p=0,01$) zu den Tieren der AIDS-Gruppe nachgewiesen werden.

Für CD63 war es ebenfalls nur möglich Werte aus den Gruppen AIDS und Neuro-AIDS in den Vergleich mit den nicht infizierten Tieren einzubeziehen. Für die AIDS Tiere (Median 1,31) konnte keine Veränderung nachgewiesen werden, für die Neuro-AIDS-Gruppe erneut ein Anstieg (Median 2,25). Alle vier an AIDS erkrankten Tiere mit Virus induzierten Veränderungen des ZNS waren mit SIV_{mac}251 infiziert. Für CD63 konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

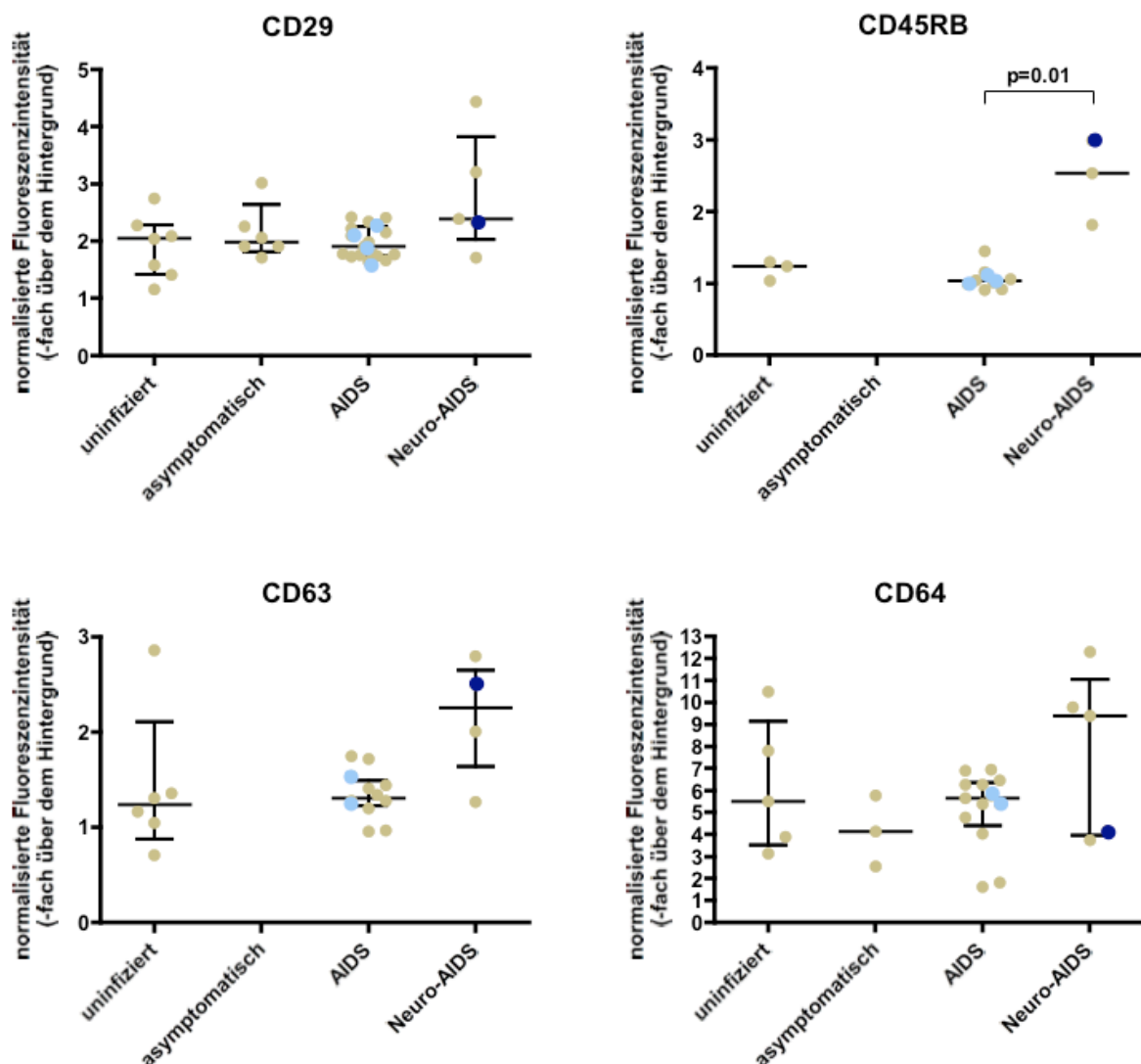


Abb. 3.11: Expression der Oberflächenantigene CD29, CD45RB, CD63, CD64 im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-Test) zwischen der AIDS und der Neuro-AIDS-Gruppe für CD45RB. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Für CD64, eines der am stärksten exprimierten Antigene auf Mikrogliazellen, wurde eine bis zu zwölffache Erhöhung der Fluoreszenzintensität gegenüber der Negativkontrolle bestimmt. Der Median für die Gruppe der nicht infizierten Tiere beträgt 5,5 hat aber eine sehr große Spannweite von drei bis elf. In den Gruppen der asymptomatischen (Median 4,14) und der an AIDS erkrankten Tiere (Median 5,65) kam es zu keinen Veränderungen. Die asymptomatische Gruppe umfasst aber nur drei Tiere und in der AIDS-Gruppe gibt es zwei Tiere mit einer sehr niedrigen Expression, beide aus demselben Experiment und fast zeitgleich seziiert (siehe Anhang, Zusammenfassung Tiere, 12532 und 12534). Für die Gruppe der Neuro-AIDS Tiere gab es einen deutlichen Anstieg der Expression (Median 9,4) verursacht durch drei der fünf Tiere. Diese drei Tiere wurden mit dem SIV_{mac}251 Virusstamm infiziert (siehe Anhang, Zusammenfassung Tiere, 13249, 13255, 13262). Bei dem Langzeitüberlebenden 8313 erfolgte die Infektion auch mit SIV_{mac}251. Das fünfte Tier der Neuro-AIDS-Gruppe wurde mit SIV_{mac}239 infiziert. Für CD64 konnten keine signifikanten Unterschiede bestätigt werden.

Die vier Tiere der AIDS-Gruppe mit beginnendem Krankheitsgeschehen im Gehirn, hellblau hervorgehoben, verhielten sich für die in Bezug auf FITC ausgewerteten Oberflächenantigene unauffällig.

Vier weitere auf Mikrogliazellen exprimierte Antigene wurden anhand der Kopplung ihrer entsprechenden Antikörper an den Fluoreszenzfarbstoff PE in einer zweiten Gruppe zusammengefasst (siehe Abbildung 3.12). Für die beiden Oberflächenantigene CD31 (Median 1,44) und CD80 (Median 1,55) konnte schon in der Gruppe der uninfizierten Tiere eine erhöhte Fluoreszenzintensität gegenüber der Negativkontrolle aufgezeigt werden. In Bezug auf den Durchschnitt der Gruppe zeigt das uninfizierte Tier 9292 eine auffallend erhöhte Expression von CD31. Im Verlauf der Infektion kommt es bei den asymptomatischen (Median 1,22, nur zwei Tiere) und bei den an AIDS erkrankten Tieren (Median 1,39) zu keinen Veränderungen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten. Drei der vier Tiere der Neuro-AIDS-Gruppe zeigen gegenüber allen anderen Tieren einen deutlichen Anstieg der CD31 Expression. Diese Tiere wurden mit SIV_{mac}251 infiziert, wobei 8313, das Tier mit langsamen Krankheitsverlauf, den niedrigsten Wert hat. Das vierte, unveränderte Tier wurde mit SIV_{mac}239 infiziert. Die Gruppe der an AIDS erkrankten Tiere mit Virus

induzierten Veränderungen des Gehirns weist einen signifikanten Unterschied zur Gruppe der AIDS-Tiere auf, mit einem p-Wert von 0,01 (Mann-Whitney-Test).

Zwischen der Gruppe der nicht infizierten Tiere und den beiden Gruppen der asymptomatischen und der an AIDS erkrankten Tiere gibt es auch für CD80 keine auffällige Veränderung der Expression. Die Mediane sind mit 1,55 (uninfiziert), 1,33 (asymptomatisch) und 1,75 (AIDS) eng bei einander liegend. Fünf der AIDS-Tiere zeigen einen Anstieg der Expression.

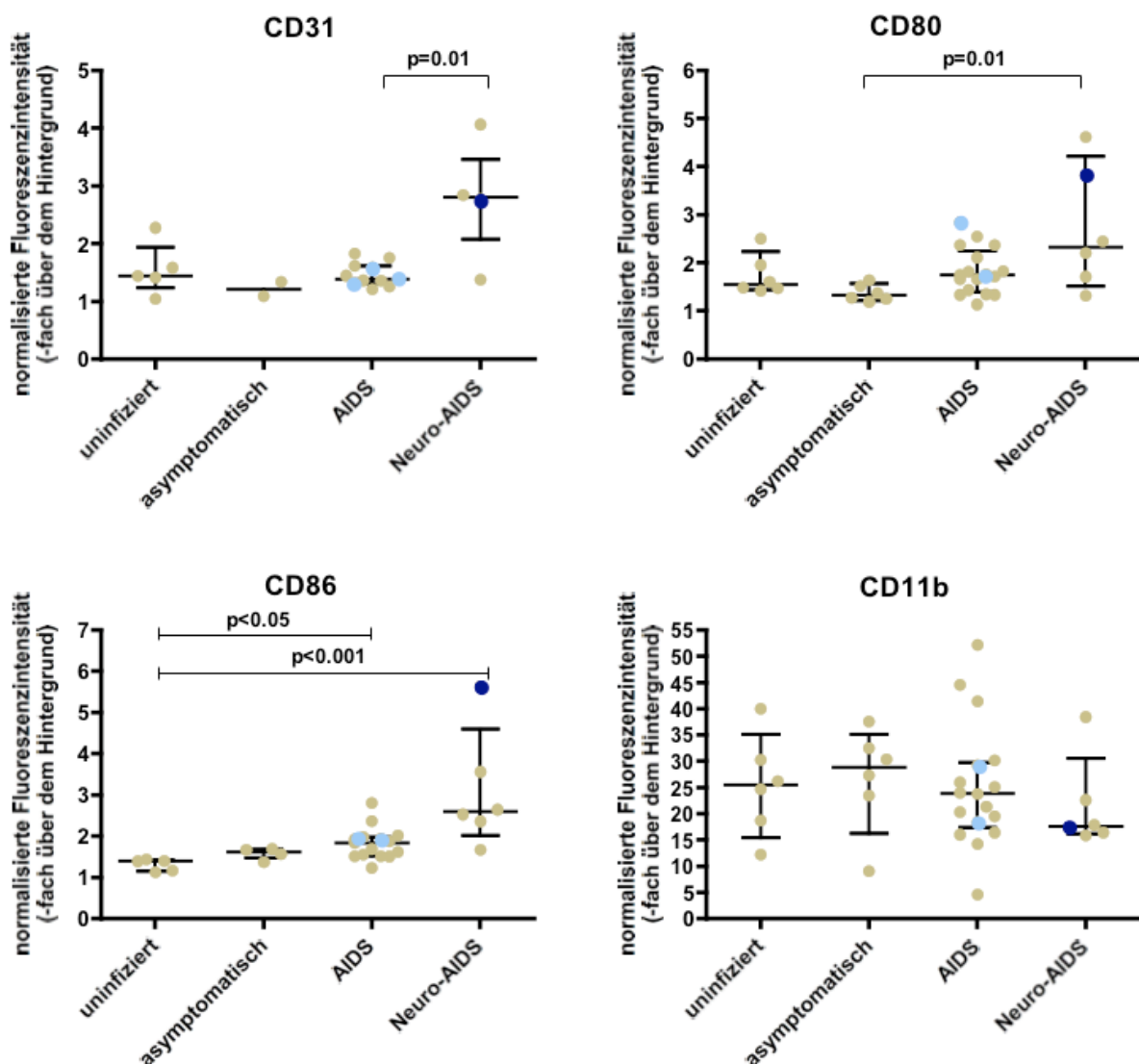


Abb. 3.12: Expression der Oberflächenantigene CD31, CD80, CD86 und CD11b im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion. Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-Test) zwischen der AIDS und der Neuro-AIDS-Gruppe für CD31, zwischen der asymptomatischen und der Neuro-AIDS-Gruppe für CD80 oder der uninfizierten Gruppe gegenüber den Gruppen AIDS und Neuro-AIDS (Varianzanalyse mit Dunn-Test) für CD86. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

In der Gruppe der Neuro-AIDS-Tiere zeigen zwei Tiere keinen Anstieg der Expression, diese Tiere wurden mit SIV_{mac}239 infiziert. Zwei weitere Tiere haben genau wie die fünf erwähnten Tiere aus der AIDS-Gruppe einen leichten Anstieg der Expression. Diese Tiere und die zwei Neuro-AIDS-Tiere mit einem rund vierfachen Anstieg der Expression gegenüber der Negativkontrolle wurden mit SIV_{mac}251 infiziert. Bei den zwei Tieren mit einem deutlichen Anstieg handelt es sich um 13255 und den Langzeitüberlebenden 8313. Die Neuro-AIDS-Gruppe hat einen durchschnittlichen Faktor von 2,32 (Median) der Erhöhung der Fluoreszenzintensität und weist mit einem p-Wert von 0,01 (Mann-Whitney-Test) einen signifikanten Unterschied zur Gruppe der asymptomatischen Tiere auf.

Interessant ist CD86, ein kostimulierendes Protein das auf den Mikrogliazellen uninfizierter Tiere nicht nachgewiesen wurde und nach Infektion in seiner Expression kontinuierlich ansteigt. Der Median der Gruppen erhöht sich von 1,62 (asymptomatisch) über 1,84 (AIDS) auf 2,59 in der Neuro-AIDS-Gruppe. Zwischen der uninfizierten Gruppe und den Gruppen AIDS und Neuro-AIDS konnte mittels nicht parametrischer Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, für die AIDS-Gruppe mit $p < 0,05$ und für die Neuro-AIDS-Gruppe mit $p < 0,001$. Der Langzeitüberlebende 8313 der Neuro-AIDS-Gruppe weist mit über 5 den höchsten Wert auf, gefolgt von den drei Tieren, welche ebenfalls mit SIV_{mac}251 infiziert wurden. Die zwei mit SIV_{mac}239 infizierten Tiere weisen eine geringere Erhöhung auf.

CD11b gehört zu den sechs Oberflächenmolekülen die innerhalb dieser Untersuchungen am stärksten auf Mikrogliazellen exprimiert werden. In diesem Zusammenhang ist auch der deutliche Unterschied in der Skalierung in Abbildung 3.12 gegenüber den anderen Antigenen zu beachten. Weiterhin bildet CD11b eine Ausnahme unter allen bezüglich ihrer Fluoreszenzintensität untersuchten Oberflächenmarkern der Mikrogliazellen, da er eine Tendenz zur Abnahme im Verlauf der Infektion aufweist. Der durchschnittliche Gruppenwert (Median) gibt bei den uninfizierten Tieren eine um den Faktor 25,44 höhere Fluoreszenzintensität gegenüber der Negativkontrolle an. Für die asymptomatischen Tiere ist sie um 28,86 erhöht, für die an AIDS erkrankten Tiere um 23,79 und für die Tiere der Neuro-AIDS-Gruppe um 17,6. Die sehr große Spannweite von zehn bis 40 innerhalb der Gruppe der nicht infizierten Tiere erschwert aber den Nachweis signifikanter Unterschiede. Die große Spannweite bleibt auch nach Infektion bestehen. Das auffallend niedrige

asymptomatische Tier 2231, ist mit SIV_{mac}239 infiziert. Innerhalb der AIDS-Gruppe gibt es drei Tiere mit auffallend hohen Werten (2141, 2187, 12532), alle drei mit SIV_{mac}239 infiziert, und ein Tier mit auffallend niedrigem Wert (12534), ebenfalls mit SIV_{mac}239 infiziert. Bei den Neuro-AIDS Tieren sind vier der sechs Tiere auf einen Wert unter 18 abgefallen. Die zwei Tiere mit den hohen Werten, 13255 und 13262, wurden mit SIV_{mac}251 infiziert. Für CD11b konnten keine signifikanten Unterschiede bestätigt werden.

Die vier Tiere der AIDS-Gruppe mit beginnendem Krankheitsgeschehen im Gehirn, hellblau hervorgehoben, verhielten sich für die in Bezug auf PE ausgewerteten Oberflächenantigene unauffällig.

In der dritten Gruppe fand die Zuordnung durch Kopplung der entsprechenden Antikörper an die Fluoreszenzfarbstoffe APC und APC-Cy7 statt (siehe Abbildung 3.13). In dieser Gruppe werden drei der am stärksten exprimierten Antigene auf Mikrogliazellen CD11a, CD45 und MHCII, sowie CD95 zusammengefasst. Für CD11a und CD45 konnten keine signifikanten Unterschiede nach Infektion aufgezeigt werden.

Für das Oberflächenantigen CD11a erfolgt ein Anstieg der Fluoreszenzintensität, von 3,69 (Median) für die nicht infizierten Tiere, auf 4,43 (Median) für die asymptotischen beziehungsweise 4,36 (Median) für die an AIDS erkrankten Tiere. Der geringe Anstieg der Expression der beiden anderen Gruppen nach Infektion zeigt sich auch für zwei der vier Tiere aus der Neuro-AIDS-Gruppe, den Langzeitüberlebenden 8313 und 12539, mit SIV_{mac}239 infiziert. Die zwei mit SIV_{mac}251 infizierten Tiere mit schnellem Krankheitsverlauf zeigen einen deutlichen Anstieg der Expression und führen zu einem erhöhten Median von 6,62 für die Neuro-AIDS-Gruppe.

Das neben CD11b am stärksten auf den Mikrogliazellen exprimierte Oberflächenantigen ist CD45. Hier weisen die asymptotischen Tiere (Median 28,1) sowohl gegenüber den uninfizierten Tieren (Median 19,47) als auch gegenüber den an AIDS erkrankten Tieren (Median 22,55) eine erhöhte Fluoreszenzintensität auf. Innerhalb der Neuro-AIDS-Gruppe, mit einer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (Median) von 39,59, sind keine Virusstamm oder Krankheitsverlauf spezifischen Zusammenhänge zu erkennen. Das Tier mit der höchsten Fluoreszenzintensität 13255 ist SIV_{mac}251 infiziert, das Tier mit der

niedrigsten Fluoreszenzintensität 2194 ist SIV_{mac}239 infiziert. Von den verbleibenden vier Tieren sind drei mit SIV_{mac}251 infiziert, darunter der Langzeitprogressor 8313, und eins ist mit SIV_{mac}239.

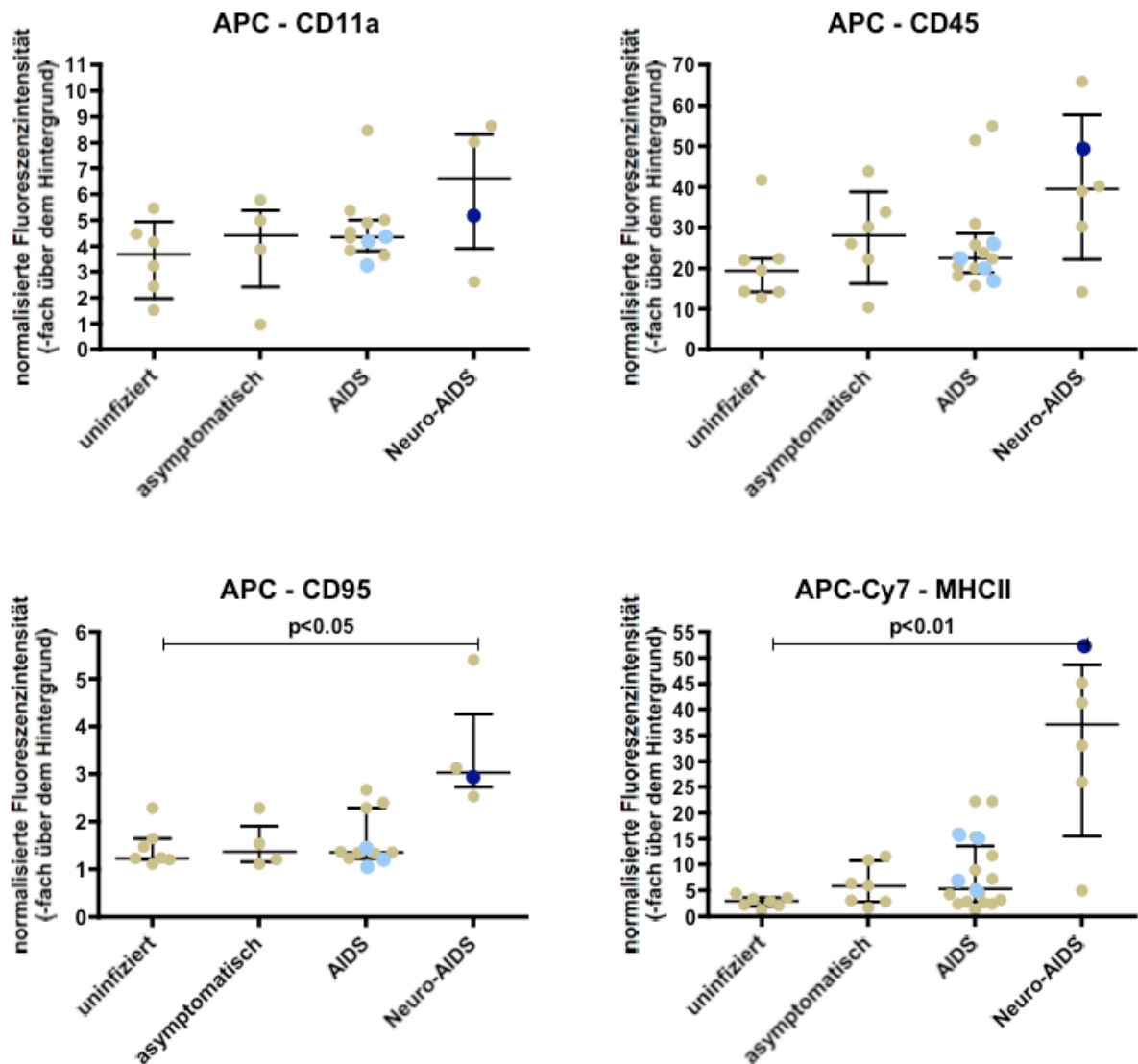


Abb. 3.13: Expression der Oberflächenantigene CD11a, CD45, CD95 in APC und MHCII in APC-Cy7 im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion. Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen der uninfizierten Gruppe gegenüber der Neuro-AIDS-Gruppe (Varianzanalyse mit Dunn-Test) für CD95 und MHCII. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Die Fluoreszenzintensität des Markers CD95 ist in den drei Gruppen uninfiziert (Median 1,24), asymptomatisch (Median 1,38) und an AIDS erkrankt (Median 1,36) sehr niedrig und zeigt nur für vereinzelte Tiere eine Erhöhung. Zwischen den vier Tieren der Neuro-AIDS-Gruppe (Median 3,04) und der Gruppe der nicht infizierten Tiere konnte mit $p < 0,05$ ein signifikanter Unterschied (Varianzanalyse mit

anschließendem Dunn-Test) nachgewiesen werden. Alle vier Tiere der Neuro-AIDS-Gruppe wurden mit SIV_{mac}251 infiziert.

MHCII wurde auf den Mikrogliazellen uninfizierter Tiere nur mit einer niedrigen Expression (Median 2,95) nachgewiesen und stieg nach Infektion kontinuierlich an. Der Median der Gruppen steigt von 5,94 (asymptomatisch) und 5,35 (AIDS) auf 37,15 in der Neuro-AIDS-Gruppe. Zwischen der uninfizierten Gruppe und der Neuro-AIDS-Gruppe konnte mittels nicht parametrischer Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert <0,01 nachgewiesen werden. Alle Tiere mit Verdacht auf ein beginnendes Krankheitsgeschehen im Gehirn befinden sich in der oberen Hälfte der Gruppe. Innerhalb der Neuro-AIDS-Gruppe weist der Langzeitüberlebende mit über 50 den höchsten Wert auf, gefolgt von zwei Tieren, die ebenfalls mit SIV_{mac}251 infiziert wurden. Die zwei mit SIV_{mac}239 infizierten Tiere weisen eine geringere Erhöhung auf. Eine Ausnahme bildet ein weiteres SIV_{mac}251 infiziertes Tier 13262, das nur eine den uninfizierten Tieren entsprechende Fluoreszenzintensität aufweist. Alle Tiere mit Verdacht auf ein beginnendes Krankheitsgeschehen im Gehirn befinden sich in der oberen Hälfte der AIDS-Gruppe.

In der vierten Gruppe sind die Oberflächenantigene CD14 und CD69 zusammengefasst (siehe Abbildung 3.14). Für CD14 ist der Antikörper an den Fluoreszenzfarbstoff PerCP-Cy5.5 gekoppelt. Innerhalb der Gruppe der nicht infizierten Tiere liegt der Median bei 1,89. Für die asymptomatischen Tiere steigt der Median auf 2,55, aber verbunden mit einer sehr großen Spannweite von eins bis sieben. Innerhalb der infizierten Tiere bleibt der Median für die an AIDS erkrankten Tiere bei 2,23 unverändert. Die Neuro-AIDS-Gruppe weist einen signifikanten Unterschied zur AIDS-Gruppe mit einem p-Wert von 0,04 (Mann-Whitney-Test) auf. Das Oberflächenantigen CD69 wird erst nach Infektion nachweisbar gegenüber der Negativkontrolle exprimiert. Die Gruppe der uninfizierten Tiere hat eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Median) von 0,98, asymptomatische Tiere wurden nicht untersucht und in der Gruppe der an AIDS erkrankten Tiere zeigen sechs von vierzehn Tieren eine gegenüber der Negativkontrolle erhöhte Fluoreszenzintensität. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Median 1,0) der AIDS-Gruppe ist noch auf dem Niveau der Negativkontrolle. Für die fünf Tiere der Neuro-AIDS-Gruppe (Median 1,36) ist eine schwache Erhöhung der Expression zu

erkennen. Wobei das mit SIV_{mac}239 infizierte Tier eine niedrigere Fluoreszenzintensität aufweist als die vier mit SIV_{mac}251 infizierten Tiere. Zwischen der Neuro-AIDS-Gruppe und den zwei anderen Gruppen konnte mittels nicht parametrischer Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test ein signifikanter Unterschied mit p-Werten <0,05 nachgewiesen werden. Die vier Tiere der AIDS-Gruppe mit beginnendem Krankheitsgeschehen im Gehirn, hellblau hervorgehoben, verhielten sich in Bezug auf CD14 und CD69 Expression unauffällig.

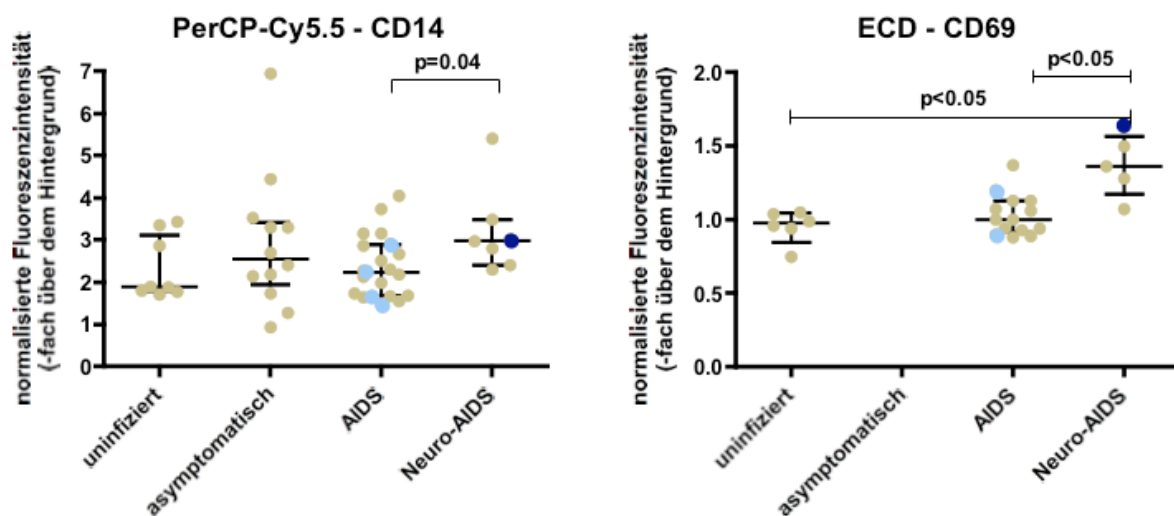


Abb. 3.14: Expression der Oberflächenantigene CD14 in PercP-Cy5.5 und CD69 in ECD im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion. Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-Test) zwischen der AIDS und der Neuro-AIDS-Gruppe für CD14 und der Neuro-AIDS-Gruppe gegenüber der uninfizierten Gruppe und der AIDS-Gruppe (Varianzanalyse mit Dunn-Test) für CD69. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

3.1.5 Veränderungen der Makrophagenpopulation im Blut und im Gehirn von SIV infizierten Tieren

Durch die Analyse von acht uninfizierten Tieren konnte der Anteil der Makrophagen an den mononukleären Leukozyten im Blut, unter Ausschluß der Granulozyten, mit 34,06% (Median) und im Gehirn mit 0,32% (Median) definiert werden. Anhand dieser Normalwerte lässt sich im Blut ein Abfall der Makrophagenpopulation bei den asymptomatischen Tieren, gefolgt von einem kontinuierlichen Anstieg bei den AIDS- und den Neuro-AIDS-Tieren aufzeigen (siehe Abbildung 3.15). Der Median der Gruppen variiert bei sehr großen Spannweiten von 34,06% (uninfiziert), über 7,09%

(asymptomatisch) und 22,10% (AIDS) bis 36,88% in der Neuro-AIDS-Gruppe. In der Neuro-AIDS-Gruppe ist der Anteil der Makrophagen für das Tier 8313 mit dem sehr langsamen Krankheitsverlauf drastisch auf unter 1% reduziert. Für die vier Tiere der AIDS-Gruppe mit beginnendem Krankheitsgeschehen im Gehirn zeigt sich eine Tendenz zur Erhöhung des Makrophagenanteils auf das Niveau des Median der Neuro-AIDS-Gruppe.

Der parallel für jedes Tier vom Gehirn gemessene Anteil der Makrophagen ist in allen vier Gruppen mit $p < 0,0001$ signifikant niedriger (Wilcoxon-Test). Der durchschnittliche Wert für die zwölf asymptomatischen Tiere liegt bei 0,82% (Median), für die zwanzig an AIDS erkrankten Tiere bei 0,55% (Median) und für die sechs Tiere der Neuro-AIDS-Gruppe bei 4,62% (Median). Zwischen der Gruppe der nicht infizierten Tiere und der Neuro-AIDS-Gruppe besteht ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $< 0,01$ (nicht parametrische Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test). Für die AIDS-Tiere konnte mit dieser Analyse keine signifikante Erhöhung gegenüber den uninfizierten Tieren gefunden werden.

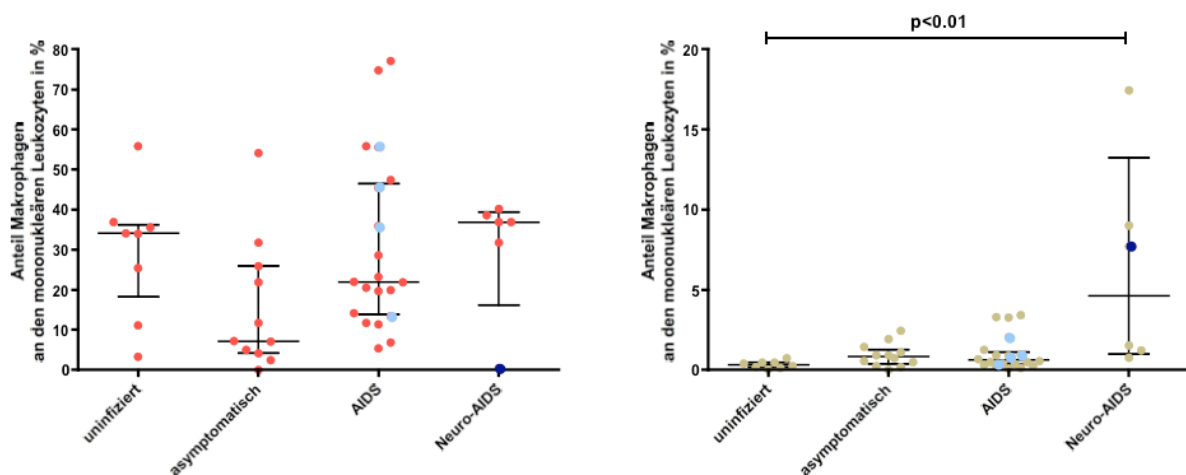


Abb. 3.15: Anteil der Makrophagen an den mononukleären Leukozyten in Gehirn und Blut sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für eines der 46 untersuchten Tiere. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Innerhalb der Neuro-AIDS-Gruppe kommt es nur bei drei Tieren zu einem deutlichen Anstieg des Anteils der Makrophagen an den mononukleären Leukozyten. Neben dem Langzeitüberlebenden 8313, blau hervorgehoben, trifft dies für die Tiere 13262 mit über 15% und 13255 zu. Alle drei sind mit SIV_{mac}251 infiziert. In der Gruppe der

an AIDS erkrankten Tiere ist der Anteil für drei Tiere auf über drei Prozent erhöht. Diese drei Tiere wurden mit SIV_{mac}239 infiziert. Auch in der asymptomatischen Gruppe gibt es mit 10943 und 12673 zwei auffällig erhöhte Tiere. Beide wurden mit SIV_{mac}251 infiziert.

3.1.6 Veränderte Expression von Oberflächenmolekülen auf Makrophagen im Verlauf der SIV-Infektion

Bei der detaillierten Betrachtung verschiedener Oberflächenantigene auf den Makrophagen, vergleichend für Blut und Gehirn, konnte eine Veränderung der CD16 Expression festgestellt werden (siehe Abbildung 3.16). Im Blut kommt es nach Infektion zu einem Anstieg von 6,35% (Median, uninfiziert) auf 13,05% (Median, asymptomatisch), 12,35% (Median, AIDS) und 14,45% (Median, Neuro-AIDS). Die durchschnittlichen Gruppenwerte nach Infektion zeigen aber keinen Unterschied in den Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit zum Krankheitsstadium auf. Aufgrund der großen Spannweite von 1% bis 30% in den Gruppen nach Infektion konnte der Anstieg nicht als signifikant nachgewiesen werden.

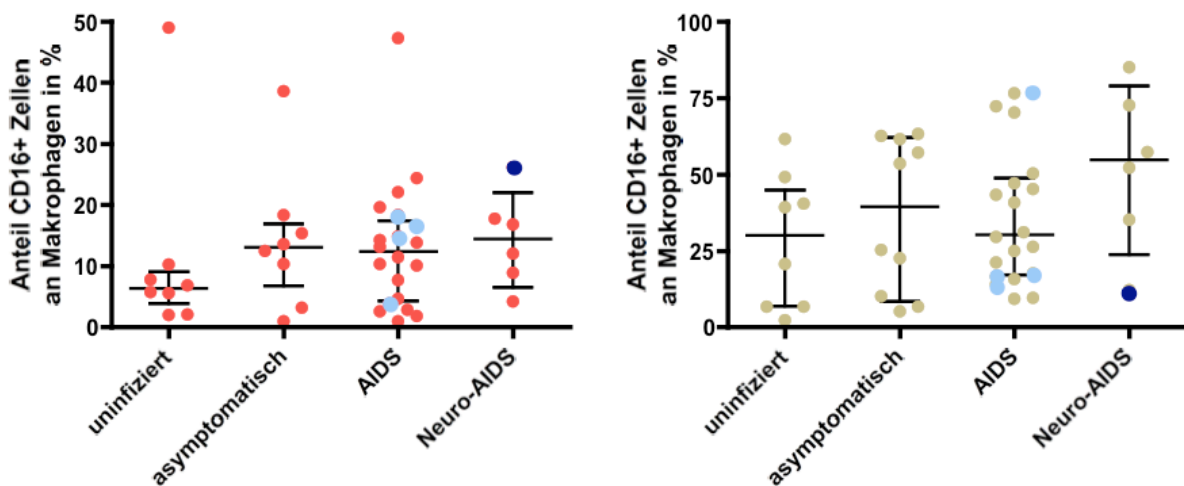


Abb. 3.16: Anteil der CD16+ Zellen an den Makrophagen in Gehirn und Blut sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Bei den nicht infizierten Tieren ist der Anteil der CD16 exprimierenden Makrophagen im Gehirn mit 30% (Median) signifikant höher als im Blut ($p < 0,001$, Wilcoxon-Test). Die Expression von CD16 nach Infektion wird aber auf den Makrophagen im Blut

stärker erhöht als im Gehirn. Aufgrund der sehr großen Spannweite von 5% bis 85% ließ sich weder der Anstieg der CD16 Expression nach Infektion über die Mediane (uninfiziert 30,00%, asymptomatisch 39,40%, AIDS 30,25%, Neuro-AIDS 54,75%) noch ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen im Gehirn aufzeigen. Aber in der Neuro-AIDS-Gruppe haben vier von sechs Tieren mit über 50% CD16 exprimierenden Zellen eine deutliche Erhöhung gegenüber dem Durchschnitt aller Tiere. Das Tier 8313, dunkelblau hervorgehoben in Abbildung 3.16, hat im Blut den größten und im Gehirn den kleinsten Anteil an CD16 positiven Makrophagen innerhalb der Neuro-AIDS-Gruppe.

3.1.7 Zusammensetzung der infiltrierenden Lymphozyten im Gehirn von SIV infizierten Tieren

Die Analyse der Mikrogliazellen im Gehirn zeigte nach Infektion eine signifikante Reduzierung des Anteils an den mononukleären Leukozyten von 96,76% auf 76,03% (Median). Die Makrophagenpopulation im Gehirn wird nach Infektion anteilig an den mononukleären Leukozyten erhöht, ist mit 4,62% (Median) aber weiterhin unterrepräsentiert. Anschließend wurde die Zusammensetzung der Lymphozyten im Gehirn mit der im Blut verglichen (siehe Abbildung 3.17).

Im Blut ist der Anteil der Lymphozyten an den mononukleären Leukozyten, wie schon einleitend in Abschnitt 3.1.2 für die uninfizierten Tiere gezeigt, über alle vier Gruppen höher als im Gehirn. Der Anteil der Lymphozyten ist in der asymptomatischen Gruppe auf durchschnittlich 92,83% (Median) angestiegen. Es folgt bei der AIDS-Gruppe mit 78,04% (Median) und der Neuro-AIDS-Gruppe mit 63,12% (Median) ein Abfall auf das Niveau der nicht infizierten Tiere mit 65,94% (Median). Der Lymphozytenverlust konnte zwischen der asymptomatischen und der Neuro-AIDS-Gruppe mit einem p-Wert von 0,03 (Mann-Whitney-Test) als signifikant bestätigt werden.

Im Gehirn zeigt sich in den drei Gruppen nach Infektion eine andere Entwicklung als im Blut. Der Anteil der Lymphozyten an den mononukleären Leukozyten bleibt für die asymptomatischen Tiere (Median 2,61%) und die an AIDS erkrankten Tiere (Median 3,12%) gegenüber den uninfizierten Tieren (Median 2,94%) unverändert.

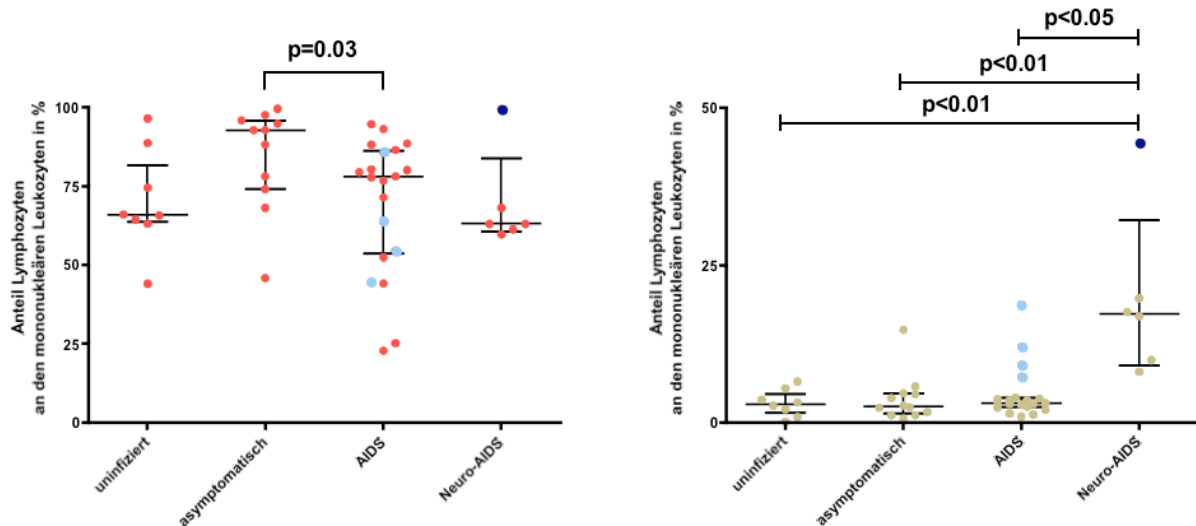


Abb. 3.17: Anteil der Lymphozyten an den mononukleären Leukozyten in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion. Jeder Punkt steht für eines der 46 untersuchten Tiere. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test) im Blut oder aller Gruppen gegenüber der Neuro-AIDS-Gruppe (Varianzanalyse mit Dunn-Test) im Gehirn. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Aber für die Tiere mit Krankheitsgeschehen im ZNS (17,24%) kommt es zu einem signifikanten Anstieg, mit $p < 0,01$ gegenüber den Gruppen uninfiziert und asymptomatisch und $p < 0,05$ gegenüber der AIDS-Gruppe (Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test). In der AIDS-Gruppe ist bei den vier Tieren mit beginnendem Krankheitsgeschehen im Gehirn der Anteil der Lymphozyten ebenfalls deutlich erhöht. Im Folgenden werden die Lymphozytensubpopulationen der B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen für die einzelnen Krankheitsstadien nach Infektion, ebenfalls vergleichend zum Blut betrachtet (siehe Abbildung 3.18).

Für die B-Zellen kommt es im Blut mit durchschnittlichen Werten (Median) von 33,84% (uninfiziert), 18,33% (asymptomatisch), 26,14% (AIDS) und 28,03% (Neuro-AIDS) zu keinen statistisch belegbaren Veränderungen. Innerhalb der Gruppen nach Infektion vergrößert sich die Spannweite aber deutlich. Das an AIDS erkrankte Tier 2188 mit über 85% B-Zellen an den Lymphozyten hat ein Lymphom (siehe Anhang, Zusammenfassung Tiere). In der Neuro-AIDS-Gruppe hat mit über 60% der Langzeitprogressor 8313 den größten B-Zell-Anteil. Der Anteil der B-Zellen im Blut ist vergleichend zum Gehirn in allen vier Gruppen mit $p < 0,0001$ signifikant höher (Wilcoxon-Test). Im Gehirn kommt es nach Infektion zu keiner anteiligen Erhöhung an den Lymphozyten. Die durchschnittlichen Werte (Median) bleiben mit 4,03% für

uninfiziert, 1,49% für asymptomatisch, 2,55% für AIDS und 6,39% für Neuro-AIDS nahezu unverändert. Die Tiere 13261 (AIDS-Gruppe) und 13255 (Neuro-AIDS-Gruppe) bilden mit über 30% die Ausnahmen, beide wurden mit SIV_{mac}251 infiziert.

Bei der zweiten untersuchten Lymphozytensubpopulation, den NK-Zellen ist der Anteil im Gehirn gegenüber dem Blut deutlich erhöht. Dieser Unterschied ist mit $p < 0,0001$ signifikant (Wilcoxon-Test). Im Blut bleibt der Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten nach der Infektion bei unter 10% unverändert. Doch obwohl die durchschnittlichen Werte (Mediane) mit 3,29% (uninfiziert), 5,25% (asymptomatisch), 6,39% (AIDS) und 7,14% (Neuro-AIDS) keine signifikanten Unterschiede aufweisen, ist in den Gruppen AIDS und Neuro-AIDS durch die vergrößerte Spannweite von 1% bis 40% eine Tendenz zur Erhöhung gezeigt. Für das Tier 12056 (AIDS-Gruppe) mit dem auffallend erhöhten NK-Zell-Anteil wurde auch im Gehirn der höchste Wert aller Tiere bestimmt. Im Gehirn kommt es nach Infektion zu einem starken Verlust an NK-Zellen. Der durchschnittliche Anteil an den Lymphozyten (Median) fällt vom Vorinfektionswert 48,69% auf 18,99% (asymptomatisch), 21,92% (AIDS) und 14,51% (Neuro-AIDS). Zwischen den drei Gruppen der infizierten Tiere wurden keine Unterschiede festgestellt, doch zwischen der Gruppe der nicht infizierten Tiere und der Neuro-AIDS-Gruppe besteht ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,0047 (Mann-Whitney-Test). Für die asymptomatische und die AIDS-Gruppe fällt auf, dass jeweils etwa die Hälfte der Tiere einen starken NK-Zell-Verlust aufweist, die andere Hälfte aber unverändert bei 50% oder mehr bleibt. Dabei konnten keine Krankheit, Virusstamm etc. spezifischen Zusammenhänge erkannt werden. In der Neuro-AIDS Gruppe gibt es nur ein Tier, 2194 mit SIV_{mac}239 infiziert, das keinen deutlichen Verlust zeigt.

Für die T-Zellen im Blut bleibt der Anteil an den Lymphozyten mit Medianen von 56,28% bis 58,11% unverändert. In den Gruppen asymptomatisch und AIDS umfasst die, gegenüber den beiden anderen Gruppen, vergrößerte Spannweite 9% bis 90%. Für die T-Zellen im Blut konnten keine signifikanten Unterschiede nach Infektion bestätigt werden. Im Gehirn kommt es nach Infektion zu einem Anstieg in allen drei Gruppen, der für die Neuro-AIDS-Gruppe gegenüber der Gruppe der uninfizierten Tiere mit $p = 0,035$, signifikant ist (Mann-Whitney-Test). Von durchschnittlichen 38,90% bei den nicht infizierten Tieren erhöht sich der Median auf 62,41% (asymptomatisch), 57,28% (AIDS) und 65% (Neuro-AIDS).

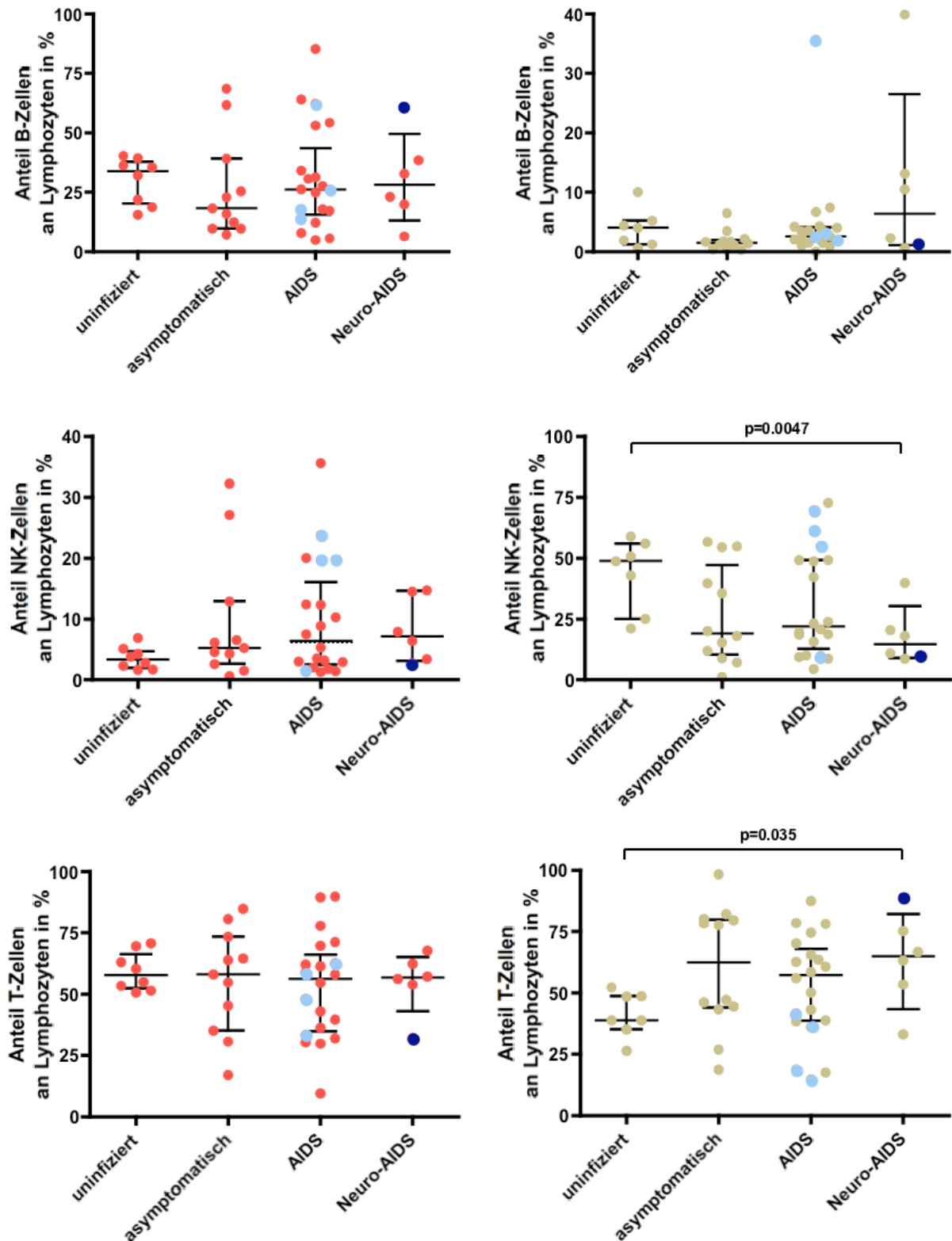


Abb. 3.18: Anteil der B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen an den Lymphozyten in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion. Jeder Punkt steht für eines der 46 untersuchten Tiere. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test) für die NK-Zellen und für die T-Zellen im Gehirn. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Vergleichend für Gehirn und Blut zeigte sich mit dem gepaarten nicht parametrischen Wilcoxon-Test in keiner der vier Gruppen ein Zusammenhang. Die vier Tiere der AIDS-Gruppe mit beginnendem Krankheitsgeschehen im Gehirn, hellblau hervorgehoben, verhielten sich in Bezug auf die ausgewerteten Subpopulationen der Lymphozyten weder untereinander noch in Bezug auf die Neuro-AIDS-Gruppe einheitlich, so dass keine Korrelationen aufgezeigt werden können.

3.1.8 Veränderte Expression von Oberflächenmolekülen auf B-Zellen im Verlauf der SIV-Infektion

Zwei der untersuchten Oberflächenantigene, CD21 und CD23, wurden nach Infektion verstärkt auf den B-Zellen exprimiert. Für beide Marker fand keine Untersuchung der Gruppe der asymptomatischen Tiere statt. Da im Blut der Anteil der B-Zellen gegenüber dem Gehirn im Mittel (Median) vier bis zwölfmal erhöht ist, werden zuerst diese Daten gezeigt (siehe Abbildung 3.19). Für 31,10% (Median) der B-Zellen nicht infizierter Tiere konnte die Expression von CD21 nachgewiesen werden. Nach Infektion kommt es in der AIDS-Gruppe mit 27,20% (Median) zu keiner Veränderung, wobei jedoch fünf der zehn untersuchten Tiere über 50% CD21 positive B-Zellen besitzen. Innerhalb der Neuro-AIDS-Gruppe ist der Anteil der CD21 positiven B-Zellen mit 90,30% (Median) signifikant mit $p < 0,05$ erhöht (Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test). Der Langzeitprogressor 8313 weist mit über 97% den höchsten Wert und nur noch positive B-Zellen für CD21 auf. Im Gehirn lässt sich die gleiche Entwicklung tendenziell auch aufzeigen, aber nicht statistisch belegen. Die Mediane der Gruppen uninfiziert (38,85%) und AIDS (31,60%) liegen unter dem der Neuro-AIDS-Gruppe (56,50). Im Gehirn hat 8313, dunkelblau hervorgehoben in Abbildung 3.19, erneut mit über 90% CD21 exprimierenden Zellen den höchsten Wert.

Für CD23 zeigt sich ein ähnliches Bild wie für CD21, nur dass in allen Gruppen die prozentualen Werte etwas niedriger sind. Im Blut steigt der durchschnittliche Anteil (Median) der CD23 exprimierenden B-Zellen von 16,80% (uninfiziert) und 22,70% (AIDS) auf 57,60% für die Tiere der Neuro-AIDS-Gruppe. In Bezug auf die nicht infizierten Tiere ist der Anstieg signifikant, $p = 0,0087$ (Mann-Whitney-Test).

Während allgemein im Blut gilt, wenn der Anteil CD21 positiver B-Zellen groß ist, dann ist der Anteil CD23 positiver B-Zellen auch groß, zeigt der Langzeitprogressor

8313 den höchsten Wert für CD21 und den niedrigsten Wert für CD23 in der Neuro-AIDS-Gruppe. Im Gehirn besteht der Zusammenhang nicht. Auch gibt es im Gehirn generell weniger CD23 positive Zellen als im Blut. Die Mediane für die Gruppen uninfiziert mit 12,50%, AIDS mit 7,41% und Neuro-AIDS mit 38,70% zeigen erneut die Tendenz zum Anstieg nach Infektion auf, diese konnte aber nicht statistisch belegt werden.

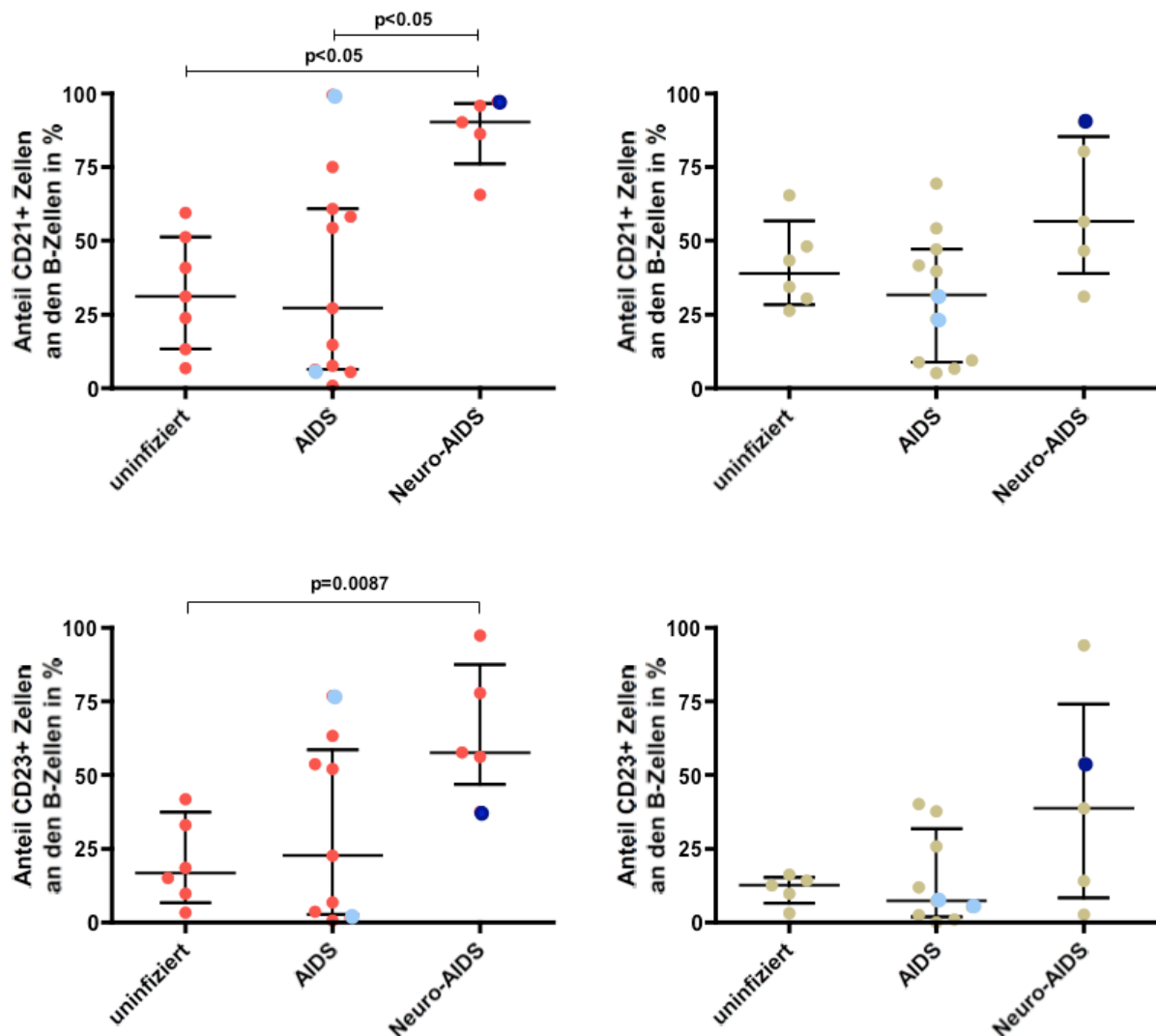


Abb. 3.19: Anteil der CD21+ und der CD23+ Zellen an den B-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test) für CD23 oder aller Gruppen gegenüber der Neuro-AIDS-Gruppe (Varianzanalyse mit Dunn-Test) für CD21. Einge tragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Ein weiteres Oberflächenmolekül, CD80, zeigt auf den B-Zellen eine gegenläufige Entwicklung zu CD21 und CD23 (siehe Abbildung 3.20). Im Blut nimmt der Anteil der CD80 positiven B-Zellen in der Neuro-AIDS-Gruppe (Median 7,77%) signifikant ab.

Gegenüber der AIDS-Gruppe (Median 57,05%) und den nicht infizierten Tieren (Median 47,40%) konnte ein Verlust mit p-Werten $<0,05$ nachgewiesen werden (Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test). Im Gehirn uninfizierter Tiere entspricht der Anteil der CD80 exprimierenden B-Zellen mit 46,50% (Median) dem im Blut. Nach Infektion verringert sich die Zahl der positiven Zellen auf 34,60% (Median) bei den an AIDS erkrankten Tieren und auf 16,00% bei den Tieren mit zusätzlichen Virus induzierten Veränderungen des ZNS. Die Abnahme war nicht signifikant. Innerhalb der Neuro-AIDS-Gruppe zeigten nur 8313 und die zwei Tiere 13255 und 13262, mit den stärksten neurologischen Veränderungen nach Infektion, eine Verringerung des Anteils positiver Zellen. Alle drei Tiere sind mit SIV_{mac251} infiziert.

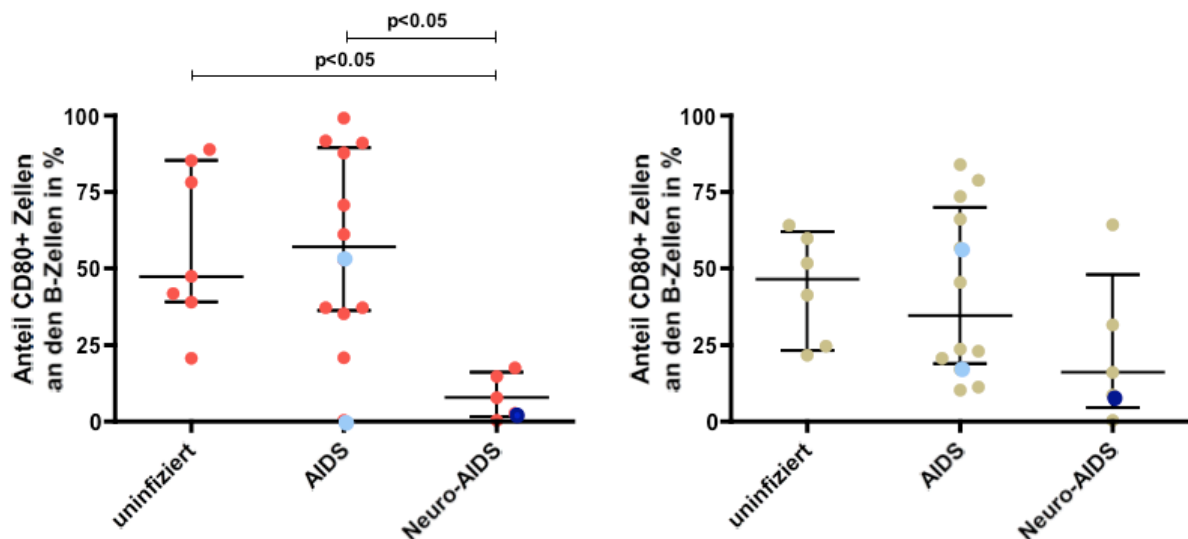


Abb. 3.20: Anteil der CD80+ Zellen an den B-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied aller Gruppen gegenüber der Neuro-AIDS-Gruppe (Varianzanalyse mit Dunn-Test) im Blut. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

3.1.9 Veränderte Expression von Oberflächenmolekülen auf NK-Zellen im Verlauf der SIV-Infektion

Die NK-Zellen sind für diese Auswertungen als CD16 positive und/oder NKG2a positive Lymphozyten definiert. Es wurden für die Eingrenzung noch weitere Kriterien herangezogen, siehe Kapitel 3.1.1. Für die anschließenden Analysen konnten die NK-Zellen anhand dieser zwei Oberflächenantigene in CD16 einfachpositive, NKG2a

einfachpositive und CD16/NKG2a doppelpositive Zellen unterteilt werden. In einem ersten Schritt wurden die CD16 positiven von den CD16 negativen NK-Zellen getrennt. In Abbildung 3.21 sind die Veränderungen für die drei Gruppen nach Infektion und die Gruppe der nicht infizierten Tiere nach der Aufteilung vergleichend für Gehirn und Blut dargestellt.

Im Blut kommt es nach Infektion erst zu einem Anstieg der CD16 exprimierenden NK-Zellen in der asymptomatischen Gruppe (Median 86,90%), gefolgt von einem Verlust auf 73,50% (Median) in der AIDS-Gruppe und 80,11% (Median) in der Neuro-AIDS-Gruppe.

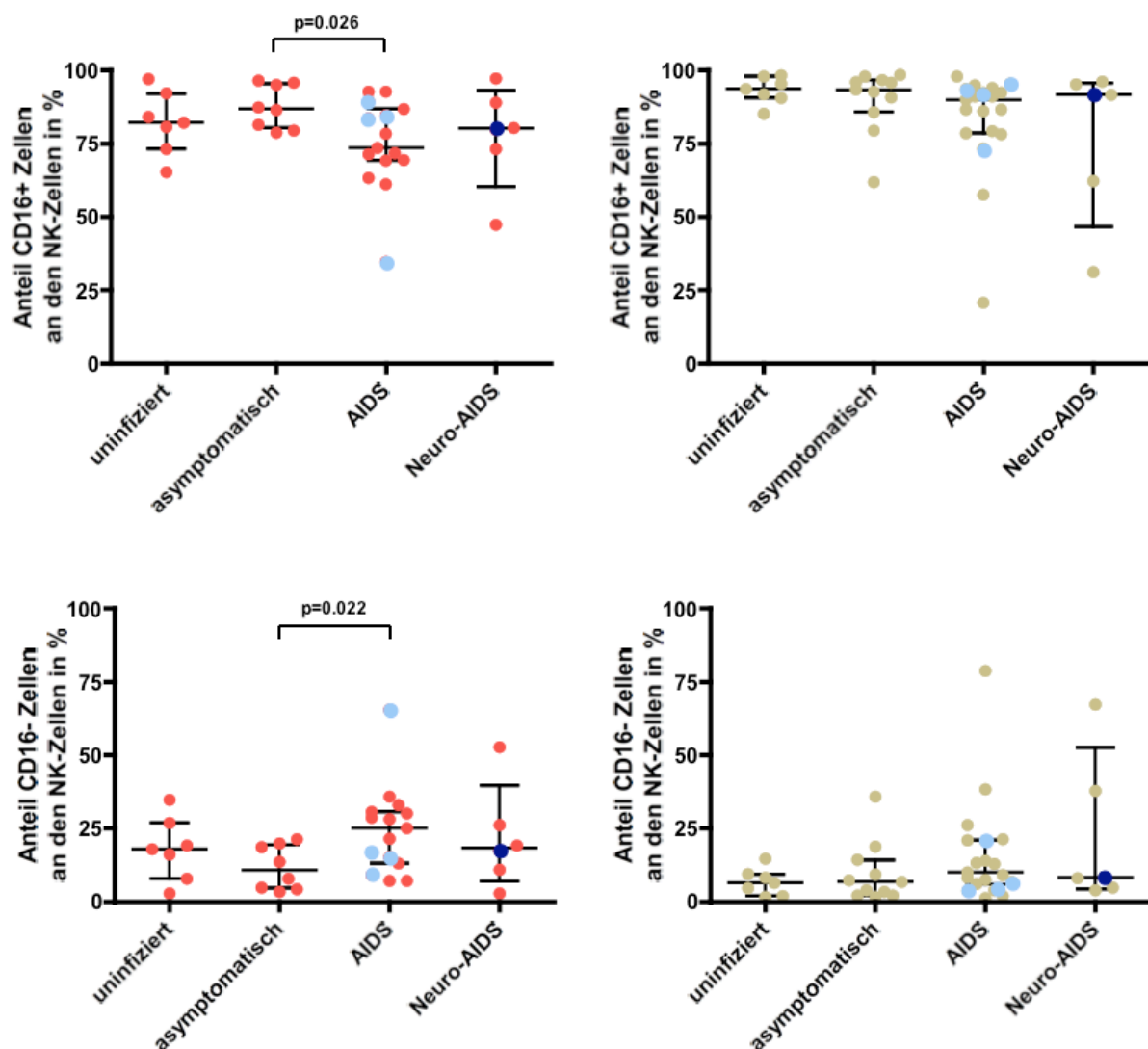


Abb. 3.21: Anteil der CD16+ Zellen beziehungsweise der CD16- Zellen an den NK-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test) im Blut. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Die Mediane der AIDS-Tiere und der Neuro-AIDS-Tiere liegen unter dem Wert der nicht infizierten Tiere. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Zwischen der asymptomatischen und der AIDS-Gruppe konnte aber ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,026 (Mann-Whitney-Test) gefunden werden.

Im Gehirn ist der durchschnittliche Anteil an CD16 positiven Zellen bei den uninfizierten Tieren mit 93,60% (Median) nicht signifikant niedriger als im Blut. Der Anteil bleibt nach Infektion nahezu unverändert mit 93,40% (asymptomatisch), 89,92% (AIDS), 91,70% (Neuro-AIDS). Allerdings erhöht sich die Varianz in den Gruppen nach Infektion parallel zum fortschreitenden Krankheitsverlauf.

Da es sich bei den CD16 negativen NK-Zellen um die NKG2a einfachpositiven Zellen handelt, bildet die Summe der CD16 positiven und der NKG2a einfachpositiven NK-Zellen die Gesamtheit aller NK-Zellen ab. Dementsprechend verhalten sich die CD16 negativen reziprok zu den CD16 positiven NK-Zellen und werden nicht näher beschrieben.

In einem zweiten Schritt wurden die CD16 positiven NK-Zellen in NKG2a positive und NKG2a negative Zellen unterteilt. Im Gehirn ist der Anteil der NKG2a negativen, CD16 positiven NK-Zellen gegenüber dem Blut in allen vier Gruppen signifikant erhöht ($p < 0,0001$, Wilcoxon-Test).

Für die nur CD16 exprimierenden NK-Zellen im Blut ist ein Verlust in der Neuro-AIDS-Gruppe zu erkennen, der sich aber nicht statistisch bestätigen lässt. Die durchschnittlichen Werte (Median) verringern sich von 21,20% (uninfiziert), über 12,70% (asymptomatisch) und 17,00% (AIDS) auf 4,19% (Neuro-AIDS). Von den Tieren mit Krankheitsgeschehen im ZNS kommt es nur beim Langzeitüberlebenden 8313 zu keiner Reduzierung. Die fünf Tiere mit einem auffällig hohen Anteil an CD16 einfachpositiven NK-Zellen 11229 (uninfiziert), 10945, 11231 und 13259 (asymptomatisch), 2145 (AIDS) haben auch im ZNS mit die höchsten Anteile.

Für das Gehirn stellt sich eine ähnliche Entwicklung dar. Aufgrund des deutlich höheren Ausgangswertes für die CD16 einfachpositiven NK-Zellen kommt es nach Infektion zu einer deutlichen Reduzierung, von 81,60% (Median, uninfiziert) auf 58,50% (Median, asymptomatisch) und 63,10% (Median, AIDS). In der Neuro-AIDS-Gruppe kommt es zu einer weiteren Reduzierung auf 33,80% (Median). Verursacht durch die sehr großen Spannweiten von 7 bis 96% lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen im Gehirn aufzeigen. Aber in der

Neuro-AIDS-Gruppe zeigen nur zwei von sechs Tieren mit über 70% CD16 exprimierenden Zellen keinen deutlichen Verlust.

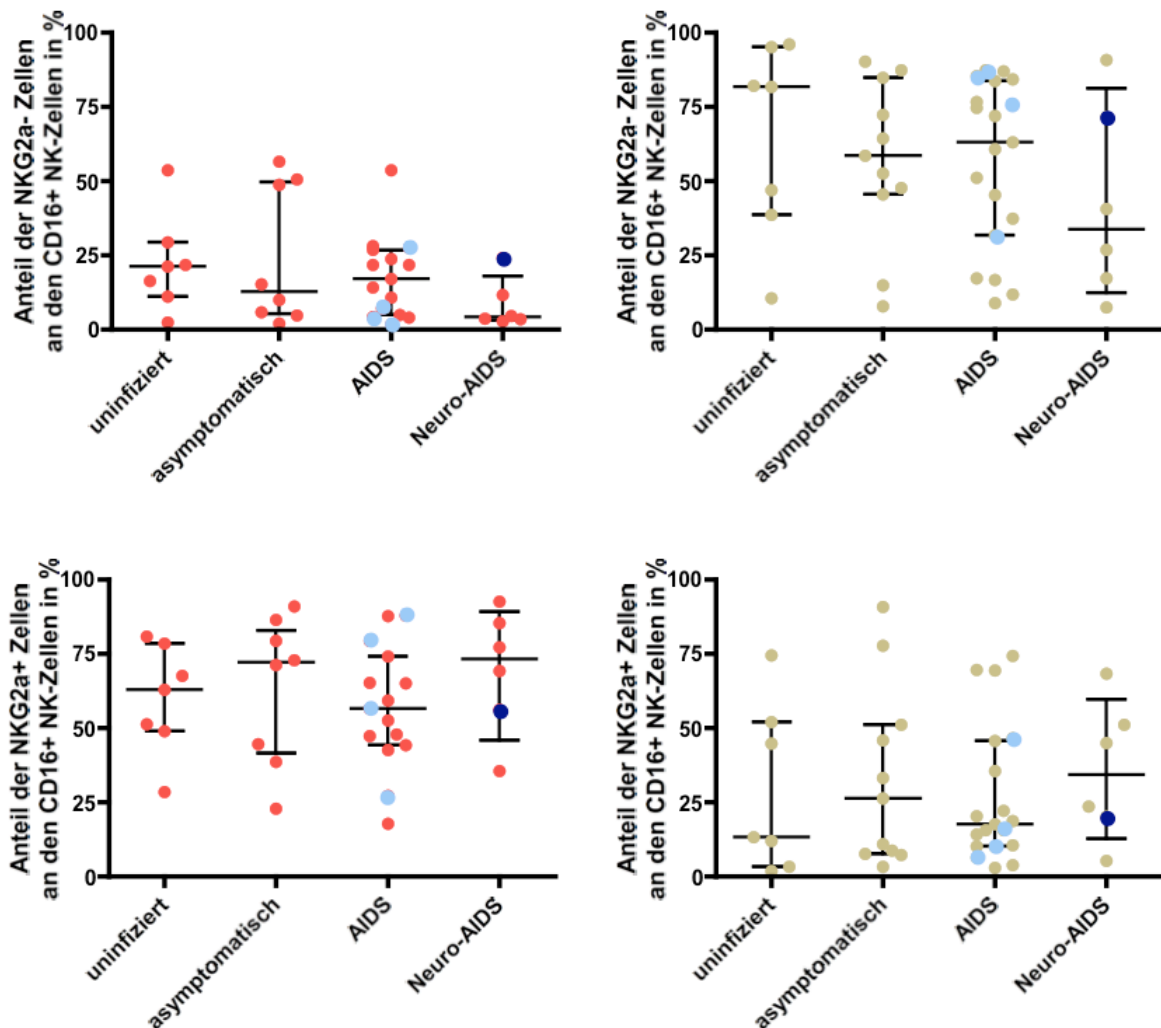


Abb. 3.22: Anteil der NKG2a+ Zellen beziehungsweise der NKG2a- Zellen an den CD16+ NK-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Wie bereits beschriebenen (siehe Kapitel 3.1.7 mit Abbildung 3.18) kommt es während der SIV-Infektion nicht nur zu Verschiebungen der einzelnen Subpopulationen innerhalb der NK-Zellen sondern auch zu einer Reduktion des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten. In Summe ergibt sich daher eine Abnahme der CD16 einfach positiven NK-Zellen an den Lymphozyten von 45,61% (Median, uninfiziert) über 12,46% (Median, asymptomatisch) und 14,03% (Median, AIDS) auf 6,13% (Median, Neuro-AIDS) (siehe Abbildung 3.23). In Bezug auf die

nicht infizierten Tiere war der Verlust in der Neuro-AIDS-Gruppe signifikant ($p=0,035$, Mann-Whitney-Test).

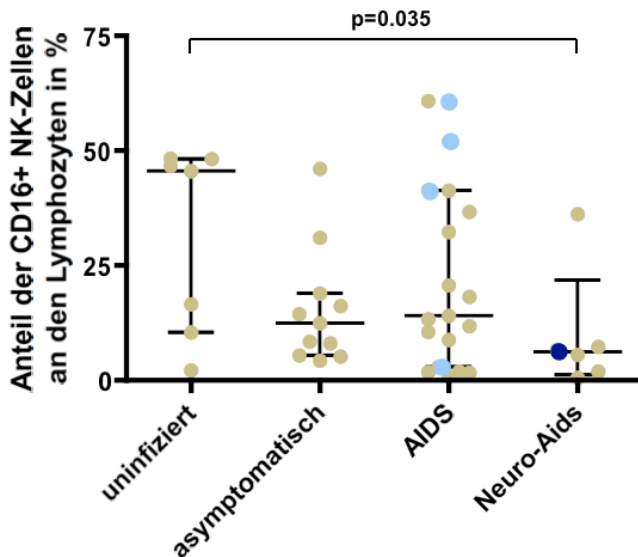


Abb. 3.23: Anteil der CD16+ NK-Zellen an den Lymphozyten im Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test). Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Die CD16/NKG2a doppelpositiven NK-Zellen (siehe Abbildung 3.22) sind im Gehirn im Vergleich zum Blut signifikant unterrepräsentiert ($p<0,0001$, Wilcoxon-Test). In Blut und Gehirn zeigt sich aber die gleiche Entwicklung für die vier betrachteten Gruppen. Die Mediane der Gruppen uninfiziert, 62,90% im Blut und 13,40% im Gehirn, und AIDS, 56,50% im Blut und 17,70% im Gehirn, sind ungefähr gleich, was auf keine Veränderung nach Infektion hinweist. Die Mediane der Gruppen asymptomatisch, 72,00% im Blut und 26,40% im Gehirn, und Neuro-AIDS, 73,20% im Blut und 34,35% im Gehirn, sind etwa gleich stark erhöht in Bezug auf die nicht infizierten Tiere. Dieser Verlauf ist verbunden mit sehr großen individuellen Unterschieden. Das macht die Benennung von Zusammenhängen in Bezug auf eine Infektion und deren statistische Analyse nicht möglich.

Bei genauerer Betrachtung der NK-Zellen fällt auf, dass schon die uninfizierten Tiere in zwei Gruppen unterschieden werden können. Bei einem Teil der Tiere findet man einen großen Prozentsatz an NK-Zellen (>30% der Lymphozyten) im Gehirn, bei den anderen einen niedrigeren. Diese Unterschiede im Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten konnten weder auf das Alter noch das Geschlecht der Tiere

zurückgeführt werden. Zudem ist der Anteil der CD16/NKG2a doppelpositiven an den NK-Zellen umso niedriger, je höher der Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten ist. Unterteilt man alle Tiere, unabhängig von einer SIV-Infektion und deren Auswirkungen, in zwei Gruppen mit weniger und mehr als 30% NK-Zellen an den Lymphozyten, ist der Unterschied signifikant (siehe Abbildung 3.24). Die Gruppe mit unter 30% NK-Zellen hat einen durchschnittlichen Anteil (Median) von 35,6% CD16/NKG2a positiven NK-Zellen. Der Anteil in der Gruppe mit über 30% NK-Zellen ist mit 12,7% CD16/NKG2a positiven NK-Zellen mit einem p-Wert von 0,024 (Mann-Whitney-Test) deutlich niedriger. Wenn also der Anteil der NK-Zellen im Gehirn niedrig ist, entspricht die Zusammensetzung der NK-Zellen ungefähr der im Blut. Je stärker der Anteil der NK-Zellen im Gehirn erhöht ist, desto größer ist auch der Unterschied in der Zusammensetzung zum Blut, bedingt durch Zunahme der CD16 einfachpositiven NK-Zellen.

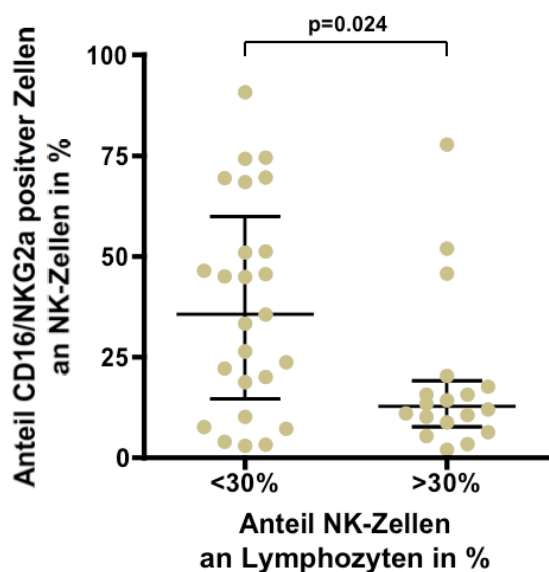


Abb. 3.24: Vergleich der Zusammensetzung der NK-Zellen in Abhängigkeit zum Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten. Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Auf der x-Achse sind zwei Gruppen, auf der y-Achse die prozentualen Anteile der CD16/NKG2a doppelpositiven Zellen an den NK-Zellen aufgetragen. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-Test). Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

3.1.10 Veränderte Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen im Verlauf der SIV-Infektion

T-Zellen können nach der Expression von verschiedenen T-Zellrezeptortypen in $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ positive T-Zellen unterschieden werden. Darüber hinaus gibt die Expression von CD4, dem Korezeptor für MHCII, oder CD8, dem Korezeptor für MHCI, Aufschluss, ob es sich um T-Helferzellen beziehungsweise zytotoxische T-Zellen handelt.

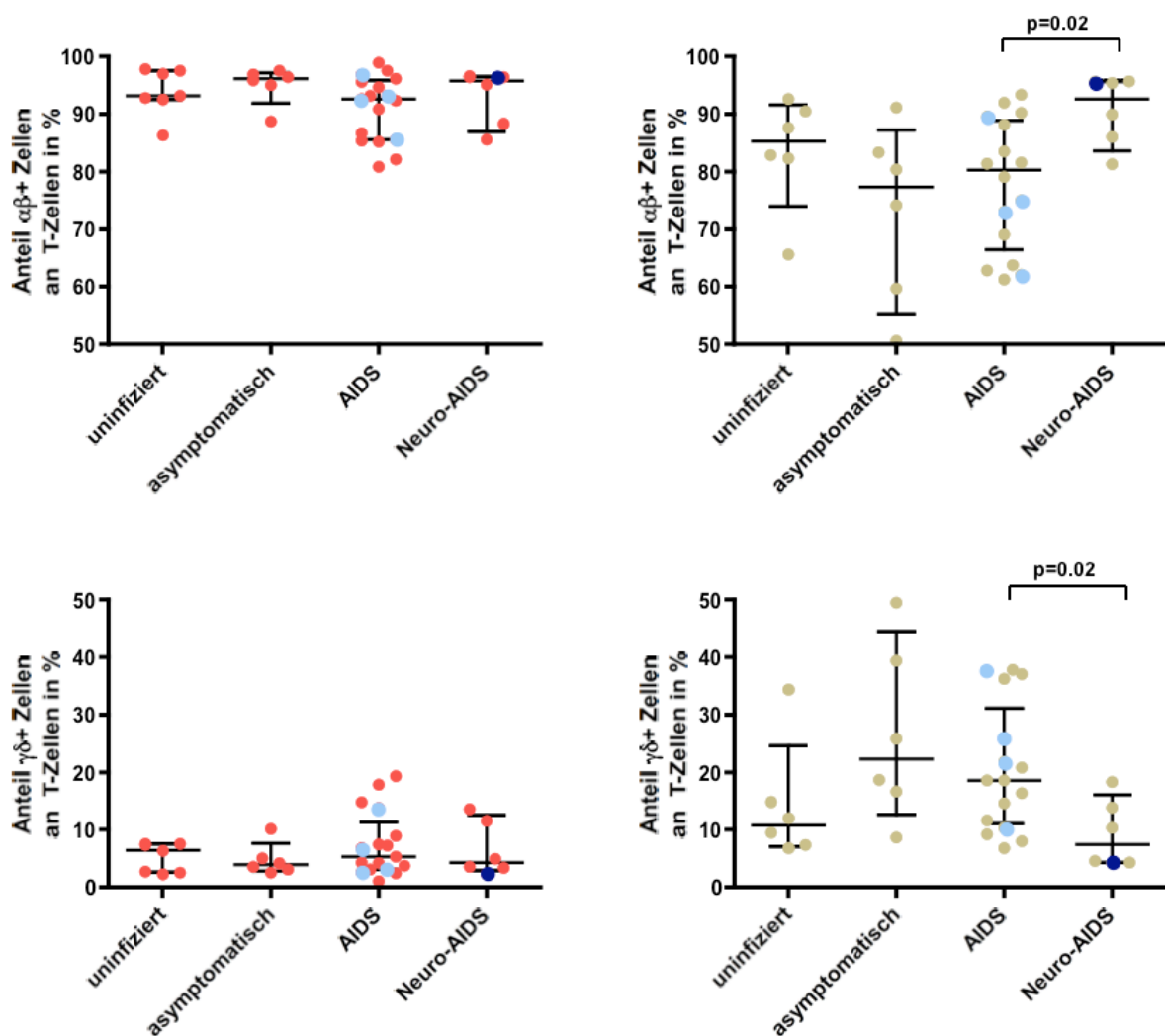


Abb. 3.25: Anteil der $\alpha\beta$ TCR+ Zellen beziehungsweise der $\gamma\delta$ TCR+ Zellen an den T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion. Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test). Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Die Unterteilung in $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen zeigte (siehe Abbildung 3.25), dass bei den nicht infizierten Tieren der Anteil der $\alpha\beta$ positiven Zellen mit 93,20% (Median) im Blut und 85,25% (Median) im Gehirn überwiegt. Dementsprechend geringer repräsentiert sind mit 6,41% (Median) im Blut und 10,77% (Median) im Gehirn die $\gamma\delta$ T-Zellen. Der im Vergleich zum Blut erhöhte Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen im Gehirn, blieb bei allen infizierten Gruppen mit $p < 0,0001$ (Wilcoxon-Test) bestehen.

Im Folgenden sind innerhalb der AIDS-Gruppe die vier Tiere mit ersten Anzeichen SIV induzierter Veränderungen des ZNS hellblau hervorgehoben und innerhalb der Neuro-AIDS-Gruppe das Tier 8313 mit langsamerem Krankheitsverlauf dunkelblau.

Im Blut konnten keine Auswirkungen einer SIV-Infektion auf die Zusammensetzung der $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen ermittelt werden. Die Mediane der $\alpha\beta$ T-Zellen mit 96,15% (asymptomatisch), 92,60% (AIDS) und 95,75% (Neuro-AIDS) genau wie die Mediane der $\gamma\delta$ T-Zellen mit 3,90% (asymptomatisch), 5,34% (AIDS) und 4,26% (Neuro-AIDS) bleiben nach Infektion im Blut nahezu unverändert.

Im Gehirn kommt es für die $\alpha\beta$ T-Zellen nach Infektion zu einem Verlust auf 77,30% (Median) in der asymptomatischen Gruppe, gefolgt von einem Anstieg über 80,25% (Median) in der AIDS-Gruppe, auf 92,65% (Median) in der Neuro-AIDS-Gruppe. Der Anstieg von der AIDS- zur Neuro-AIDS-Gruppe war mit $p = 0,0203$ signifikant (Mann-Whitney-Test). Folglich kam es bei den $\gamma\delta$ T-Zellen nach Infektion im Gehirn zu einem Anstieg auf 22,25% (Median) in der asymptomatischen Gruppe, gefolgt von einem Verlust über 18,60% (Median) in der AIDS-Gruppe auf 7,48% in der Neuro-AIDS-Gruppe, was ungefähr dem Niveau der nicht infizierten Tiere entspricht. Aufgrund der großen Spannbreite von acht bis 50% Prozent und den nur jeweils sechs Tiere umfassenden Gruppen uninfiziert, asymptomatisch und Neuro-AIDS konnte erneut nur zwischen der AIDS und der Neuro-AIDS Gruppe ein signifikanter Unterschied mit $p = 0,0183$ (Mann-Whitney-Test) aufgezeigt werden.

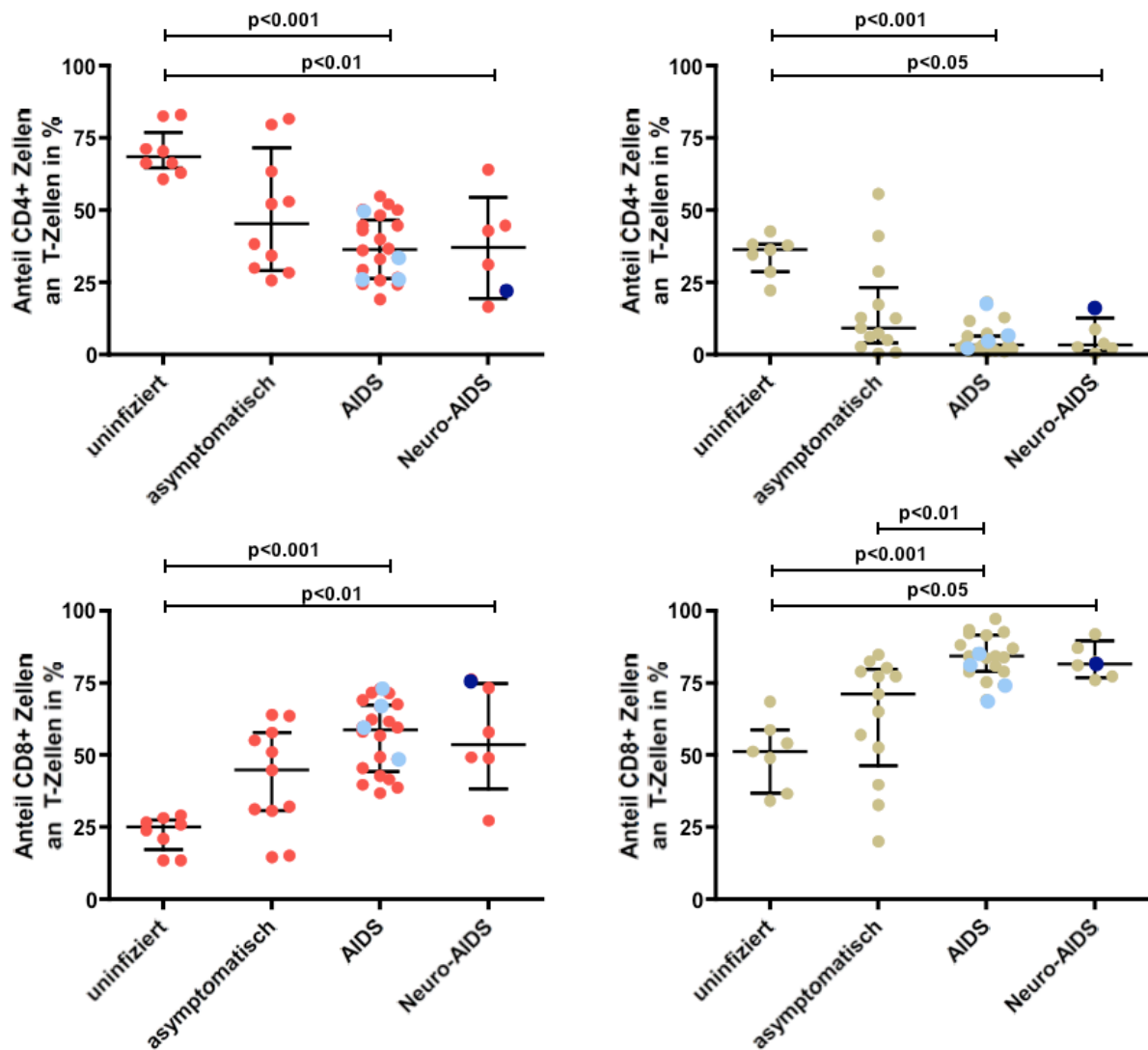


Abb. 3.26: Anteil der CD4+ Zellen beziehungsweise der CD8+ Zellen an den T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen mehreren Gruppen (Varianzanalyse mit Dunn Test). Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Die Abnahme des Anteils der CD4 exprimierenden Zellen an den T-Zellen nach Infektion konnte im Blut bestätigt werden (siehe Abbildung 3.26). Die durchschnittlichen Werte (Median) der drei Gruppen mit infizierten Tieren waren mit 44,50% (asymptomatisch), 36,35% (AIDS) und 37,10% (Neuro-AIDS) deutlich unter dem Wert 68,45% der uninfizierten Gruppe. Zwischen der Gruppe der nicht infizierten Tiere und den Gruppen AIDS ($p < 0,001$) und Neuro-AIDS ($p < 0,01$) konnte mittels nicht parametrischer Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Im Gehirn ist der Anteil der CD4 positiven T-Zellen für alle vier Gruppen signifikant niedriger als im Blut ($p < 0,0001$, Wilcoxon-Test). Der Anteil der CD4 positiven T-Zellen im Gehirn fällt von 36,40% (Median, uninfiziert) auf 9,22% (Median, asymptomatisch) und dann auf 3,31% (Median, AIDS) und 3,20% (Median, Neuro-AIDS). Damit ist die Abnahme der CD4 positiven T-Zellen im Gehirn vor allem schon in der asymptomatischen Phase stärker ausgeprägt. Die Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test zeigte erneut einen signifikanten Unterschied zwischen den nicht infizierten Tieren und den Gruppen AIDS ($p < 0,001$) und Neuro-AIDS ($p < 0,05$). Erwähnenswert ist, dass der Langzeitprogressor 8313 innerhalb der Neuro-AIDS-Gruppe im Blut mit den niedrigsten Anteil, im Gehirn jedoch den höchsten Anteil CD4 positiver T-Zellen besitzt. Im Allgemeinen sind anteilig mehr CD8 exprimierende T-Zellen im Gehirn als im Blut, was für alle vier Gruppen signifikant war ($p < 0,0001$, Wilcoxon-Test). Im Blut kam es für die asymptomatische Gruppe (Median 44,80%), die AIDS-Gruppe (Median 58,80%) und die Neuro-AIDS-Gruppe (Median 53,60%) zu einem Anstieg des Anteils der CD8 positiven T-Zellen gegenüber den nicht infizierten Tieren (Median 25,00%). Für die AIDS-Gruppe ($p < 0,001$) und die Neuro-AIDS-Gruppe ($p < 0,01$, Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test) war die Zunahme signifikant. Im Gehirn kommt es zu einem Anstieg von 51,20% (Median, uninfiziert) über 71,20% (Median, asymptomatisch) auf 84,20% (Median, AIDS) und 81,65% (Median, Neuro-AIDS). Wieder konnte mittels Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test ein signifikanter Unterschied mit p-Werten $< 0,001$ (AIDS) und $< 0,05$ (Neuro-AIDS) gegenüber der uninfizierten Gruppe nachgewiesen werden. Des Weiteren besteht zwischen den asymptomatischen und den an AIDS erkrankten Tieren ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,01$.

Im Gegensatz zu anderen Zellpopulationen ist der Anteil der T-Zellen im CSF groß genug (siehe Kapitel 3.1.2), um für den Vergleich der T-Zell-Zusammensetzung zwischen Blut und Gehirn mit herangezogen zu werden. Bei uninfizierten Tieren liegt der Anteil der CD4 positiven T-Zellen im Liquor bei durchschnittlich 50,6% (Median) (siehe Abbildung 3.27). Dieser Wert liegt unter dem im Blut 68,45% (Median) und über dem im Gehirn 36,40% (Median). Im CSF ist der Anteil der CD4 positiven T-Zellen signifikant höher als im Gehirn ($p < 0,0001$, Mann-Whitney-Test). Da nur von 19 Tieren nach Infektion Liquorproben analysiert werden konnten, wurde keine Unterteilung nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion vorgenommen.

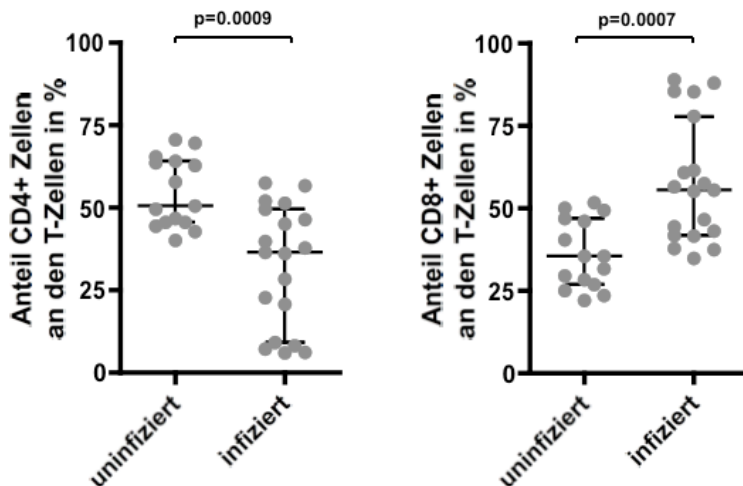


Abb. 3.27: Anteil der CD4+ Zellen beziehungsweise der CD8+ Zellen an den T-Zellen im CSF vor und nach Infektion. Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test). Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Bei den infizierten Tieren fällt der Anteil der CD4 positiven Zellen auf 36,4% (Median) signifikant ab ($p=0,0009$, Mann-Whitney-Test). Auch der Anteil der CD8 positiven Zellen liegt mit 35,4% (Median) zwischen Blut (Median 25,00%) und Gehirn (Median 51,20%), und ist signifikant niedriger als im Gehirn ($p<0,0001$, Mann-Whitney-Test). Nach Infektion kommt es zu einem signifikanten Anstieg an CD8 positiven Zellen auf 55,4% (Median), mit einem p-Wert von 0,007 (Mann-Whitney-Test).

Für die CD4 und CD8 positiven T-Zellen schloss sich ähnlich wie bei den Mikrogliazellen (siehe Kapitel 3.1.4) eine Analyse verschiedener Oberflächenantigene an. Stellvertretend werden im Folgenden die vier Marker CD28, CD69, CD183 und MHCII detailliert vorgestellt. Zuerst wurde der Normalzustand anhand der Werte von den uninfizierten Tieren definiert. In Abbildung 3.28 sind diese Daten vergleichend für Blut, Gehirn und CSF erst für die CD4 positiven und dann für die CD8 positiven T-Zellen dargestellt.

CD28, ein co-stimulatorisches Molekül wird von einem signifikant höheren Anteil der CD4 positiven T-Zellen exprimiert ($p=0,0001$, gepaarter Wilcoxon-Test). Im Blut ist der Anteil CD28 positiver CD4-T-Zellen mit 96,25% (Median) signifikant ($p=0,028$, Mann-Whitney-Test) höher als im Gehirn mit 75,75% (Median). Im Liquor liegt der Anteil bei durchschnittlich 96,5% (Median). Auch für die CD8 positiven T-Zellen ist der Anteil im Blut (Median 75,20%) am höchsten, gefolgt vom Liquor (Median 65,55%) und vom Gehirn (Median 33,22%). Nur der Unterschied zwischen Blut und

Gehirn blieb nach der Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test mit $p < 0,01$ signifikant.

Bei CD69 handelt es sich um einen frühen Aktivierungsmarker der auf den CD8 positiven T-Zellen signifikant stärker exprimiert wird ($p = 0,0001$, gepaarter Wilcoxon-Test). Dieses Oberflächenantigen wird auf den CD4 positiven T-Zellen im Blut kaum, wohl aber im Gehirn (Median 42,62%) und im Liquor (Median 50,25%) exprimiert. Ein signifikanter Unterschied gegenüber dem Blut (Median 1,45%) wurde nur für den Liquor bestimmt ($p < 0,001$, Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test). Im Gehirn war die Zahl von fünf Tieren nicht ausreichend, für einen signifikanten Nachweis. Für die CD8 positiven T-Zellen war die CD69 Expression in Gehirn (Median 69,70%) und Liquor (Median 58,7%) signifikant erhöht gegenüber dem Blut (Median 7,11%). Eine Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test ergab p-Werte $< 0,001$ (Gehirn) und $< 0,01$ (CSF).

Für CD183 konnten keine Unterschiede in der Expression zwischen CD4 oder CD8 positiven T-Zellen festgestellt werden. Auf den CD4 positiven T-Zellen im Gehirn (Median 63,10%) und Liquor (Median 75,85%) wird dieser Chemokin-Rezeptor auch höher exprimiert als im Blut (Median 27,41%). Gleiches gilt für die CD8 positiven T-Zellen mit Medianen von 56,42% (Gehirn), 86,65% (CSF) und 46,20% (Blut). Der Mann-Whitney-Test ergab nur zwischen Blut und CSF einen signifikanten Unterschied mit $p = 0,0062$ (CD4) und $p = 0,0295$ (CD8).

Als weiterer Aktivierungsmarker wurde der MHCII untersucht. Dieses Oberflächenantigen wird auf CD8 positiven T-Zellen signifikant stärker exprimiert ($p = 0,0002$, Wilcoxon-Test) als auf CD4 positiven T-Zellen. Im Blut und Gehirn uninfizierter Tiere gibt es nahezu keine Expression von MHCII auf den T-Zellen. Dementsprechend ist der Anteil an MHCII exprimierenden CD4 positiven T-Zellen im CSF (Median 30,6%) erhöht gegenüber dem Gehirn (Median 1,80%) und dem Blut (Median 1,3%). Die Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test ergab nur für den Vergleich Blut/CSF einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$), was vermutlich wie bei der Auswertung von CD69 an der geringen Zahl untersuchter Tiere für das Gehirn liegt. Für die CD8 positiven T-Zellen war die MHCII Expression im Liquor (Median 40,15%) signifikant erhöht gegenüber dem Gehirn (Median 5,95%) mit $p < 0,05$ und dem Blut (Median 3,08%) mit $p < 0,01$ (Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test).

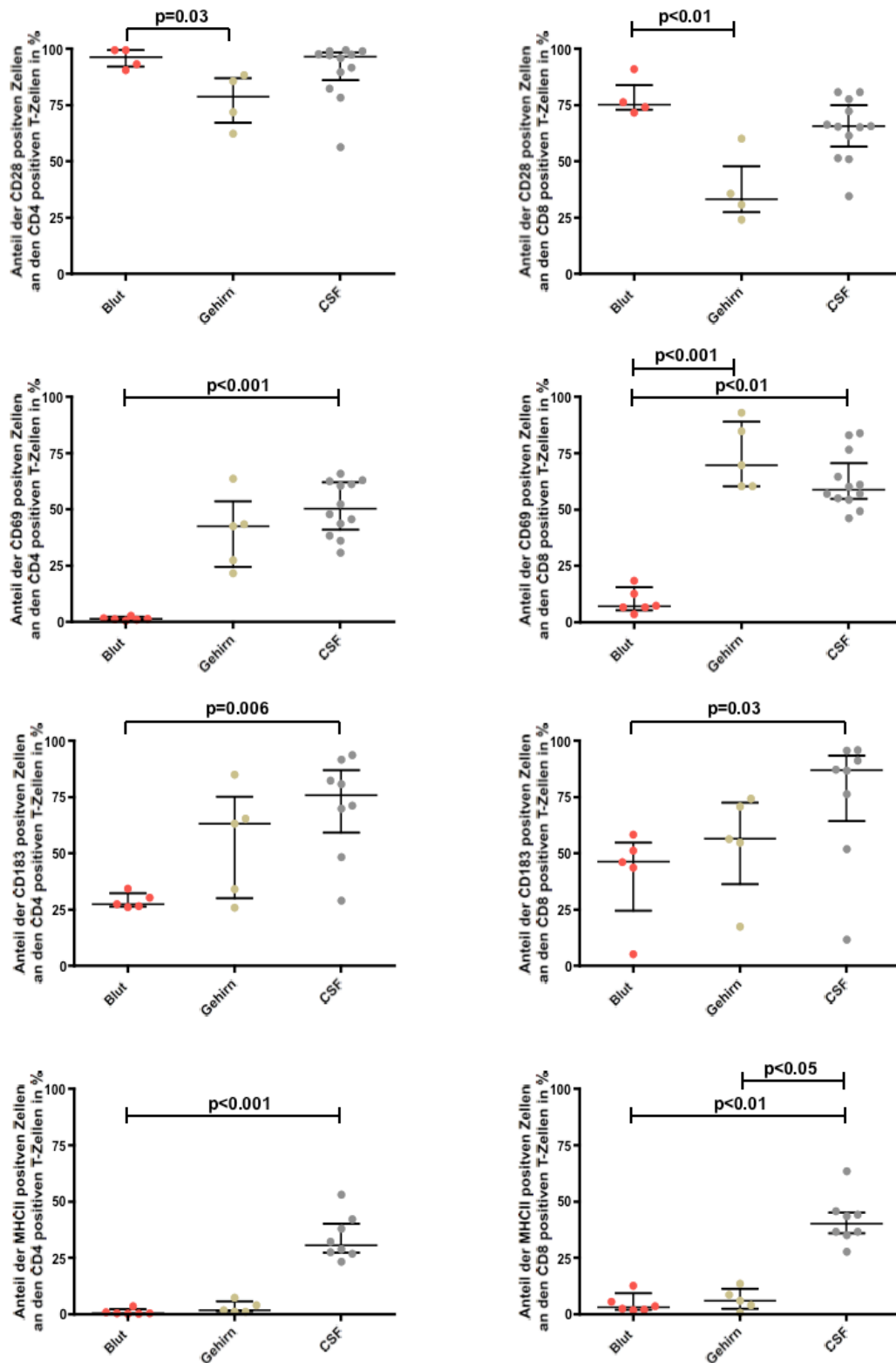


Abb. 3.28: Anteil der CD28, CD69, CD183 und MHCII positiven Zellen an den CD4+ T-Zellen beziehungsweise den CD8+ T-Zellen bei nicht SIV infizierten Tieren vergleichend für Blut, Gehirn und CSF. Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun und die für die CSF in grau dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test) für CD28 (CD4+) und CD183 (CD4+ / CD8+) oder mehrerer Gruppen untereinander (Varianzanalyse mit Dunn-Test) für die verbleibenden Auswertungen. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Nach Infektion wurden die Tiere in die drei Gruppen asymptotisch, AIDS und Neuro-AIDS eingeteilt. Es konnten jedoch nur bei der Auswertung von MHCII asymptotische Tiere mit einbezogen werden. Da im Liquor keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten, wurde auf die Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet.

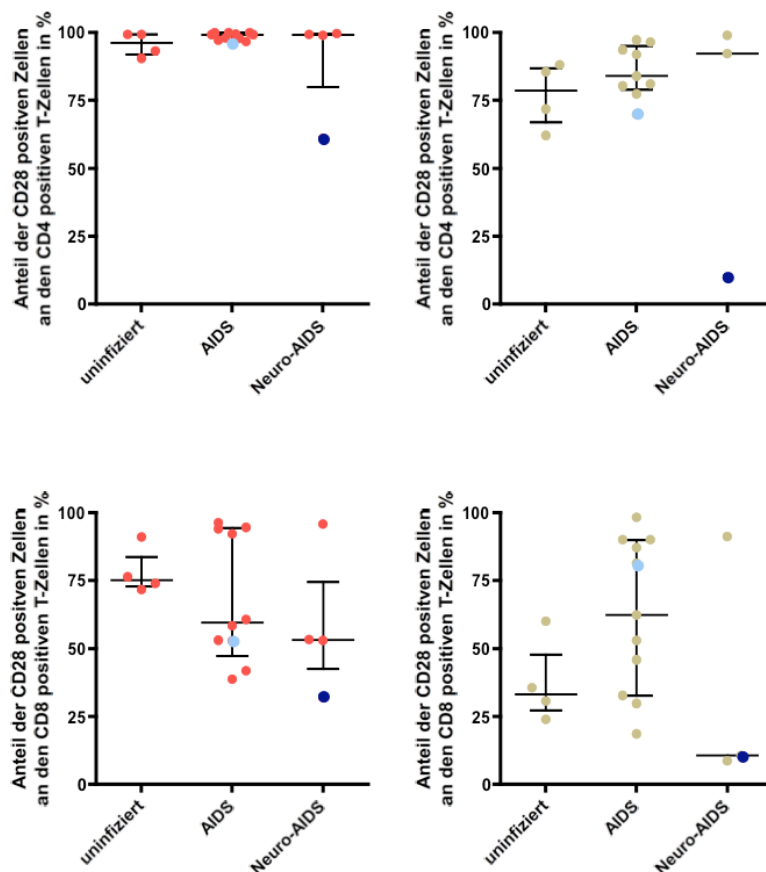


Abb. 3.29: Anteil der CD28 positiven an den CD4+ beziehungsweise den CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Die CD28 Expression bleibt auf den CD4 positiven T-Zellen nach Infektion im Blut mit Medianen von 99,20% (AIDS) und 99,09% (Neuro-AIDS) unverändert hoch (siehe Abbildung 3.29). Im Gehirn kommt es zu einem Anstieg von 75,75% (uninfiziert) über 84% (AIDS) auf 92,20% (Neuro-AIDS), der aber nicht signifikant war.

Für die CD8 positiven T-Zellen kommt es im Blut zu einem Verlust CD28 exprimierender Zellen von durchschnittlich (Median) 75,20% (uninfiziert) über 59,60% (AIDS) auf 53,16% (Neuro-AIDS). Im Gehirn kommt es zu einem Anstieg der CD28 exprimierenden Zellen von 33,22% (Median, uninfiziert) auf 62,40% (Median,

AIDS). Weder der Abfall im Blut noch der Anstieg im Gehirn waren aufgrund der großen Spannbreiten signifikant.

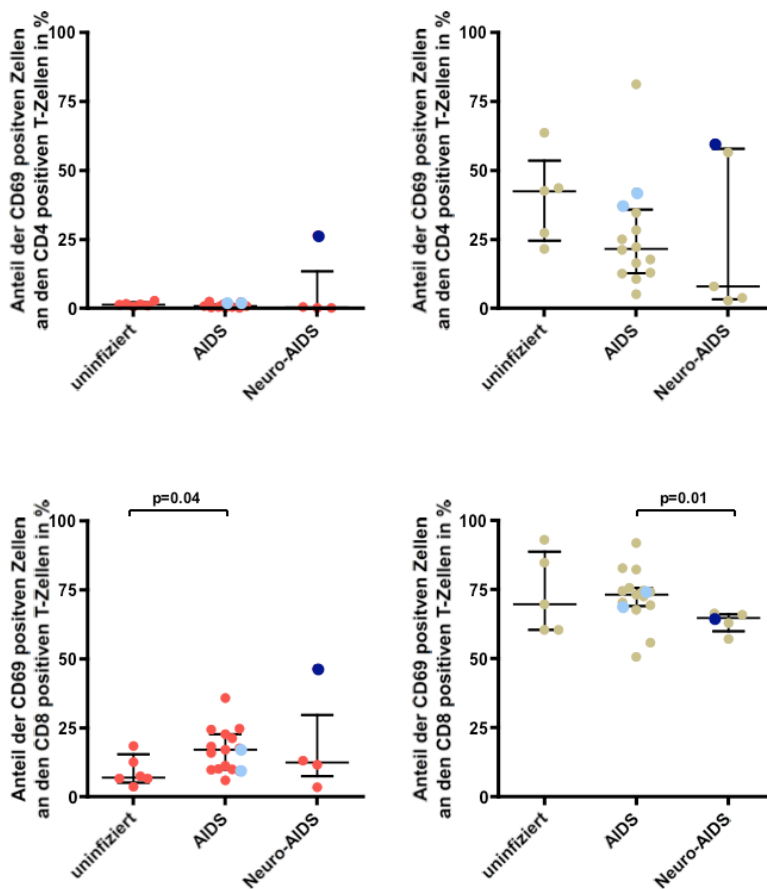


Abb. 3.30: Anteil der CD69 positiven an den CD4+ beziehungsweise den CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test) für die CD8+ T-Zellen. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Auf den CD4 positiven T-Zellen im Blut erfolgt auch nach Infektion mit Medianen von 0,94% (AIDS) und 0,39% (Neuro-AIDS) keine Expression von CD69 (siehe Abbildung 3.30). Einzige Ausnahme bildet der Langzeitüberlebende 8313 der Neuro-AIDS-Gruppe mit 26,44%. Im Gehirn kommt es zu einem Verlust von CD69 positiven Zellen von 42,62% (Median, uninfiziert) über 21,70% (Median, AIDS) auf 8,00% (Median, Neuro-AIDS), der aber nicht signifikant war.

Für die CD8 positiven T-Zellen kommt es im Blut nach Infektion zu einem Anstieg der CD69 Expression von 7,11% (Median, uninfiziert) auf 17,20% (Median, AIDS) und 12,44% (Median, Neuro-AIDS), der für die AIDS-Gruppe signifikant war ($p=0,0472$,

Mann-Whitney-Test). Im Gehirn findet sich für die AIDS-Gruppe (Median 73,20%) gegenüber den uninfizierten Tieren (Median 69,70%) keine Veränderung. Der Verlust an CD69 exprimierenden CD8 positiven T-Zellen auf 64,73% (Median) in der Neuro-AIDS-Gruppe war gegenüber der AIDS-Gruppe signifikant ($p=0,0185$, Mann-Whitney-Test).

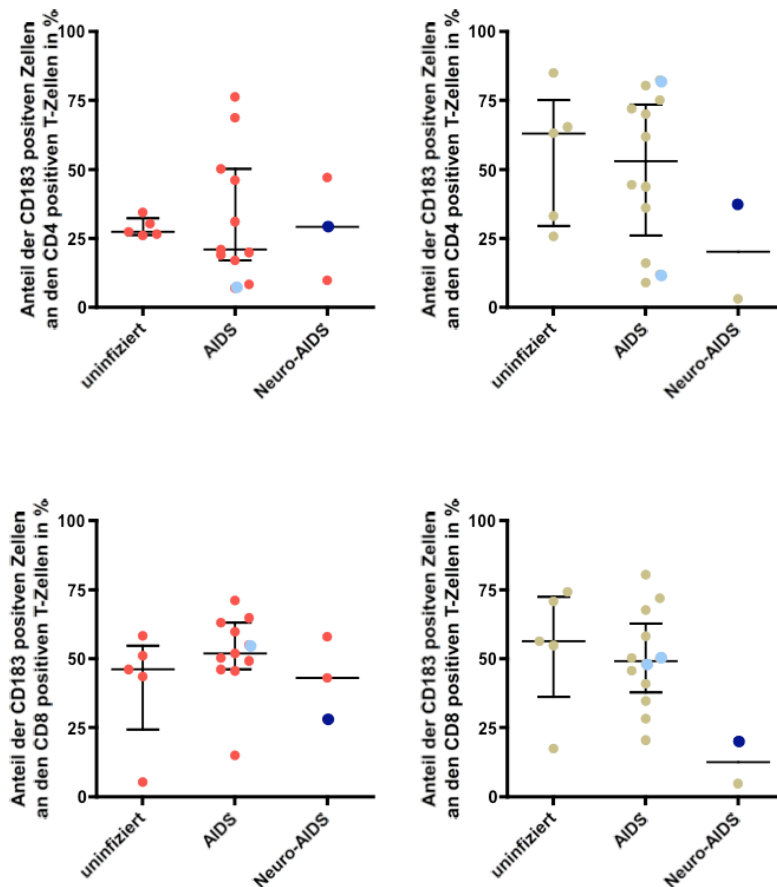


Abb. 3.31: Anteil der CD183 positiven an den CD4+ beziehungsweise den CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Für CD183 kommt es im Blut sowohl für die CD4 als auch die CD8 positiven T-Zellen nach Infektion zu keinen Veränderungen. Die Mediane liegen für die CD4 positiven T-Zellen bei 27,41% (uninfiziert), 21,01% (AIDS) und 29,29% (Neuro-AIDS) und für die CD8 positiven T-Zellen bei 46,20% (uninfiziert), 52,00% (AIDS) und 43,10% (Neuro-AIDS). Im Gehirn kommt es für beide T-Zell-Subpopulationen zu einem Verlust an CD183 positiven Zellen. Die Mediane nehmen für die CD4 positiven T-Zellen von 63,10% (uninfiziert) über 73,20% (AIDS) auf 20,28% (Neuro-AIDS) und für die CD8 positiven T-Zellen von 56,42% (uninfiziert) über 49,20% (AIDS) auf

12,55% (Neuro-AIDS) ab. Es konnte aber kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

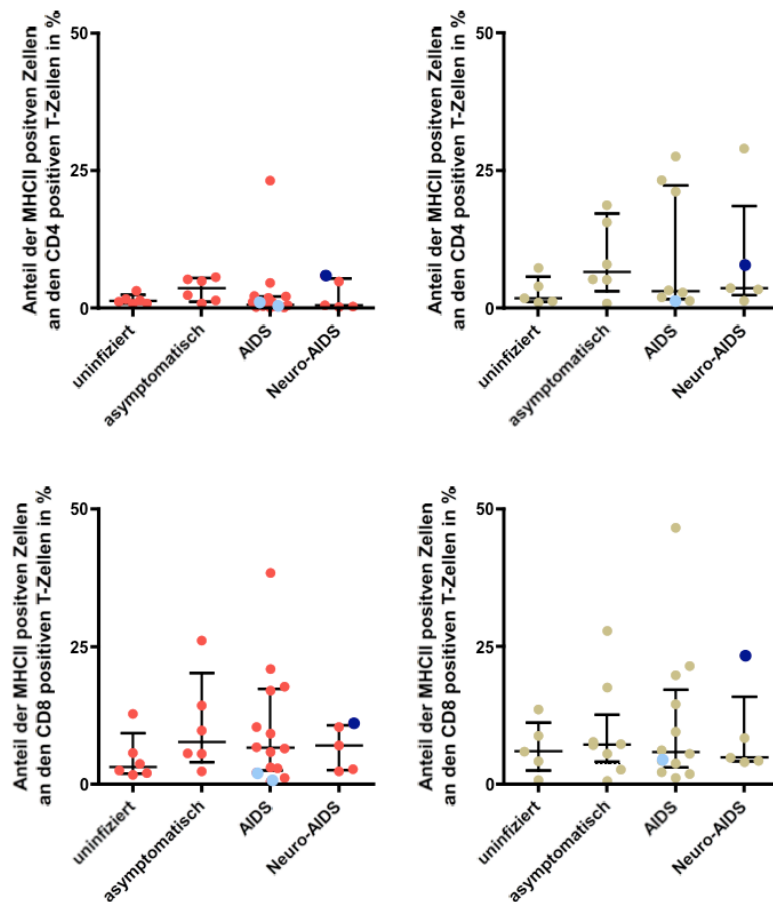


Abb. 3.32: Anteil der MHCII positiven an den CD4+ beziehungsweise den CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Die CD4 positiven T-Zellen in Blut und Gehirn weisen nur einen sehr niedrigen Anteil MHCII exprimierender Zellen auf, was sich auch nach der Infektion nicht ändert (siehe Abbildung 3.32). Im Blut liegen die durchschnittlichen Werte bei 1,30% (Median, uninfiziert), 3,65% (Median, asymptomatisch), 0,56% (Median, AIDS) und 0,50% (Median, Neuro-AIDS) und im Gehirn bei 1,80% (Median, uninfiziert), 6,56% (Median, asymptomatisch), 3,04% (Median, AIDS) und 3,65% (Median, Neuro-AIDS). Allerdings zeigen im Gehirn vereinzelte Tiere einen deutlichen Anstieg der MHCII-Expression. Neben dem Tier 12539 der Neuro-AIDS-Gruppe, waren es 2141, 2188, 12540 aus der AIDS-Gruppe und 11970, 12673 aus der asymptomatischen Gruppe. Außer 11970 waren alle Tiere mit SIV_{mac239} infiziert.

Für die CD8 positiven T-Zellen kommt es im Blut nach Infektion zu einem leichten Anstieg des Anteils MHCII exprimierender Zellen von 3,08% (Median, uninfiziert) auf 7,69%, 6,57% und 7,04% (Mediane, asymptomatisch, AIDS, Neuro-AIDS), der nicht signifikant war. Im Gehirn bleibt der Anteil MHCII positiver CD8-T-Zellen mit Medianen von 7,19% (asymptomatisch), 5,85% (AIDS) und 4,81% (Neuro-AIDS) unverändert zu den nicht infizierten Tieren (Median 5,95%).

Am Beispiel der CD4 oder der CD8 positiven T-Zellen wird im Folgenden eine detaillierte Auswertung vorgestellt, die auf der differentiellen Expression von mehr als einem Antigen beruht. Vergleicht man das Expressionsmuster des kostimulatorischen Moleküls CD28 mit CD95, einem Apoptose induzierenden Rezeptor, erhält man drei funktionell unterschiedliche Populationen (siehe Abbildung 3.33). Neben den CD28 negativen/CD95 hochpositiven Effektorzellen, die CD28/CD95 positiven naiven Zellen und die CD28/CD95 hochpositiven zentralen Gedächtniszellen.

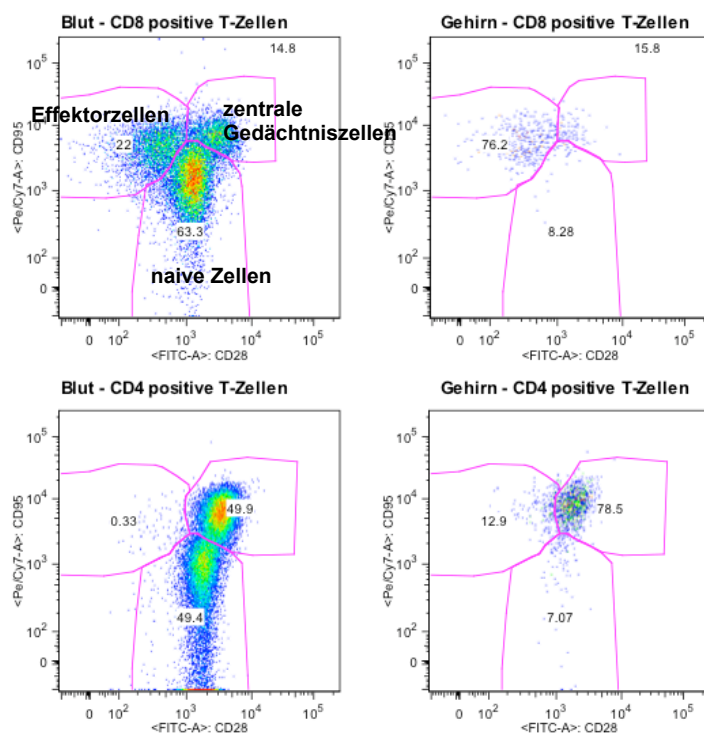


Abb. 3.33: Aufteilung der Zellen durch Kombination der Marker CD28 und CD95 in naive Zellen, Effektorzellen und zentrale Gedächtniszellen für die CD4+ beziehungsweise die CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn

Anhand dieser Aufteilung sind von den CD4 positiven T-Zellen im Blut uninfizierter Tiere durchschnittlich (Median) 49,90% zentrale Gedächtniszellen, 49,40% naive Zellen und 0,98% Effektorzellen (siehe Abbildung 3.34). Nach Infektion kommt es zu einem signifikanten Verlust von zentralen Gedächtniszellen auf 19,90% (Median, AIDS) und 12,44% (Median, Neuro-AIDS, $p=0,0159$). Da der Anteil der Effektorzellen unverändert niedrig bleibt mit 0,62% (Median, AIDS) und 0,84% (Median, Neuro-AIDS), kommt es zu einem Anstieg der naiven Zellen auf 78,70% (Median, AIDS) und 86,80% (Median, Neuro-AIDS).

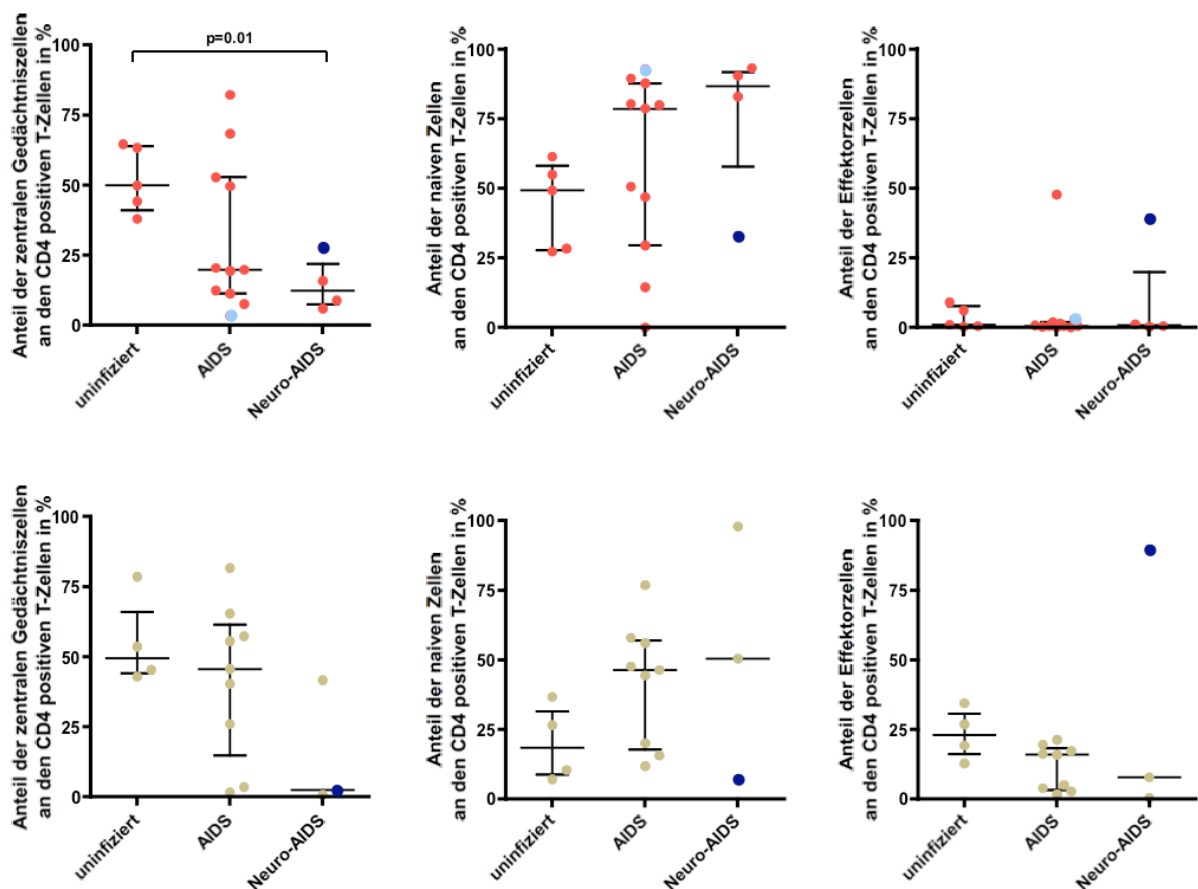


Abb. 3.34: Anteil der naiven Zellen, Effektorzellen und zentrale Gedächtniszellen an den CD4+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test) im Blut. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Im Gehirn uninfizierter Tiere sind von den CD4 positiven T-Zellen durchschnittlich (Median) 49,55% zentrale Gedächtniszellen, 18,50% naive Zellen und 23,10% Effektorzellen. Im Vergleich zum Blut sind somit rund die Hälfte der naiven Zellen

durch Effektorzellen ersetzt worden. Nach Infektion kommt es im Gehirn bei drei Tieren mit schnellem Krankheitsverlauf, 12540, 13248, 13256, zu einem Verlust von zentralen Gedächtniszellen. Der Median der AIDS-Gruppe bleibt mit 45,60% nahezu unverändert. In der Neuro-Aids Gruppe weisen zwei der drei Tiere einen deutlichen Verlust auf. Neben dem Langzeitüberlebenden 8313 handelt es sich um 13249, ebenfalls ein Tier mit schnellem Krankheitsverlauf. Für die Effektorzellen kommt es zu einem Verlust auf 16,00% (Median, AIDS) und 7,81% (Median, Neuro-AIDS). Der Langzeitüberlebende 8313 bildet mit 89,80% eine Ausnahme. Folglich kommt es auch im Gehirn zu einem Anstieg der naiven Zellen auf 46,30% (Median, AIDS) und 50,50% (Median, Neuro-AIDS).

Im Vergleich zu den CD4 positiven T-Zellen ist bei den CD8 positiven T-Zellen im Blut uninfizierter Tiere der Anteil der zentralen Gedächtniszellen mit 27,80% (Median) niedriger, der Anteil der naiven Zellen mit 46,20% (Median) gleich und der Anteil der Effektorzellen mit 26,20% (Median) erhöht (siehe Abbildung 3.35). Nach Infektion bleibt der Anteil der zentralen Gedächtniszellen mit 28,55% in der AIDS-Gruppe unverändert. In der Neuro-AIDS-Gruppe kommt es aber zu einem signifikanten Verlust von zentralen Gedächtniszellen auf 17,90% (Median) gegenüber den AIDS-Tieren mit $p=0,024$ (Mann-Whitney-Test). Weiterhin nimmt der Anteil der naiven Zellen auf 33,25% (Median, AIDS) und 37,90% (Median, Neuro-AIDS) ab. So kommt es zu einem Anstieg der Effektorzellen auf 40,45% (Median, AIDS) und 46,30% (Median, Neuro-AIDS).

Im Gehirn uninfizierter Tiere entspricht der Anteil der zentralen Gedächtniszellen mit 17,25% (Median) ungefähr dem im Blut, der Anteil der naiven Zellen ist mit 18,55% (Median) deutlich reduziert und der Anteil der Effektorzellen mit 67,20% (Median) deutlich erhöht. Das erklärt auch den auffallend niedrigeren Anteil CD28 exprimierender CD8 positiver T-Zellen im Vergleich zu den CD4 positiven T-Zellen bei uninfizierten Tieren (siehe Abbildung 3.28). Nach Infektion bleibt der Anteil der zentralen Gedächtniszellen mit 19,20% in der AIDS-Gruppe unverändert. Wie im Blut kommt es in der Neuro-AIDS-Gruppe zu einem Verlust von zentralen Gedächtniszellen auf 2,86% (Median), der gegenüber den AIDS-Tieren mit $p=0,049$ (Mann-Whitney-Test) signifikant war. Der Anteil der naiven Zellen steigt in der AIDS-Gruppe auf 28,75% (Median), verursacht durch fünf Tiere, 2187, 12056, 12540, 12541, 12544. Mit 13249 zeigt auch ein Tier der Neuro-AIDS-Gruppe einen deutlich

erhöhten Anteil naiver Zellen, während die beiden anderen Tiere 90% Effektorzellen aufweisen. Für die AIDS-Gruppe nimmt der Anteil der Effektorzellen mit durchschnittlich 41,70% (Median) gegenüber den nicht infizierten Tieren ab.

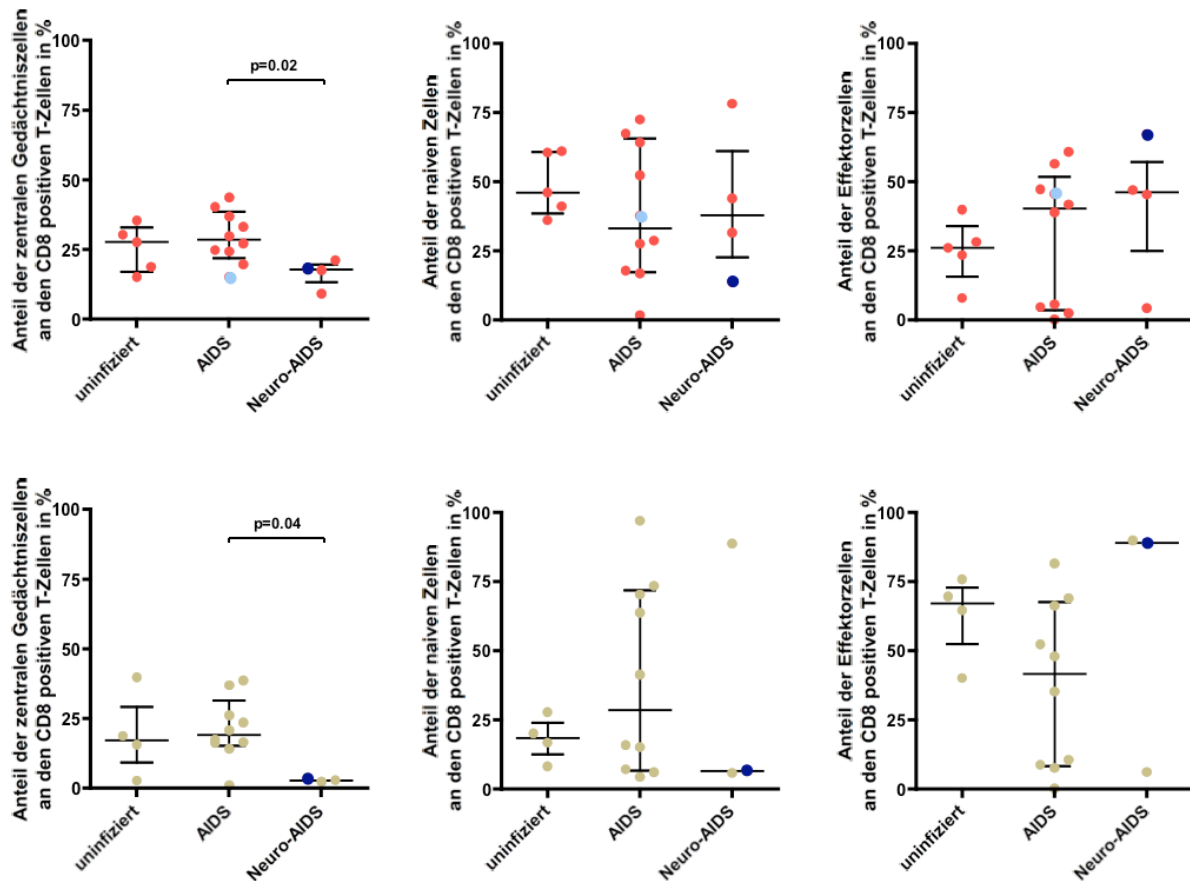


Abb. 3.35: Anteil der naiven Zellen, Effektorzellen und zentrale Gedächtniszellen an den CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test). Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Vergleicht man parallel für die CD4 oder die CD8 positiven T-Zell-Subpopulationen CD49d mit CD95, findet man erneut nach Infektion den Verlust von CD95 einfach oder zusätzlich 49d positiven Zellen und bei einigen Tieren einen Anstieg der 49d einfach positiven T-Zellen (siehe Anhang, T-Zellen Einzelmarker). Interessant bei der Kombination dieser beiden Marker ist, dass man eine zusätzliche Population sowohl im Blut, als auch im Gehirn, für die CD4 positiven T-Zellen und für die CD8 positiven T-Zellen definieren kann (siehe Abbildung 3.36). Diese T-Zellen sind CD95 positiv und CD49d negativ. Durch weitere durchflusszytometrische Analysen konnte gezeigt

werden, dass diese Population auch CD28 exprimiert, also zu den zentralen Gedächtniszellen zu rechnen ist, und außerdem CD29 hoch exprimiert, aber keine Expression von CD45RA sowie dem Integrin $\beta 7$ zeigt.

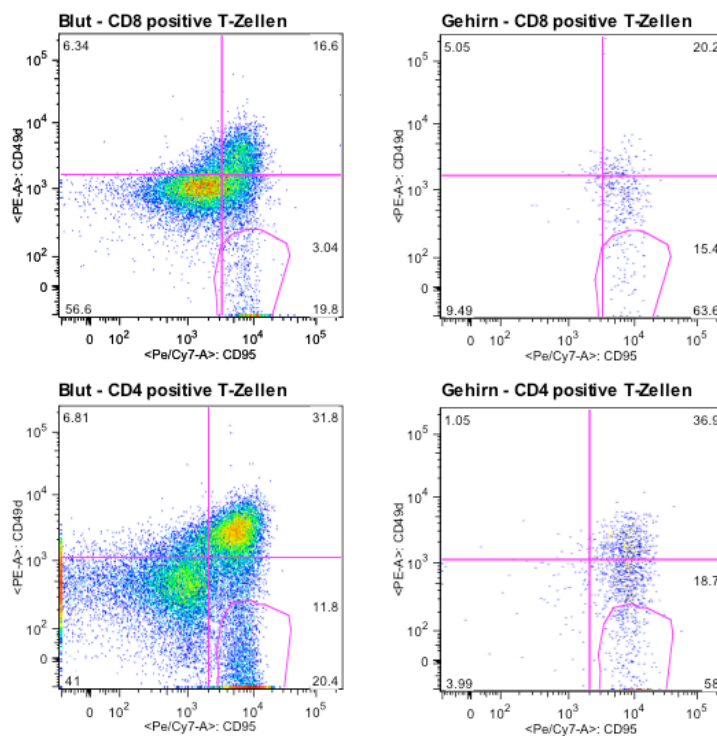


Abb. 3.36: Darstellung der CD95+/CD28+/CD49d- T-Zellen durch Kombination der Marker CD49d und CD95 für CD4+ beziehungsweise die CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn

Für die CD4 positiven T-Zellen nicht infizierter Tiere ist der Anteil der CD95+/CD28+/CD49d- Zellen im Blut mit durchschnittlich 11,50% (Median) im Vergleich zum Gehirn mit 8,27% leicht erhöht. Im Blut kommt es nach Infektion zu einem signifikanten Verlust auf 2,19% (Median) in der AIDS-Gruppe, $p < 0,05$, und 1,06% (Median) in der Neuro-AIDS-Gruppe, $p < 0,01$ (Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test). Der gleiche Verlust ist im Gehirn mit Medianen von 1,79% für die AIDS-Tiere und 0,34% für die Neuro-AIDS-Tiere auch nachweisbar. Mit dem Mann-Whitney-Test war der Unterschied für die Neuro-AIDS-Tiere gegenüber den uninfizierten Tieren signifikant ($p = 0,0381$).

Der Anteil der CD95+/CD28+/CD49d- Zellen an den CD8 positiven T-Zellen ist im Blut und im Gehirn der uninfizierten Tiere sehr niedrig und nimmt nach Infektion tendenziell ab. Die Mediane liegen im Blut bei 3,75% (uninfiziert), 2,94% (AIDS) und 1,38% (Neuro-AIDS) und im Gehirn bei 1,74% (uninfiziert), 1,35% (AIDS) und 1,07%

(Neuro-AIDS). Auffallend ist, dass sich die durch die Infektion induzierte Veränderung dieser Population für die CD4 positiven und für die CD8 positiven T-Zellen in Blut und Gehirn sehr ähnlich verhält.

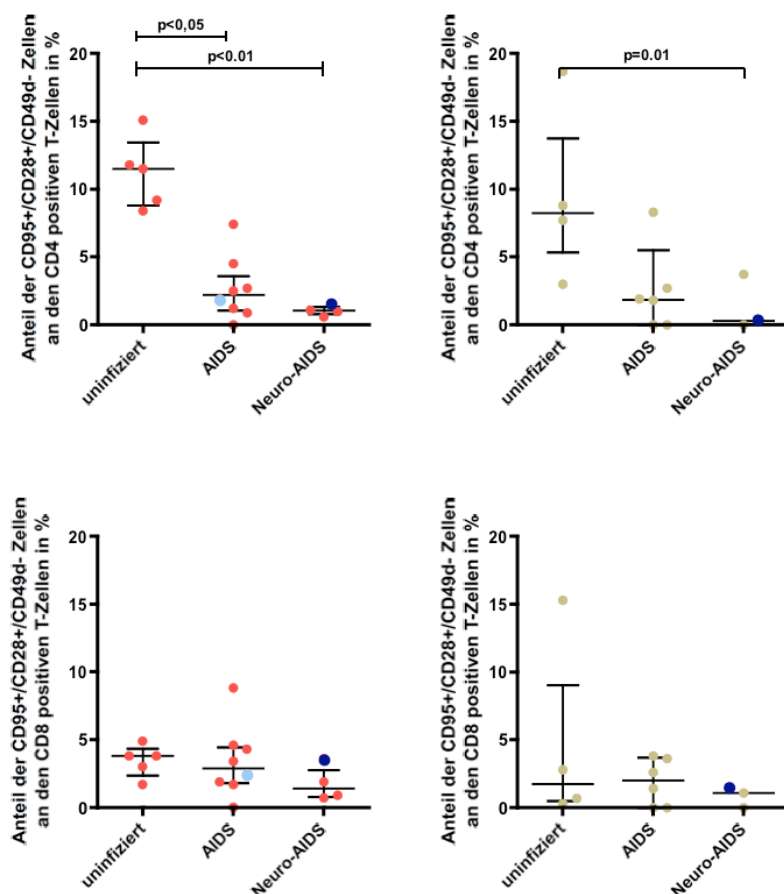


Abb. 3.37: Anteil der CD95+/CD28+/CD49d- Zellen an den CD4+ beziehungsweise den CD8+ T-Zellen in Blut und Gehirn sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion. Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Blut erhobenen Daten sind in rot, die für das Gehirn in braun dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test) im Gehirn oder mehrerer Gruppen untereinander (Varianzanalyse mit Dunn-Test) im Blut. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

3.2 Molekulargenetische Untersuchungen im Gehirn

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen des Immunsystems im Gehirn untersucht. Die Expression weiterer immunologisch wichtiger Gene sowie des Virusgenoms wurde auf RNA-Ebene bestimmt. Dazu wurde aus Cerebrospinalflüssigkeit und Mikrogliazellkulturüberstand, sowie Mikrogliazellen und Gehirnstücken RNA isoliert und die darin vorhandenen

Kopien des viralen Genoms beziehungsweise des antiretroviralen Gens APOBEC3G und weiterer IFN-regulierter Gene mit Hilfe der Echtzeit-PCR quantifiziert.

3.2.1 Bestimmung der Viruslast

Die Viruslast in CSF, Gehirn und Mikrogliazellen, wurde von jedem Tier bestimmt, soweit Proben vorhanden waren. Zunächst musste der für die Bestimmung freier Virionen in Flüssigkeiten entwickelte Test für Gewebeproben angepasst werden. Die Höchstmenge an einzusetzender RNA, bei der die Effizienz der PCR-Reaktion nicht eingeschränkt wird, musste bestimmt werden. Dafür wurden unterschiedliche Mengen RNA, die aus dem Gewebe uninfizierter Tiere isoliert worden war, mit definierten Mengen von viralen Sequenzen tragender RNA (Virusstandards) versetzt. Große Mengen zellulärer RNA störten die Detektion der viralen Sequenzen. Eine Menge von 20ng RNA pro Ansatz ermöglicht jedoch eine genaue Quantifizierung der Viruslast und wurde für die Untersuchungen verwendet. Diese Menge entspricht 0,1 bis 0,3mg Gehirngewebe beziehungsweise rund 10000 bis 30000 Mikrogliazellen. Die Zahl der Viruskopien wurde auf 1Million Zellen, 1Milligramm Gehirnmasse oder 1Milliliter Cerebrospinalflüssigkeit hochgerechnet. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden zur Kontrolle auch Mikrogliazellen und Gehirnproben von acht nicht infizierten Tieren untersucht. Bei diesen uninfizierten Tieren konnte bei den Mikroglia-proben kein Signal im PCR-Lauf detektiert werden. Vier der acht Gehirnproben zeigten ein unspezifisches Signal, weshalb als untere Nachweisgrenze ein Schwellenwert von 126 viralen RNA-Kopien/mg Gehirn festgelegt wurde, der aus dem Mittelwert der acht uninfizierten Proben plus doppelte Standardabweichung berechnet wurde. Für den Liquor wurde anhand der Vorinfektionswerte von acht Tieren aus Experiment 127 ein Schwellenwert von 1006 viralen RNA-Kopien/ml CSF (Mittelwert plus doppelte Standardabweichung) ermittelt.

Im Gehirn konnte bei 31% der asymptomatischen, 20% der an AIDS erkrankten und 63% der Neuro-AIDS-Tiere Virus nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.36). Für den Großteil der Tiere wurden Viruslasten von 127 bis 622 Kopien/Milligramm bestimmt. Dazu kommen in der Neuro-AIDS-Gruppe zwei Tiere mit deutlich höheren Viruslasten von rund 30000 Kopien/Milligramm (12539, SIV_{mac}239 infiziert) und rund 800000 Kopien/Milligramm (13255, SIV_{mac}251 infiziert). Für die Mikrogliazellen erhöht sich die Zahl der Tiere mit nachweisbarer Virusbelastung auf 64% in der

asymptomatischen Gruppe und 63% in der AIDS-Gruppe, bleibt aber unverändert bei 63% in der Neuro-AIDS-Gruppe. Die Spannweite reicht von 44 bis rund 800000 Kopien/Million Zellen. Auch hier hatten dieselben zwei Tiere die höchsten Viruslasten mit rund 35000 Kopien/Million Zellen (12539) und rund 800000 Kopien/Million Zellen (13255). Für den Liquor entspricht die Zahl der Tiere mit nachweisbarer Virusbelastung mit 64% in der asymptomatischen Gruppe, 61% in der AIDS-Gruppe und 57% in der Neuro-AIDS-Gruppe ungefähr der der Mikrogliazellen. Die ermittelten Viruslasten reichen von 1119 bis 64669 Kopien/Milliliter. Weiterhin wurden im CSF von 12539 knapp 15 Millionen Kopien/Milliliter ermittelt. Da die Liquorpunktion nicht erfolgreich war, fehlt dieser Wert für das zweite Tier 13255.

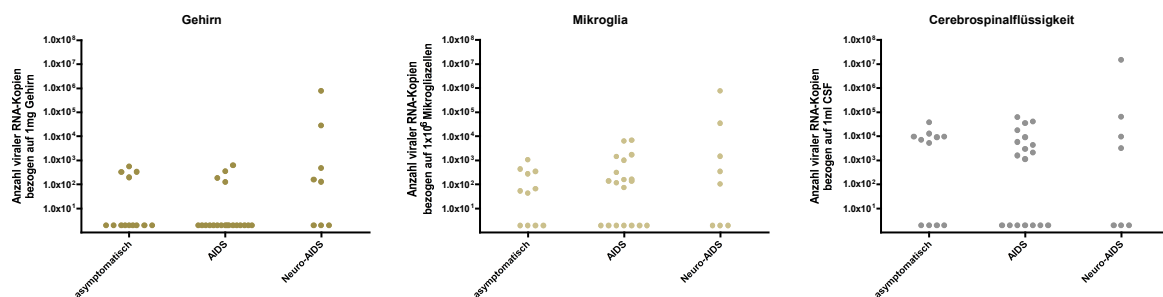


Abb. 3.38: Anzahl der Virus-RNA-Kopien Bezogen auf 1Million Mikrogliazellen, 1Milligramm Gehirnmasse oder 1Milliliter Cerebrospinalflüssigkeit. Sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion. Jeder Punkt steht für eines der 41 untersuchten Tiere.

Vergleicht man die Viruslast der einzelnen Tiere in den Mikrogliazellen mit der im Gehirn (siehe Abbildung 3.37), so konnte anhand der Spearman-Korrelation keine Beziehung hergestellt werden. Ursache ist die große Zahl von Tieren, für die nur in einer der beiden Proben Virus nachgewiesen werden konnte. Vergleicht man nur solche Proben, bei denen in beiden Kompartimenten positive Werte gefunden wurden, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung. Bei 17 der 38 Probenpaare findet man nur in den Mikrogliazellen ein positives Resultat. Diese höhere Sensitivität lässt sich dadurch erklären, daß die Mikrogliazellen Hauptzielzellen einer produktiven SIV-Infektion im Gehirn sind. In den Gehirnproben werden virale Sequenzen durch RNA nicht infizierter Zellen „verdünnt“. Korreliert man die Ergebnisse der Mikrogliazellen mit denen im CSF, findet man eine Beziehung ($p < 0,0001$, Spearman-Korrelation). In der Neuro-AIDS-Gruppe haben drei der acht Tiere (1939, 8313 und 8652) in allen drei Kompartimenten keine Virusbelastung oder waren knapp an der

Nachweisgrenze. Neben den zwei Tieren (12539 und 13255) mit den höchsten Viruslasten aller untersuchten Tiere in Gehirn, Mikrogliazellen und Liquor, bleiben dann noch drei Tiere mit vergleichbarer Viruslast in den Mikrogliazellen und erhöhter Viruslast in der Cerebrospinalflüssigkeit zu den Tieren der asymptomatischen und der AIDS-Gruppe. Für diese drei Tiere fand eine zusätzliche Bestimmung im Kulturüberstand von isolierten Mikrogliazellen nach 24h Inkubation statt. Es wurden 4000 bis 36000 Kopien/Milliliter im Überstand bestimmt. Zum Vergleich wurde für vier Tiere ohne Anzeichen SIV induzierter Veränderungen im Gehirn, aber mit ähnlichen Viruslasten, für alle drei Materialproben auch eine Messung des Kulturüberstandes vorgenommen. Bei den Tieren 2223, 2231, 12673 (asymptomatisch) und 2145 (AIDS) wurden 1600 bis 12300 Kopien/Milliliter Überstand bestimmt. Der Nachweis von Virus im Überstand für alle sieben Tiere zeigt eine produktive Infektion des ZNS. Die Viruslasten im Mikroglia-Zellkulturüberstand der Neuro-AIDS-Tiere waren gegenüber den Vergleichstieren nicht signifikant erhöht.

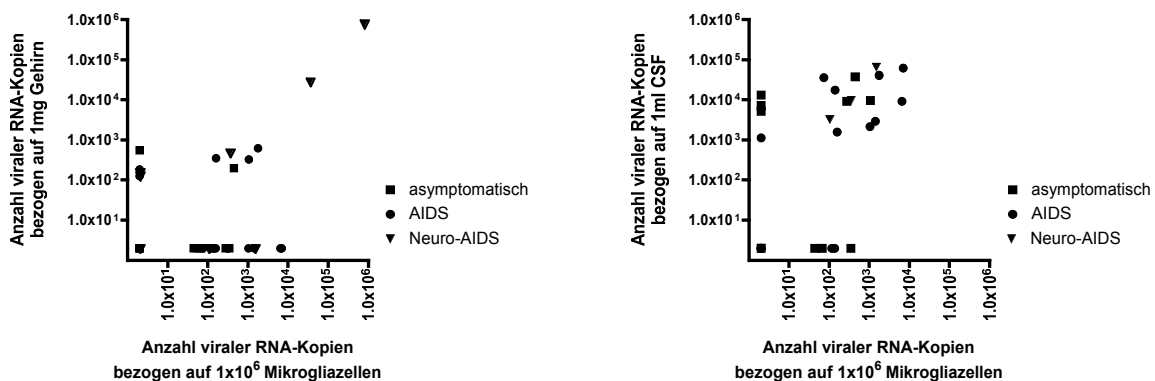


Abb.3.39: Vergleich der Viruslasten in Mikrogliazellen/Gehirn beziehungsweise Mikrogliazellen/CSF sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Auf der x-Achse sind die Viruslasten gemessen für die Mikrogliazellen und auf der y-Achse für Gehirn und CSF dargestellt.

3.2.2 Expression der Gene APOBEC3G und MxA

Für insgesamt 50 Tiere wurde die Expression von APOBEC3G und MxA, normalisiert auf das Haushalts-Gen GAPDH, untersucht. Dabei dienten jeweils sieben nicht infizierte Tiere als Basis um die Normalwerte festlegen zu können. Im Gehirn ist für die uninfizierten Tiere kein APOBEC3G auf RNA-Ebene nachweisbar (siehe Anhang,

PCR-Auswertung). Die durchschnittliche APOBEC3G-Expression (Median) in den Mikrogliazellen ist mit 5,9 Kopien pro 1000 GAPDH Kopien sehr gering (siehe Abbildung 3.38).

Für MxA konnte im Gehirn eine Expression mit 5,7 Kopien pro 1000 GAPDH Kopien (Median) festgestellt werden. Auch ist der Normalwert in den Mikrogliazellen mit 41,7 Kopien pro 1000 GAPDH Kopien (Median) höher als der für APOBEC3G.

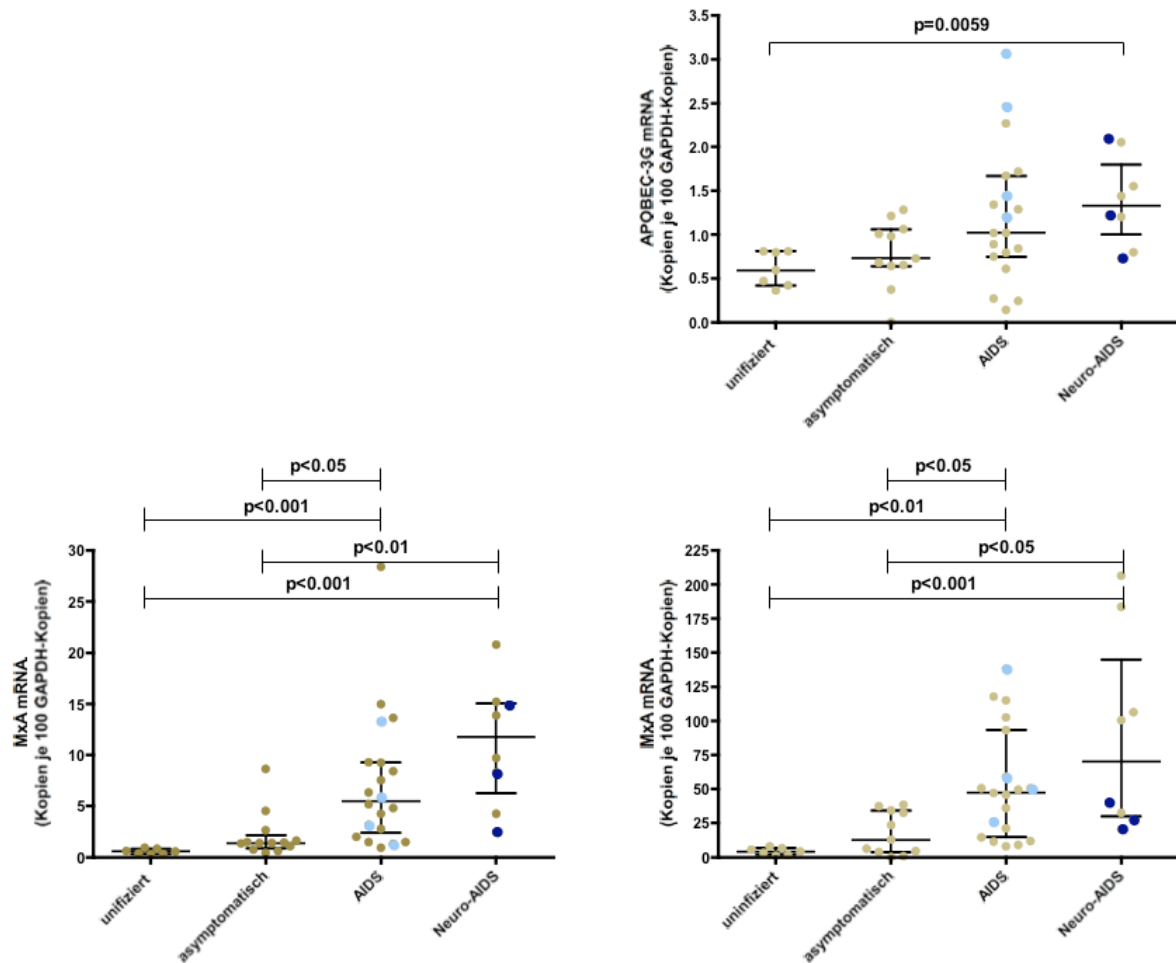


Abb.3.40: Transkriptionslevel von APOBEC3G und MxA normalisiert gegen GAPDH vergleichend für Gehirn und Mikrogliazellen sortiert nach Ausprägung der SIV Infektion zum Zeitpunkt der Sektion. Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Die für das Gehirn erhobenen Daten sind in dunkelbraun, die für die Mikrogliazellen in braun dargestellt. Der eingetragene p-Wert kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen (Mann-Whitney-Test) für APOBEC3G oder mehrerer Gruppen untereinander (Varianzanalyse mit Dunn-Test) für MxA. Eingetragen ist jeweils der Medianwert mit Quartilabstand.

Im Gehirn ist auch nach Infektion kein APOBEC3G auf Transkriptions-Ebene nachweisbar. In den Mikrogliazellen findet für APOBEC3G in den drei Gruppen nach Infektion eine erhöhte RNA Transkription statt. Die Mediane steigen von 6,8 Kopien

pro 1000 GAPDH Kopien (asymptomatisch), 10,2 Kopien pro 1000 GAPDH Kopien (AIDS) auf 13,3 Kopien pro 1000 GAPDH Kopien (Neuro-AIDS). Zwischen der Gruppe der nicht infizierten Tiere und der Neuro-AIDS-Gruppe besteht ein signifikanter Unterschied ($p=0,0059$, Mann-Whitney-Test). Die drei Langzeitüberlebenden 1939, 8313 und 8652, in Abbildung 3.38 dunkelblau hervorgehoben, unterscheiden sich nicht von den anderen Tieren innerhalb der Neuro-AIDS-Gruppe. Aus der Gruppe der an AIDS erkrankten Tiere, zeigen die vier Tiere mit beginnendem neurologischen Krankheitsgeschehen, hellblau hervorgehoben, eine signifikante Erhöhung der APOBEC3G Transkription ($p=0,03$, Mann-Whitney-Test).

Die Transkription von MxA wird nach Infektion im Gehirn hoch reguliert. Für die Mikrogliazellen entspricht die MxA RNA-Expression sogar der von GAPDH und darüber hinaus. Die Mediane steigen nach Infektion von 1,43% (asymptomatisch) über 5,49% (AIDS) auf 11,79% (Neuro-AIDS) für das Gehirn allgemein und von 11,34% (asymptomatisch) über 45,38% (AIDS) auf 70,34% (Neuro-AIDS) für die Mikrogliazellen an. Mittels Varianzanalyse mit anschließendem Dunn-Test konnte für die Neuro-AIDS-Gruppe ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, gegenüber der asymptomatischen Gruppe mit $p<0,01$ (Gehirn) und $p<0,05$ (Mikroglia) und gegenüber der uninfizierten Gruppe mit $p<0,001$ (Gehirn und Mikroglia). Ebenso war die MxA Expression der AIDS-Gruppe signifikant gegenüber der asymptomatischen Gruppe mit $p<0,05$ (Gehirn und Mikroglia) und gegenüber der uninfizierten Gruppe mit $p<0,001$ (Gehirn) und $p<0,01$ (Mikroglia) erhöht. Interessant ist, dass die Langzeitüberlebenden im Gehirn keine abweichenden Expressionslevel, in den Mikrogliazellen aber die niedrigsten Werte aufzeigen.

Sowohl für APOBEC3G, als auch für MxA konnte schon in den asymptomatischen Tieren, also im frühen Krankheitsverlauf, ein Anstieg der Expression verzeichnet werden. Gleiches gilt anhand der durchflusszytometrischen Untersuchungen für das Oberflächenantigen MHCII (siehe Abb. 3.13). Alle drei Parameter wurden untereinander und zusätzlich noch gegen die Viruslast korreliert. Für APOBEC3G und MxA konnte über die Spearman-Korrelation eine positive Beziehung zur Viruslast nachgewiesen werden ($p=0,014$ für APOBEC3G, $p=0,002$ für MxA). Für den MHCII konnte mit der Spearman-Korrelation keine Beziehung hergestellt werden. Wenn man aber nur die Tiere, für die Virus in den Mikrogliazellen nachgewiesen wurde, betrachtet, erhält man einen p-Wert von 0,004 (Spearman-

Korrelation). Weiterhin konnte für die MHCII-Expression nach Infektion eine Korrelation mit der MxA-RNA-Expression gezeigt werden ($p=0,037$). In Bezug auf APOBEC3G konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden. Der Vergleich der APOBEC3G und MxA Expression zeigte wieder eine positive Beziehung auf ($p<0,0001$, Spearman-Korrelation).

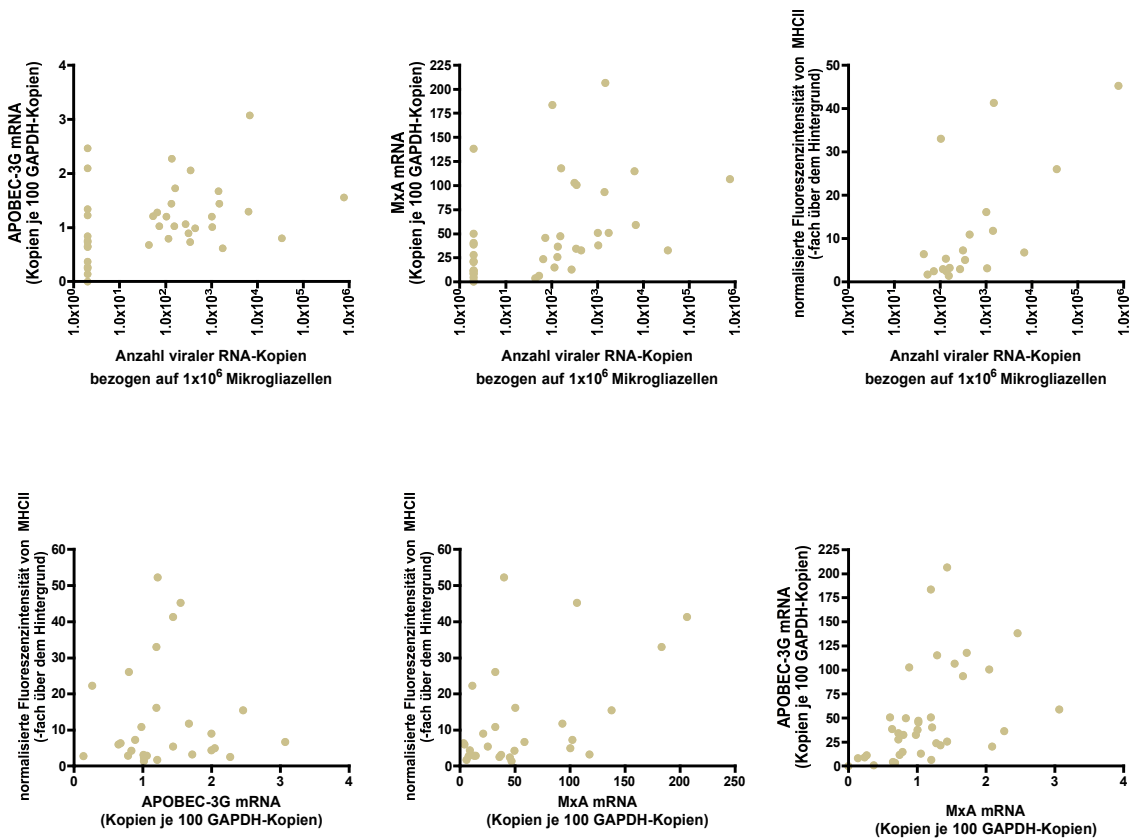


Abb.3.41: Vergleich der APOBEC3G- und MxA-Expressionslevel, Viruslast und normalisierten Fluoreszenzintensität von MHCII von Mikrogliazellen zum Zeitpunkt der Sektion. Jeder Punkt steht für ein untersuchtes Tier. Jeder der vier Marker wurde mit jedem anderen Marker verglichen um mögliche Korrelationen aufzuzeigen.

4 Diskussion

Bei 20-30% aller HIV-Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsverlauf und niedrigen CD4-Zellzahlen entwickelt sich ein durch HIV induziertes neurologisches Syndrom, die HIV-1 assoziierte Demenz (HAD) (McArthur et al., 1993). HAD gilt als unabhängiger signifikanter Risikofaktor, infolge einer AIDS-Erkrankung zu sterben, und war bis zur Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) weltweit eine der Hauptursachen für Demenz bei den unter vierzig Jährigen (Ellis et al., 1997). In letzter Zeit mehren sich die Zeichen, dass die HAD trotz HAART wieder ansteigt (Dore et al., 1997). Bis heute ist die Pathogenese dieser Erkrankung nicht komplett verstanden und es gibt keine spezifische Behandlung.

Mikrogliazellen sind das Hauptziel für eine produktive Infektion mit Immundefizienzviren im ZNS (Dickson et al., 1994; Takahashi et al., 1996). Desweiteren konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Höhe der viralen Replikation in der Peripherie nicht mit der Ausbildung neurologischer Erkrankungen korreliert. Die viralen Antigen-Konzentrationen in Mikrogliakulturüberständen korrelieren hingegen mit der Ausbildung eines neurologischen Krankheitsgeschehens (Demuth et al., 2000). Ziel dieser Arbeit sollte daher die Charakterisierung von Mikrogliazellen und anderen, meist infiltrierenden, mononukleären Leukozyten im Gehirn sein. Zur Untersuchung dieser Fragestellung war das Rhesusaffenmodell von großer Bedeutung, da nur in einem Tiermodell Untersuchungsgrößen wie Infektionszeitpunkt und Dauer, detaillierte Dokumentation des Krankheitsverlaufs und einheitliche Bedingungen bei der Materialgewinnung bestimmt werden können. Weitere Argumente wie die große Ähnlichkeit von HIV und SIV in Bezug auf genetische Struktur, Replikationszyklus und die hervorgerufenen Krankheitssymptome weisen dem Rhesusaffenmodell sogar eine herausragende Rolle zu (Desrosiers, 1995). Für meine Arbeit war zusätzlich die Kreuzreaktivität der humanen Antikörper entscheidend.

Zunächst wurden aus Gehirngewebe isolierte Mikrogliazellen phänotypisch untersucht. Dabei kam zum ersten Mal die polychromatische Durchflusszytometrie zum Einsatz, mit der eine bessere Abtrennung der Mikrogliazellen von anderen Zellpopulationen möglich ist und die Expression mehrerer Antigene gleichzeitig untersucht werden kann. Auf den Mikrogliazellen uninfizierter Tiere konnte in dieser Arbeit die Expression einer Reihe immunologisch wichtiger Oberflächenproteine nachgewiesen werden, die im Einzelnen in ihrer Bedeutung für die Physiologie der

Mikrogliazellen und in ihrer Rolle für das Krankheitsgeschehen diskutiert werden. Von vielen der untersuchten Antigene war bekannt, dass sie auf Zellen der Monozyten/Makrophagenlinie exprimiert werden. Über ihr Vorhandensein auf Mikrogliazellen liegen jedoch kaum Berichte vor.

Im Folgenden werden zuerst die allgemeinen Marker zur Charakterisierung von Mikrogliazellen, CD14, CD45, die analysierten Chemokinrezeptoren und CD11a-c betrachtet. Anschließend werden Integrine und andere Adhäsionsmoleküle analysiert, sowie der Einfluss der höheren Expression nach Infektion von kostimulatorischen Molekülen, wie MHCII, CD80, CD86.

Die im Parenchym ansässigen Mikrogliazellen werden neben den Makrophagen im Plexus choroideus und in den Meningen, sowie den perivaskulären Makrophagen, als eine von vier eindeutig abtrennbaren Makrophagenpopulationen im ZNS gewertet (Perry et al., 1994). Zur Abgrenzung der Mikroglia von den anderen Leukozytenpopulationen wurde, wie schon in anderen Studien, die Expression der Oberflächenproteine CD11b und CD45 herangezogen. Zusätzlich wurden die Mikrogliazellen von den perivaskulären Makrophagen durch Verwendung von CD14 unterschieden. Dieses auf der Zelloberfläche von 80-90% der Blut-Monozyten exprimierte Antigen, wurde zur Definition der perivaskulären Makrophagen genutzt (Ziegler-Heitbrock and Ulevitch, 1993; Ulvestad et al., 1994; Fischer-Smith et al., 2001). CD45 wird ebenfalls stärker auf den perivaskulären Makrophagen als auf den Mikrogliazellen exprimiert (Ulvestad et al., 1994). Aufgrund der differentiellen Expression dieser Antigene gelang es, neben den Mikrogliazellen weitere kleinere Zellpopulationen, perivaskuläre/infiltrierende Makrophagen, Lymphozyten sowie dendritische Zellen, zu definieren.

Im Gegensatz zu Literaturangaben, wonach Mikrogliazellen CD14 negativ sind, zeigen meine Ergebnisse, dass es auf den Mikrogliazellen exprimiert wird. Ein möglicher Grund dafür könnte die Isolation der Zellen sein. Bei ramifizierten Mikrogliazellen im Gehirn konnte CD14 nicht gefunden werden, aber die Expression auf isolierten amöboiden Mikrogliazellen wurde nachgewiesen (Rock et al., 2004). Desweiteren wären auch die höhere Sensitivität der Durchflusszytometrie gegenüber anderen Methoden oder die Untersuchung von Rhesusaffen im Tiermodell denkbar. Denn für die parallel untersuchte Zellpopulation der dendritischen Zellen konnte, im Gegensatz zur publizierten Meinung im humanen System, ebenfalls eine leichte CD14 Expression gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Mit Medianen von 1,89

(uninfiziert) über 2,55 (asymptomatisch) und 2,22 (AIDS) auf 2,98 (Neuro-AIDS) kommt es nach Infektion erst in der Neuro-AIDS-Gruppe zu signifikanten Veränderungen. Warum es zu dieser höheren Expression bei den Tieren mit neurologischem Krankheitsgeschehen kommt, war bisher nicht bekannt und ist ursächlich unverstanden. Man weiß, dass es zu einer Aktivierung von Monozyten/Makrophagen durch Interaktion von Lipopolysaccharid (LPS) und CD14 kommt (Wright et al., 1990). Die Mechanismen, die den komplexen Effekten von LPS auf eine HIV-Infektion zugrunde liegen, wurden noch nicht entschlüsselt.

CD45 ist nicht nur zur Definition der einzelnen Leukozytenpopulationen, sondern auch funktionell für die durch Antigene induzierte proliferative Antwort auf T-Zellen wichtig. CD45 (leukocyte common antigen) ist der Prototyp einer transmembranen Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTPase) und wird auf allen nukleären hämatopoetischen Zellen exprimiert (Trowbridge and Thomas, 1994). Das Protein existiert in fünf verschiedenen Isoformen (ABC, AB, BC, B, 0) als Folge alternativen Splicings von drei variablen Exons (Schwinzer, 1989). Weder CD45RA noch CD45RB wurden auf den Mikrogliazellen nicht infizierter Tiere nachgewiesen, was auf die Expression der kleinsten Isoform 0 hindeutet, welche keines der drei Exons enthält. Mikrogliazellen im ZNS uninfizierter Menschen exprimieren CD45 und es konnten für mehrere Krankheiten, wie Alzheimer, Multiple Sklerose und HIV-Enzephalitis Anstiege der CD45 Expression von Mikrogliazellen nachgewiesen werden (Akiyama et al., 1994; Johnston et al., 2001; Cosenza et al., 2002). Auch die sechs an AIDS erkrankten Tiere mit SIV induzierten Veränderungen im Gehirn, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, zeigten mit einer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (Median) von 39,59 eine deutlich höhere Expression, aber nicht signifikant, gegenüber den uninfizierten Tieren mit einer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (Median) von 19,47. Weiterhin wird die Rolle von CD45 als Therapieansatz von HAD diskutiert. In einer Studie wurde gezeigt, dass eine verstärkte Tyrosine-Phosphatase-Aktivität in Mikrogliazellen die HIV-1 Replikation in Mikrogliazellen inhibiert (Kim et al., 2006). Die Daten meiner Arbeit können diesen inhibitorischen Effekt nicht bestätigen. Zwei der drei Tiere mit den höchsten CD45 Expressionen in der Neuro-Aids-Gruppe haben gleichzeitig auch die höchsten Viruslasten aller untersuchten Tiere. Bei dem dritten Tier handelt es sich um den Langzeitüberlebenden 8313, für den kein Virus in den Mikrogliazellen nachgewiesen werden konnte. In der gleichen Studie (Kim et al., 2006) konnte auf Mikrogliazellen

nur die Expression von CD45RB und CD45RO, neben CD45, nachgewiesen werden. In Ermangelung eines kreuzreaktiven Antikörpers für CD45RO konnte nur die Expression von CD45RB untersucht werden. Bei den Tieren mit neurologischem Krankheitsgeschehen wurde die Expression (Median 2,54) mit signifikantem Unterschied zu den anderen untersuchten Tieren nachgewiesen. Das es durch verschiedene Einflüsse zu einem Wechsel der exprimierten Isoform kommen kann, ist von den Lymphozyten bekannt. Warum die Neuro-Aids-Tiere nun CD45RB exprimieren, kann durch den aktuellen Wissensstand nicht begründet werden. Für CD45RA wurde auch nach Infektion keine Expression festgestellt.

Aus der Gruppe der Chemokinrezeptoren wurden CCR5 und CXCR3 auf den Mikrogliazellen untersucht. CD195 (CCR5) ist der wichtigste Co-Rezeptor für die HIV-1 Infektion von Mikrogliazellen und Makrophagen (He et al., 1997; Ghorpade et al., 1998; Shieh et al., 1998; Albright et al., 1999; Gabuzda and Wang, 1999). Weiterhin zeigen die früheren Studien die vorrangige Nutzung von CCR5 als Co-Rezeptor von HIV-1-Isolaten aus dem Gehirn. Infizierte Mikrogliazellen und Makrophagen im Gehirn stellen ein signifikantes zelluläres Reservoir für eine persistierende Infektion (Schrager and D'Souza, 1998; Pierson et al., 2000). Weitere Gewebe, die persistent infizierte Makrophagen beherbergen, sind Lymphknoten, Milz und Knochenmark. Auch sind Makrophagen weniger anfällig für den zytopathischen Effekt von HIV-1, als CD4 positive T-Zellen (Gartner et al., 1986; Ho et al., 1986; Meltzer et al., 1990). Somit gelangt das Virus dank der monozytären Zellen in Kompartimente des Körpers, die für die Medikamente von HAART kaum beziehungsweise nicht zugänglich sind (Siliciano, 1999; Pierson et al., 2000). Anhand meiner Ergebnisse bleibt noch zu sagen, dass die Expression von CD195, wenn auch niedrig, auf den uninfizierten Zellen bestätigt werden konnte (Median 1,92) und es nach Infektion weder in der AIDS- (Median 2,14) noch in der Neuro-AIDS-Gruppe (Median 2,44) zu signifikanten Veränderungen kommt. CD183 konnte nur auf den Mikrogliazellen des Langzeitüberlebenden 8313 nachgewiesen werden. Es handelt sich um den Chemokinrezeptor CXCR3, dessen Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 durch IFN γ induzierbar sind (Farber, 1997; Cole et al., 1998). Man weiss, dass CD183 von bestimmten Subpopulationen der Lymphozyten bei inflammatorischen Prozessen vermehrt exprimiert wird (Qin et al., 1998), was im Bezug auf die von mir untersuchten T-Zellpopulationen auch noch detaillierter

betrachtet wird. Über die Expression von CD183 auf Mikrogliazellen ist noch nichts bekannt.

CD63 ist ein Tetraspanin mit lysosomaler Zielsequenz. Dabei handelt es sich um eine Proteinfamilie, die grundlegende Funktionen in der Regulation der Zellaktivierung, Proliferation, Entwicklung, Zellmotilität und Adhäsion übernimmt (Hemler, 2003). Tetraspanine besitzen vier transmembrane Domänen, verbunden durch kurze intrazelluläre Schleifen und eine kleine (EC1) und eine große (EC2) extrazelluläre Domäne. CD63 wird bereits auf der Mikroglia uninfizierter Tiere schwach exprimiert (Median 1,24). Über die Expression auf Mikrogliazellen wurden, soweit bekannt, noch keine Studien veröffentlicht, jedoch könnte es am Eintritt des HI-Virus in die Mikrogliazellen beteiligt sein. Für Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit HIV-1 durch Antikörper, die CD63 binden, inhibiert wird, aber nicht durch Antikörper, welche andere Mitglieder der Tetraspanin-Familie binden (Ho et al., 2006). Dieser inhibitorische Effekt gilt aber nur für CCR5-trope Virusstämme und nur für Makrophagen. Man vermutet den Mechanismus der Inhibition beim Viruseintritt. Nach Infektion kommt es für die an AIDS erkrankten Tiere zu keiner Veränderung, aber für die untersuchten Tiere mit zusätzlichen neurologischen Veränderungen, alle SIV_{mac251} infiziert, ließ sich eine erhöhte Expression (Median 2,26) aufzeigen. Es ist bekannt, dass CD63 nach Aktivierung nicht nur auf den lysosomalen Membranen, sondern auch auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Horejsi and Vlcek, 1991).

Die Integrine bilden eine große Gruppe von Adhäsionsmolekülen. Jedes Integrin-Molekül besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit und es können acht Subfamilien anhand der β -Untereinheiten definiert werden, β 1- (CD29), β 2- (CD18), β 3- (CD61) etc. Integrine (Hynes, 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die β 1, die β 2 Subfamilie und die β 7 Subfamilie anhand der Marker CD11a, CD11b, CD11c, CD29, CD49d, CD103 und β 7 untersucht. Außer CD11c und β 7 konnten alle Oberflächenantigene schon auf den Mikrogliazellen der nicht infizierten Tiere nachgewiesen werden.

Von den Integrin α -Untereinheiten CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1) und CD11c (p150, p95) die sich mit der β 2-Untereinheit verbinden, ist bekannt, dass sie auf der Oberfläche von Mikrogliazellen exprimiert werden (Rock et al., 2004). Alle drei wurden näher untersucht, wobei die Analyse von CD11b von größter Relevanz war. Neben CD45 und CD64 ist es eines der am stärksten exprimierten

Oberflächenantigene auf Mikrogliazellen, der in dieser Arbeit bearbeiteten uninfizierten Tiere. CD11b interagiert mit Matrix- und Zelloberflächenproteinen, wie Komplement iC3b, extrazellulären Matrixproteinen und der dritten extrazellulären Domäne von CD54 (Diamond et al., 1991). Für verschiedene neuroinflammatorische Erkrankungen wurde berichtet, dass eine erhöhte CD11b Expression mit dem Grad der Mikrogliazell-Aktivierung zusammenhängt. Morphologisch korrelieren die Veränderungen von Form und Mobilität der Mikrogliazellen ebenfalls mit einem Anstieg der CD11b Expression (Ling and Wong, 1993; Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999; Rock et al., 2004). Im Widerspruch zu den früheren Studien stehen die Ergebnisse dieser Arbeit. Von allen untersuchten Oberflächenproteinen zeigt einzig CD11b eine Tendenz zur Abnahme der Expression im Verlauf der Infektion. Für die uninfizierten Tiere liegt die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Median) bei 25,44, für die Tiere der Neuro-AIDS-Gruppe nur noch bei 17,6. Die sehr große Spannweite von zehn bis 40 schon innerhalb der Gruppe der nicht infizierten Tiere darf bei dieser Betrachtung aber nicht vernachlässigt werden. Die Migration von Mikrogliazellen, nach Schädigung, in die entsprechenden Gehirnbereiche wird sehr stark durch die Expression von CD11a kontrolliert, reguliert durch das nukleäre Enzym Poly-(ADP Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) durch Bildung des PARP-NF-kappaB-Proteinkomplexes. Die Hemmung von PARP oder CD11a unterbindet die Migration von Mikrogliazellen fast vollständig (Ullrich et al., 2001). Für CD11a kommt es zu einer höheren Expression nach Infektion. Die durchschnittlichen Werte (Mediane) steigen von 3,69 (uninfiziert) über 4,42 (asymptomatisch) und 4,36 (AIDS) auf 6,62 (Neuro-AIDS). Für CD11c konnte die Expression nur auf den Mikrogliazellen des Langzeitüberleben 8313 nachgewiesen werden. Bei Untersuchungen der Mikroglia-Subpopulationen an Mäusen wurde festgestellt, dass die Entzündungsprozesse im Gehirn assoziiert sind mit der Proliferation von CD11b positiven Zellen, die den Marker für dendritische Zellen (DC) CD11c aufweisen. Diese CD11c positive Zellen zeigten den Phänotyp von myeloiden DC und sind anwesend bei perivaskulären und im Parenchym auftretenden Entzündungsprozessen. Weiterhin unterscheiden sich die CD11c positiven Zellen in diesen Entzündungsbereichen von anderen Mikrogliazellen, ähnelten aber sehr den im Knochenmark gereiften DC und wurden deshalb als DC identifiziert (Fischer and Reichmann, 2001). Aufgrund der Kombination von zehn verschiedenen Antikörpern (u.a. CD11b, CD11c, CD45, CD14) bei der durchflusszytometrischen Analyse,

konnten die DCs eindeutig von den Mikrogliazellen abgetrennt werden. Somit bleibt das CD11c positive Ergebnis für die Mikroglia bestehen, aber in anderer Hinsicht fraglich, da es nur für ein Tier nachgewiesen wurde.

Das Integrin VLA-4 (very late antigen 4) ist ein Heterodimer, bestehend aus CD29 (β 1-Untereinheit) und CD49d (α 4-Untereinheit). In einigen Studien wurde VLA-4, neben LFA-1 als potentieller Marker für die Mikroglia-Aktivierung beschrieben. So ergaben Ko-Lokalisationsstudien mit mehrfachen Immunofluoreszenz-Markierungen (Hailer et al., 1996), das VLA-4 auf den meisten Mikrogliazellen mit für die Aktivierung typischer Morphologie exprimiert wird. Es konnte aber nicht auf ramifizierten Mikrogliazellen nachgewiesen werden. Die Expression von CD29 konnte schon mit rund zweifacher Fluoreszenzintensität über dem Hintergrund (Median) bei den uninfizierten Tieren gezeigt werden. Nach Infektion blieb die Expression für die asymptomatische und die AIDS-Gruppe unverändert. In der Neuro-AIDS-Gruppe kommt es zu einem nicht signifikanten Anstieg (Median bei 2,39). Da eine sehr niedrige Expression von CD49d (Median 1,55) erst in der Neuro-AIDS-Gruppe festgestellt werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass CD29 auf Mikrogliazellen normalerweise mit einem der fünf anderen VLA-Integrine assoziiert.

Das Integrin α E β 7 hat als α -Untereinheit das Oberflächenantigen CD103, dessen Expression auf den Mikrogliazellen in dieser Arbeit untersucht wurde. Auch β 7 wurde in den durchflusszytometrischen Messungen verwendet, die Expression konnte aber auf der Mikroglia von keinem Tier nachgewiesen werden. CD103 wurde ursprünglich auf CD8 positiven T-Lymphozyten lokalisiert im Darm, der Bronchoalveolarflüssigkeit und allogenen Gewebetransplantaten gefunden (Sarnacki et al., 1992; Rihs et al., 1996; Pauls et al., 2001). Eine zentrale Funktion dieses Antigens scheint die Führung von Lymphozyten zu ihrem Liganden E-Cadherin, einem Adhäsionsmolekül exprimiert auf Epithelzellen, zu sein (Cepek et al., 1994; Karecla et al., 1995). Weder für die Expression auf Mikrogliazellen, noch für den Einfluss einer HIV-Infektion auf CD103 konnten relevante Studien gefunden werden. Die Resultate der Durchflusszytometrie meiner Arbeit weisen auf eine Expression von CD103 auf den isolierten Mikrogliazellen uninfizierter Tiere (Median 1,25) hin. In den drei Gruppen nach Infektion kommt es zu keinen Veränderungen der Expression. Da der Nachweis aber nur auf der Annahme einer spezifischen Bindung des Antikörpers beruht und keine weitere Überprüfung, zum Beispiel auf Proteinebene, stattfand, ist die

Expression eines bisher für intestinale T-Zellen typischen Antigens auf den Mikrogliazellen zu hinterfragen.

Zwei weitere, in der vorliegenden Arbeit untersuchte Adhäsionsmoleküle sind, CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) und CD62L (L-Selectin, leukocyte adhesion molecule-1, LECAM-1). Über die Expression beider Oberflächenantigene auf Mikrogliazellen ist bisher nichts bekannt. CD31 ist am Prozess der Diapedese beteiligt und wird auf der Zelloberfläche von Blutplättchen, Endothelzellen, Monozyten, Neutrophilen und Lymphozytensubpopulationen exprimiert (Newman et al., 1990; Simmons et al., 1990; Stockinger et al., 1990). CD31 spielt eine wichtige regulatorische Rolle beim Eintritt von Monozyten und T-Lymphozyten durch die BBB ins ZNS (Qing et al., 2001; Graesser et al., 2002). Homophile Interaktionen zwischen PECAM-1 Proteinen exprimiert auf Endothelzellen und auf Leukozyten, einschließlich Monozyten, sind entscheidend für die Transmigration durch die interendothelialen Junctions (Eugenin et al., 2006). CD31 wird bereits auf den Mikrogliazellen der untersuchten uninfizierten Tiere exprimiert (Median 1,44). Die Tiere der Neuro-AIDS-Gruppe zeigen eine höhere Expression (Median 2,54). CD31 könnte somit eine Rolle bei den Interaktionen zwischen Mikrogliazellen und infiltrierenden, CD31 exprimierenden Leukozyten spielen. Von CD62L ist bekannt, dass es bei der Anheftung von Leukozyten an Endothelzellen die Interaktion zwischen LFA-1 und PECAM-1 stimuliert (Ley, 2002). Auch dieses Oberflächenantigen wird schon auf den Mikrogliazellen uninfizierter Tiere exprimiert (Median 1,71). Für die wenigen nach Infektion erhobenen Befunde kommt es zu keiner Veränderung.

Eine weitere sehr interessante Gruppe bilden die drei untersuchten Oberflächenantigene CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) und MHCII (Human Leukocyte Antigene-DR, HLA-DR), die eine Rolle bei der Aktivierung der spezifischen Immunantwort spielen. Die Expression von CD80 (Median 1,54) und MHCII (Median 2,95) konnte schon auf den Mikrogliazellen der untersuchten uninfizierten Tiere nachgewiesen werden. Die Expression von CD86 auf den Mikrogliazellen nicht infizierter Tiere bleibt anhand der Daten dieser Arbeit fraglich, da der Median mit 1,39 im Bereich des Mittelwertes plus doppelte Standardabweichung der Negativkontrollen lag. Erwähnenswert ist, dass auf den Makrophagen nicht infizierter Tiere die Expression von CD80 deutlich niedriger ist als auf den Mikrogliazellen, dafür aber CD86 nachgewiesen wurde. Diese drei Proteine spielen eine Rolle bei der

Interaktion mit aktivierten T-Lymphozyten im Rahmen der zellvermittelten Abwehr des erworbenen Immunsystems. Dabei werden durch Antigene die T-Zellen stimuliert, die nach Aktivierung Zytokine sezernieren, welche zur Aktivierung und Differenzierung von Mikrogliazellen führen. In vitro Studien haben gezeigt, dass das Th1-assoziierte Zytokin IFN γ die Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen auf Mikrogliazellen hochregulieren kann (Becher and Antel, 1996). Weitere Studien bestätigen die erhöhte Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen wie CD54, CD40, CD80 und CD86 auf Mikrogliazellen mit aktiviertem morphologischem Phänotyp (Cannella et al., 1995; Cannella and Raine, 1995; Windhagen et al., 1995). Die Zunahme der MHCII Expression und der damit verbundenen Peptidprozessierung zeigt die Rolle der Mikroglia als Antigen-präsentierende-Zelle (Seguin et al., 2003). Für MHCII kommt es nach Infektion zu einem rund zweifachen Anstieg in den Gruppen asymptomatisch (Median 5,94) und AIDS (Median 5,35) und zu einem mehr als zehnfachen Anstieg der Expression in der Neuro-AIDS-Gruppe (Median 37,15). Auch die zwei untersuchten kostimulatorischen Moleküle werden auf den Mikrogliazellen nach Infektion hochreguliert, wobei die Expression beider Oberflächenantigene korreliert ($p < 0,0014$).

IL-3 wurde ursprünglich als ein von T-Zellen sezerniertes Zytokin beschrieben, das als haematopoetischer Wachstumsfaktor bei der Proliferation von Vorläuferzellen in frühen Stadien der Differenzierung wirkt (Schrader, 1986). In Folge zeigten weitere Studien die Fähigkeit von IL-3 Makrophagen zu aktivieren, im Zusammenhang mit der T-Zell abhängigen Immunantwort (Frendl and Beller, 1990; Frendl, 1992). Für Mikrogliazellen wurde die Produktion und die Antwort auf IL-3 nachgewiesen (Gebicke-Haerter et al., 1994). Die Expression der β -Untereinheit des Rezeptors für IL-3 im ZNS scheint auf Makrophagen und Mikrogliazellen beschränkt zu sein (Appel et al., 1995). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Expression der α -Untereinheit, CD123; konnte für die Gruppe der uninfizierten Tiere (Median 1,88) nachgewiesen werden. Da nur von sechs Tieren nach Infektion die normalisierte Fluoreszenzintensität von CD123 gemessen wurde, lässt sich nur eine Tendenz zum Anstieg (Median 2,44) aufzeigen, wobei das eine Tier der Neuro-AIDS-Gruppe die mit Abstand höchste Expression hat. Da IL-3 bei Mikrogliazellen in vitro die Proliferation und Formation von vielkernigen Riesenzellen induziert (Lee et al., 1993),

könnte IL-3 eine Rolle bei der Aktivierung von Mikrogliazellen spielen (Chiang et al., 1994).

Bei CD64 (Fc γ R1) handelt es sich um einen Zelloberflächen-Rezeptor für die Immunoglobulin G (IgG) Fc-Domäne. Dieser Rezeptor wird auf myeloiden Zellen exprimiert. Die Vernetzung von Fc γ Rs löst verschiedene zelluläre Ereignisse aus, wie Phagozytose, Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Regulation der Produktion von Antikörpern. Damit bieten Fc γ Rs die Möglichkeit einer kritischen Rückkopplung zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort (Mellman et al., 1988; Gessner et al., 1998). Die Expression von CD64 auf Mikrogliazellen ist bereits bekannt (Peress et al., 1993; Re et al., 2002; Song et al., 2004), über die Auswirkungen einer HIV-1 Infektion wurde noch nichts publiziert. CD64 gehört neben CD11b und CD45 zu den am stärksten exprimierten Oberflächenantigenen auf den Mikrogliazellen der uninfizierten Tiere. Nach Infektion bleibt die Expression unverändert, nur bei den Tieren mit Krankheitsgeschehen im ZNS kommt es fast zu einer Verdoppelung der Expression von CD64.

Es verbleiben noch zwei in dieser Arbeit untersuchte Oberflächenproteine die erst auf den Mikrogliazellen der Tiere mit SIV induzierten neurologischen Veränderungen im ZNS exprimiert werden, CD69 (Median 1,36) und CD95 (Median 3,04). Bei CD69, einem C-Typ Lectin, handelt es sich um einen frühen Aktivierungsmarker. Obwohl die HIV-Infektion des ZNS sehr zeitig nach der Infektion in der Peripherie erfolgt (Davis et al., 1992), konnte keine Expression auf den Mikrogliazellen in den Gruppen asymptomatisch und AIDS und nur die sehr niedrige in der Gruppe der Neuro-AIDS-Tiere nachgewiesen werden. In bisherigen Publikationen wurden auch nur CD69 positive perivaskuläre Makrophagen im Gehirn beschrieben, mit dem Hinweis, dass Mikrogliazellen einen ihrem ruhenden runterregulierten Zustand entsprechenden Antigen-Phänotyp, im Vergleich zu anderen Gewebemakrophagen, zeigen (Perry et al., 1994; Kim et al., 2003). CD95 (APO-1, Fas) gehört zur tumor-necrosis-factor (TNF) Rezeptor Familie, die mit der Induktion von Apoptose assoziiert ist. Es gibt aber auch Funktionen, verbunden mit der Zellerhaltung, Differenzierung und der Regulation der Immunantwort. Der Fas-Rezeptor vermittelt Apoptose nach Bindung an den Fas-Liganden, exprimiert auf der Oberfläche anderer Zellen, oder agonistische Antikörper. Durch den Fas-Liganden induzierte Apoptose führt zur Aktivierung von Proteasen der Caspase Familie (Baud and Karin, 2001). Die Expression von Fas und dem Fas-Liganden auf aktivierten Mikrogliazellen wurden

schon gezeigt und die Fas vermittelte Apoptose konnte schon mit der Pathogenese verschiedener ZNS-Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Vogt et al., 1998). Die genaue Funktion der Fas/Fas-Ligand Interaktion im Verlauf einer HIV-Infektion des Gehirns ist jedoch weiterhin unklar.

Gemessen an der relativ niedrigen Viruslast im Gehirn und den wenig markanten histologischen Veränderungen war das neurologische Krankheitsbild bei den meisten von mir untersuchten Tieren noch nicht besonders stark ausgeprägt. Auch zeigte keines der Tiere klinisch neurologische Auffälligkeiten, wie man sie bei Tieren mit starker Virusreplikation im Gehirn beobachten kann (Sopper et al., 1998). Das erklärt auch, dass CD163 selbst auf den Mikrogliazellen von Tieren aus der Neuro-AIDS Gruppe nicht nachgewiesen werden konnte. Dieses, normalerweise nur auf perivaskulären Makrophagen zu findende, Antigen war bei Tieren mit SIV-Enzephalitis auf Mikrogliazellen nachgewiesen worden (Roberts et al., 2004; Kim et al., 2006). Die Expression mehrerer Oberflächenantigene wurde zum ersten Mal bestimmt. Neben den beiden Adhäsionsmolekülen CD31 und CD62L sind CD63 und CD69 von besonderer Relevanz. CD69 gilt bereits als Aktivierungsmarker und auch CD63 könnte anhand seiner Expression auf der Zelloberfläche nach Aktivierung in dieser Funktion Verwendung finden. Für viele der auf den Mikrogliazellen exprimierten Proteine wurde eine Veränderung der Expressionsstärke durch die Infektion gezeigt. Das, in die spezifische T-Zell vermittelte Immunantwort involvierte, Oberflächenantigen MHCII zeigte in dem Zusammenhang eine positive Korrelation mit den erhobenen Viruslasten. Mit immunhistochemischen Methoden wurde bereits nachgewiesen, dass die Anwesenheit HIV infizierter Zellen und die Expression des Aktivierungsmarkers MHCII assoziiert sind (McCrossan et al., 2006). Als Ursache für die mehrfach beschriebene divergente Entwicklung der Virusquasispezies in Gehirn und CSF gegenüber der Peripherie (Caragounis et al., 2008) können mehrere Mechanismen diskutiert werden. Die BBB erlaubt nur einen eingeschränkten Austausch von Zellen und damit selektiv nur den Eintritt von Virusvarianten, die diese Zellpopulationen infizieren. Auch stellt das Gehirn ein Reservoir dar, wo das Virus unter anderem vor vielen antiretroviralen Medikamenten geschützt ist. Zudem unterscheiden sich die Mikroglia und die perivaskulären Makrophagen als Zielzellen einer produktiven Infektion auch von denen in der Peripherie, hauptsächlich CD4+ T-Zellen. Weiterhin wird das Virus im ZNS mit einer im Vergleich zur Peripherie

unterschiedlichen Immunantwort konfrontiert. Die verstärkte Infiltration von CD8 positiven Zellen nach Infektion wurde mehrfach nachgewiesen (Marcondes et al., 2007). In der bereits erwähnten Studie von McCrossan und Kollegen wurde außerdem gezeigt, dass die Infiltration von CD8 positiven T-Lymphozyten mit der genetischen Abtrennung der Virusvarianten im Gehirn von denen in der Peripherie korreliert (McCrossan et al., 2006). Die Mutationen im Virus-Genom könnten aber auch durch die Deaminase APOBEC3G verursacht werden, durch Guanodin zu Adenosin Transitionen des Virusgenoms während der reversen Transkription (Harris et al., 2003). Nur wenig ist bisher über die Expression dieses antiviralen Restriktionsfaktors im Gehirn bekannt. Mehrere Publikationen beschreiben eine nur sehr niedrige oder keine Expression von RNA-Transkripten unter normalen Bedingungen (Jarmuz et al., 2002; Liddament et al., 2004; Wiegand et al., 2004). Auch die Daten meiner Arbeit zeigen, dass im frontalen Cortex von uninfizierten Tieren aber auch nach Infektion kein APOBEC3G auf Transkriptions-Ebene nachweisbar ist.

Die sich anschließende Analyse der APOBEC3G-Transkription in den Mikrogliazellen erbrachte einen positiven Nachweis schon in den uninfizierten Tieren, verbunden mit einem signifikanten Anstieg der Expression in den Tieren mit SIV induzierten neurologischen Veränderungen. Die vier Tiere mit beginnendem neurologischen Krankheitsgeschehen zeigen innerhalb der Gruppe der an AIDS erkrankten Tiere eine signifikante Erhöhung der APOBEC3G Transkription. Bei immunhistochemischen Untersuchungen verschiedener Regionen des ZNS wurde APOBEC3G selektiv in Zellen, die CD68 exprimieren, also Makrophagen und aktivierten Mikroglia, nachgewiesen (Depboylu et al., 2007). Damit ist aber eine Unterscheidung in Mikrogliazellen und Makrophagen bei den APOBEC3G positiven Zellen nicht möglich. Auch mit dem von mir verwendeten Nachweis ist eine APOBEC3G Genexpression durch Mikrogliazellen nicht mit letzter Gewissheit nachzuweisen, da das verwendete Ausgangsmaterial, die isolierten Gehirnleukozyten auch geringe Beimengungen von T-Zellen und Makrophagen aufweisen. Diese Zellen exprimieren nach Untersuchungen von Blutleukozyten in meiner Arbeitsgruppe ebenfalls APOBEC3G (Daten nicht gezeigt). Diese Expression reicht aber nicht aus, um durch den geringen Anteil von Lymphozyten in den Isolaten die für die Mikrogliazellen gemessenen Werte zu erzielen. Ein weiteres Argument für die Expression von APOBEC3G ist der Nachweis von Guanodin zu Adenosin

Hypermutationen in den gag und pol Regionen der retroviralen DNA, die aus Gehirnen von an AIDS erkrankten Affen isoliert wurde (Depboylu et al., 2007).

In den Mikrogliazellen korrelieren die mRNA Mengen von APOBEC3G und MxA, einem Interferon Typ1 induzierten Gen. MxA spielt eine Rolle bei der angeborenen antiviralen Immunantwort. Im Rahmen meiner Untersuchungen wurde MxA aber als potenzieller Marker der Interferon α und β Expression verwendet, da die Typ1 Interferon-Gene keine Introns beinhalten (Abel et al., 2001), was eine sichere Abgrenzung gegenüber genomischen Sequenzen bei niedriger mRNA-Expression erleichtert. Erste Untersuchungen von mir an Primärkulturen der Mikroglia uninfizierter Tiere zeigten einen Anstieg der mRNA-Transkription für APOBEC3G und für APOBEC3F, nach Stimulation mit Interferon α für 24 Stunden (Daten nicht gezeigt). Auch dieser Versuch zeigt, daß Mikrogliazellen selbst in der Lage sind APOBEC zu synthetisieren, da nicht adhärente Zellen wie Lymphozyten nicht mehr vorhanden waren. In anderen Studien mit SIV infizierten Rhesusaffen wurde festgestellt, dass die viralen DNA Mengen im ZNS konstant bleiben, auch wenn keine Virus-RNA nachweisbar ist (Barber et al., 2004). Dementsprechend wird die Replikation hauptsächlich auf transkriptionaler Ebene inhibiert. Für Makrophagen wurde ein Mechanismus zur Inhibition der Virusreplikation durch Interferon β dargestellt, welcher die Induktion der dominanten negativen Form des Transkriptionsfaktors C/EBP beinhaltet.

Für MxA konnten auch im Gehirn mRNA-Transkripte detektiert und ein signifikanter Anstieg der Expression nach Infektion gemessen werden. Obwohl die MxA Expression in den Mikrogliazellen teilweise sehr hoch ist, schließen meine Ergebnisse nicht aus, dass noch weitere Zellepopulationen mRNA für MxA transkribieren. Damit kann durch Typ1 Interferone anscheinend MxA (Delhaye et al., 2006; Rosas-Murrieta et al., 2007), nicht aber APOBEC zum Beispiel in Neuronen induziert werden. Mikroglia sind somit zum einen die Zielzellen einer produktiven Infektion im Gehirn und gleichzeitig Ort der APOBEC3G RNA-Transkription.

Die Daten meiner Arbeit zeigten eine Erhöhung der APOBEC3G Transkription nach Infektion. Andere Studien wiesen APOBEC3G spezifische Mutationen im Gehirn nach. Dennoch zeigten APOBEC3G und MxA eine positive Korrelation zur Viruslast in den Mikrogliazellen auf. Die mir derzeit vorliegenden Quellen ermöglichen keine abschließende Beurteilung, ob APOBEC3G einen inhibitorischen Effekt auf die Virusreplikation im ZNS hat.

Wie weiter oben besprochen kann die zelluläre Immunantwort einen wesentlichen Einfluss auf die Virusreplikation im Gehirn und die Ausprägung von Virusvarianten haben. Deshalb war für mich von Vorteil, dass die Isolationsmethode für Mikrogliazellen aus dem Gehirn über Dichtegradienten eigentlich zur Aufarbeitung mononukleärer Leukozyten aus dem ZNS dient (Sedgwick et al., 1991). Die Methode wurde im Rattenmodell etabliert, wo durchflusszytometrische Analysen anhand der CD45 und CD11b Expression zeigten, dass die Mehrheit der aufgereinigten mononukleären Zellen Mikroglia (50-70%) sind und nur eine Minderheit (15-25%) infiltrierende PBMC. Fortschritte in der durchflusszytometrischen Analysetechnik ermöglichten in späteren Studien die Unterscheidung von Mikrogliazellen und Makrophagen im ZNS der Ratten (Campanella et al., 2002). Die genaue Zusammensetzung der Leukozyten im Gehirn wurde bisher weder für Ratten, Rhesusaffen, andere Tiermodelle oder gar den Menschen veröffentlicht.

Für meine Untersuchungen wurden die mononukleären Zellen aus dem ZNS der Rhesusaffen nach der gleichen Methode isoliert. Bei den uninfizierten Tieren konnten in den Isolaten neben Mikrogliazellen (97%) auch Lymphozyten (3%) und Makrophagen (0,3%) nachgewiesen werden. Die Anwendung der polychromatischen Durchflusszytometrie erlaubte nach der Unterscheidung der Leukozytenpopulationen sogar noch eine differenziertere Analyse der Lymphozytensubpopulationen. Fast die Hälfte aller Lymphozyten im Gehirn sind NK-Zellen (49%). Weiterhin wurden T-Zellen (39%) und eine kleine Population an B-Zellen (4%) identifiziert.

Ein Vergleich der Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen in Blut, Gehirn und CSF zeigt deutliche Unterschiede auf. Im peripheren Blut eines gesunden Erwachsenen sind ca. 70% T-Lymphozyten, ca. 15% B-Lymphozyten und ca. 15% NK-Zellen (Hannet et al., 1992). Im peripheren Blut von Rhesusaffen wurde mit ca. 64% T-Lymphozyten, ca. 23% B-Lymphozyten und ca. 7% NK-Zellen eine ähnliche Verteilung gefunden (Sopper et al., 1997). Meine Ergebnisse zeigen im Blut einen durchschnittlichen Anteil von 62% T-Zellen, 34% B-Zellen und 3% NK-Zellen an den Lymphozyten. Die Resultate meiner Arbeit stimmen mit denen der anderen Studien überein. Der Anteil der NK-Zellen ist im Gehirn signifikant höher als im Blut. Der Anteil der T-Zellen und B-Zellen ist dementsprechend niedriger.

Auch die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation im CSF unterscheidet sich von der im Blut. Neben einem Anteil von 94% T-Zellen wurden 5% B-Zellen und 2% NK-Zellen für die von mir untersuchten Tiere bestimmt. Auch die von mir ermittelte

Zusammensetzung der CSF bestätigt die Ergebnisse anderer Studien. Im Liquor eines gesunden Erwachsenen sind ca. 97% T-Lymphozyten, unter 1% B-Lymphozyten und ca. 2% NK-Zellen (Svenningsson et al., 1995). Im CSF von Rhesusaffen wurden fast ausschließlich T-Zellen nachgewiesen (Sopper et al., 1998). Somit ist im Liquor der Anteil der NK-Zellen ebenfalls signifikant niedriger als im Gehirn und entspricht eher dem im Blut. Die sehr kleine Population an B-Zellen findet sich aber in CSF und Gehirn, was eine Zugehörigkeit zu diesem Kompartiment zeigt.

Der direkte Vergleich der Leukozytenpopulationen in Blut, Gehirn und CSF verdeutlicht den hohen Prozentsatz der NK-Zellen im Gehirn. NK-Zellen waren bisher kaum untersucht worden, da der Fokus häufig auf die Population der infiltrierenden T-Zellen im Gehirn gerichtet wurde. Sie galt, auch aufgrund der Zusammensetzung des Liquors, als vorherrschende Lymphozytenpopulation im Gehirn.

Die NK-Zellen wurden von mir nicht nur über Ihre CD16 und NKG2a Expression definiert. Die Parameter Größe, Granularität und CD45 Expression wurden vorher schon zur Definition der NK-Zellen als Lymphozytenpopulation eingesetzt. Weiterhin sind die Zellen CD3 negativ (T-Zellmarker), CD20 negativ (B-Zellmarker) und CD14 negativ (Makrophagenmarker). NK-Zellen werden in Ermangelung Antigen-spezifischer Rezeptoren als Teil der angeborenen Immunantwort angesehen. Sie identifizieren Ihre „Ziele“, wie Tumorzellen oder Virus infizierte Zellen, unter anderem anhand einer geringeren MHC I Expression. Da die MHC I Expression von Neuronen niedriger ist als bei den meisten anderen Zelltypen (Huh et al., 2000), könnten die NK-Zellen im Gehirn eine wichtige Aufgabe als erste Sensoren einer Nervenzellschädigung ausüben. Weiterhin wird den NK-Zellen eine Funktion bei der Regulation der adaptiven Immunantwort zugeordnet. Zum Beispiel ist bekannt, dass NK-Zellen in großer Zahl im Uterus schwangerer Frauen und der Plazenta vorkommen (Boulanger, 2004; Le Bouteiller and Piccinni, 2008) und somit die Abstoßung des MHC-diskordanten Fötus verhindern. In ähnlicher Weise wird auch eine Rolle der NK-Zellen bei der Unterbindung der autoreaktiven T-Zell-Antwort diskutiert, die möglicherweise bei Patienten mit Multipler Sklerose nicht optimal funktioniert (Segal, 2007). Bei genauerer Betrachtung der von mir untersuchten NK-Zellpopulation im Gehirn fällt auf, je stärker der Anteil im Vergleich zum Blut erhöht ist, desto größer ist auch der Unterschied in der Zusammensetzung durch Zunahme der CD16 einfachpositiven NK-Zellen. Nach Infektion kommt es bei den Tieren mit

neurologischem Krankheitsbild zu einer signifikanten Abnahme des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten. Da die Lymphozyten, wie auch in anderen Studien gezeigt (Kalams and Walker, 1995; Prospero-Garcia et al., 1996), insgesamt zunehmen ist nicht klar, ob es zu einer Abnahme in absoluten Zahlen kommt. Ich habe daher für einige Tiere eine Bestimmung der Absolutzellzahlen durchgeführt, die allerdings erst noch ausgewertet werden müssen.

Anhand der zwei Oberflächenantigene CD16 und NKG2a ließen sich die NK-Zellen in CD16 einfachpositive, NKG2a einfachpositive und CD16/NKG2a doppelpositive Zellen unterteilen. Bei den Tieren mit SIV-induziertem neurologischen Krankheitsgeschehen kommt es zu einer deutlichen Reduzierung des Anteils der CD16 einfachpositiven NK-Zellen, die in Bezug auf die Lymphozyten signifikant ist. Es lässt sich nicht eindeutig beurteilen, ob die Abnahme einen Verlust der CD16 einfachpositiven NK-Zellen darstellt oder ob es zu einem veränderten Expressionsprofil durch zusätzliche Präsentation von NKG2a auf der Zelloberfläche kommt. Für den Verlust der CD16 einfachpositiven NK-Zellen wäre eine Zuordnung ihrer spezifischen Funktionen im Gehirn interessant gewesen. Bisher sind keine Untersuchungen zur Funktion der drei Populationen beim Affen durchgeführt worden. Beim Menschen wird zur funktionellen Unterscheidung der NK-Zellsubpopulationen CD56 herangezogen (Wilk et al., 2008). Der Antikörper konnte zur durchflusszytometrischen Analyse der Rhesusaffen-Proben jedoch nicht verwendet werden, da der Antikörper nicht an NK-Zellen sondern an Makrophagen bindet. Der CD94/NKG2a Rezeptor wird den inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen zugeordnet. Diese sind notwendig um die Zerstörung körpereigener Zellen zu unterbinden. Nach Interaktion mit seinem Liganden HLA-E suprimiert CD94/NKG2a die Aktivierung verschiedener Signalprozesse (Borrego et al., 2005).

Die Zunahme des Makrophagen-Anteils nach Infektion ist für die Tiere der Neuro-AIDS-Gruppe signifikant. Bei den Tieren mit beginnendem neurologischen Krankheitsgeschehen ließ sich nur ein Trend zur Zunahme nachweisen, was für eine Infiltration erst spät im Krankheitsverlauf spricht. Frühere Studien zeigten, dass die Aktivierung von Monozyten in der Peripherie eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von HAD spielt (Fischer-Smith et al., 2001). Diese aktivierten CD14 und CD16 positiven Zellen migrieren vermehrt in das Gehirn und differenzieren zu perivaskulären Makrophagen. Ergänzend wurde durch Kolokalisationsstudien gezeigt, dass diese CD14/CD16 doppelpositiven Makrophagen wichtige Zielzellen

der HIV-Infektion im ZNS sind. Die Ergebnisse meiner Arbeit bestätigen eine Zunahme des Anteils der CD16 positiven Makrophagen nach Infektion im Gehirn. Weiterhin ist schon in den uninfizierten Tieren der Anteil der CD16 exprimierenden Makrophagen signifikant höher als im Blut. Im Gegensatz zu den Mikrogliazellen wird die Population der perivaskulären Makrophagen auch nach Ausbildung der BBB durch Monozyten aus der Peripherie aufgefüllt (Williams et al., 2001), wobei CD16 eine Rolle spielen könnte.

Zur verstärkten Infiltration von Lymphozyten kommt es schon bei den Tieren mit beginnendem Krankheitsgeschehen im ZNS, also früher als die Infiltration von Makrophagen. Auch bei den Tieren mit manifestem Krankheitsgeschehen ist der Lymphozyten-Anteil weiter signifikant erhöht, auch gegenüber den anderen infizierten Tieren. Die Zunahme der Lymphozyten wird anhand meiner Ergebnisse durch einen signifikanten Anstieg der T-Zellpopulation begründet, da der prozentuale Anteil der B-Zellen nach Infektion unverändert bleibt und die NK-Zellen tendenziell, durch einen möglichen Verlust der CD16 einfachpositiven Zellen, verloren gehen. Es ist bekannt, dass der Eintritt von T-Lymphozyten ins ZNS in der frühen Phase der Infektion stattfindet (Sopper et al., 1998; McCrossan et al., 2006). Was wiederum ein gewisses Risiko für eine chronische Schädigung des Gehirns darstellt, da so aktivierte T-Zellen mit ihren proinflammatorischen und potentiell neurotoxischen Eigenschaften für einen langen Zeitraum im Gehirn persistieren können (Hickey et al., 1991).

Die Zusammensetzung der T-Zellen im Gehirn uninfizierter Tiere zeigt signifikante Unterschiede zum Blut auf. Ein Zehntel der T-Zellen im Gehirn sind positiv für den $\gamma\delta$ -Antigenrezeptor, ein signifikant höherer Anteil als im Blut. Diese T-Zell-Subpopulation wird der unspezifischen Immunantwort zugeordnet. Da die Präsentation von Antigenen durch die konventionellen MHC-Moleküle nicht notwendig ist, erkennen die $\gamma\delta$ T-Zellen eine Vielzahl von Antigenen unterschiedlichen Ursprungs. Funktionell besteht damit eine Verbindung zu den NK-Zellen. Zusätzlich zu direkten antiviralen Aktivitäten der $\gamma\delta$ T-Zellen konnte ein Einfluss auf die adaptive Immunantwort der $\alpha\beta$ T-Zellen nachgewiesen werden (Poccia et al., 2002). Der Anteil der CD4 positiven Zellen im Gehirn von uninfizierten Tieren ist signifikant niedriger als im Blut und im CSF, der Anteil der CD8 positiven T-Zellen ist dementsprechend signifikant höher. Andere Studien konnten immunhistochemisch das Vorhandensein einer geringen Anzahl von CD4 und von CD8 positiven Lymphozyten im Gehirn nachweisen (Kim et

al., 2004). Nach Infektion kam es zu einer signifikanten Anreicherung von CD8 positiven T-Zellen. CD4 positive T-Zellen wurden nur noch vereinzelt detektiert. Die Resultate meiner Arbeit zeigen einen fast vollständigen Verlust der CD4 positiven T-Zellen bei den an AIDS erkrankten Tieren. Wenn man bedenkt, dass sich der Anteil der T-Zellen nach Infektion im Gehirn signifikant erhöht, könnte der Verlust an CD4 positiven T-Helferzellen im Gehirn stärker ausgeprägt sein als in der Peripherie. Als Folge der Virusinfektion erhöht sich aber nicht nur der Anteil der CD8 positiven T-Zellen, sondern auch der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen. Jedoch für die Tiere mit neurologischem Krankheitsgeschehen kommt es zu einem signifikanten Verlust von $\gamma\delta$ T-Zellen. Dabei fällt auf, dass die Tiere mit den höchsten Viruslasten in Gehirn, CSF und Mikrogliazellen die Tiere mit den niedrigsten $\gamma\delta$ T-Zell-Anteilen in Gehirn und Blut sind. Vergleichsstudien der pathogenen HIV-Infektion im Menschen mit der nicht pathogenen SIV-Infektion in Rußmangaben wiesen einen höheren Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut der Tiere nach, verbunden mit einer erhöhten Zytokin-Expression. Die Patienten zeigten einen Verlust der Zytokin exprimierenden $\gamma\delta$ T-Zellen auf (Kosub et al., 2008). Ein möglicher Einfluss der $\gamma\delta$ T-Zellen auf den Verlauf einer HIV-Infektion wurde schon in mehreren Studien angedacht (Cummings et al., 2008; Li et al., 2008), deren Rolle für die Pathogenese neurologischer Ausfallserscheinungen aber noch kaum diskutiert.

Die Analyse der $\alpha\beta$ T-Zellen zeigte, dass im Gehirn uninfizierter Tiere im Vergleich zum Blut der Anteil der Effektorzellen zu Lasten der naiven Zellen erhöht ist. Der Anteil an zentralen Gedächtniszellen unterscheidet sich nicht. In beiden Kompartimenten ist der Anteil der Effektorzellen an den CD8 positiven T-Zellen höher als der Anteil an den CD4 positiven T-Zellen. Bei den Tieren mit neurologischem Krankheitsbild kommt es zu einer Abnahme des Anteils der zentralen Gedächtniszellen. Gleichzeitig ist in diesen Tieren der Anteil der CD8 positiven Effektor-T-Zellen an den T-Zellen am größten. Trotzdem schafft es die T-Zell vermittelte zytotoxische Immunantwort anscheinend in dieser Phase nicht, die Viruslast zu unterdrücken. Im Gegenteil, sie könnte durch Ausschüttung von neurotoxischen Mediatoren den Krankheitsprozess verstärken.

Wesentliche Daten meiner Doktorarbeit wurden mit Hilfe der polychromatischen Durchflusszytometrie erfasst. Mit dieser Methode war ich in der Lage, zum ersten Mal eine genaue und umfassende Charakterisierung der Leukozytenpopulationen vorzunehmen. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen allerdings nur einen Teil der erhobenen Daten. Die Auswertung der dendritischen Zellen, aber auch die weitergehende Analyse der Expression aller Oberflächenantigene auf den Makrophagen, B-, NK- und T-Zellen wurde nicht mit einbezogen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mikrogliazellen auf mehreren Ebenen versuchen der SIV-Infektion im ZNS zu entgegnen. Eine stärkere Expression verschiedener kostimulatorischer und Adhäsionsmoleküle nach Infektion ermöglicht eine intensivere Interaktion mit anderen Immunzellen. Unter anderem korrelieren die erhöhten Expressionen von MHCII, CD80 und CD86, welche bei der Aktivierung der spezifischen T-Zell vermittelten Immunantwort wichtig sind, mit der Viruslast. Intrazellulär versuchen die Mikrogliazellen durch eine höhere Expression des intrinsischen Faktors APOBEC3G die Virusreplikation zu hemmen. Aber sowohl APOBEC3G, als auch die höhere Expression Interferon induzierter Gene weisen eine positive Korrelation mit der Viruslast in den Mikrogliazellen auf.

Weder die Interaktionen der Mikroglia mit anderen Zellen des Immunsystems, noch die Expression von Restriktionsfaktoren reichen aus, um die neurodegenerativen Prozesse zu inhibieren. Die in dieser Arbeit zum ersten Mal beschriebenen hohen Anteile von gd T-Zellen und NK-Zellen an den Lymphozyten im Gehirn weisen diesen Zellen eine bisher noch unterschätzte Rolle bei der Erkennung von neuronalen Schädigungen und für die Regulation der Immunantwort im Gehirn zu. In SIV-infizierten Tieren mit neurologischem Krankheitsbild waren gerade diese beiden Populationen signifikant reduziert. Das deutet daraufhin, dass der Verlust ihrer antiviralen oder antiinflammatorischen Funktionen der Entwicklung neurologischer Ausfallerscheinungen Vorschub leistet. Es ist somit denkbar, dass eine Beeinflussung dieser Zellen der angeborenen Immunantwort sogar neue Ansatzpunkte für eine Therapie der HAD eröffnen könnte.

5 Literaturverzeichnis

- Abel K, Alegria-Hartman MJ, Zanotto K, McChesney MB, Marthas ML, Miller CJ** (2001) Anatomic site and immune function correlate with relative cytokine mRNA expression levels in lymphoid tissues of normal rhesus macaques. *Cytokine* **16**: 191-204
- Adamson DC, Wildemann B, Sasaki M, Glass JD, McArthur JC, Christov VI, Dawson TM, Dawson VL** (1996) Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41. *Science* **274**: 1917-1921
- Akiyama H, Ikeda K, Katoh M, McGeer EG, McGeer PL** (1994) Expression of MRP14, 27E10, interferon-alpha and leukocyte common antigen by reactive microglia in postmortem human brain tissue. *J Neuroimmunol* **50**: 195-201
- Albright AV, Shieh JT, Itoh T, Lee B, Pleasure D, O'Connor MJ, Doms RW, Gonzalez-Scarano F** (1999) Microglia express CCR5, CXCR4, and CCR3, but of these, CCR5 is the principal coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 dementia isolates. *J Virol* **73**: 205-213
- Albright AV, Shieh JT, O'Connor MJ, Gonzalez-Scarano F** (2000) Characterization of cultured microglia that can be infected by HIV-1. *J Neurovirol* **6 Suppl 1**: S53-60
- Albright AV, Strizki J, Harouse JM, Lavi E, O'Connor M, Gonzalez-Scarano F** (1996) HIV-1 infection of cultured human adult oligodendrocytes. *Virology* **217**: 211-219
- Almeida OP, Lautenschlager NT** (2005) Dementia associated with infectious diseases. *Int Psychogeriatr* **17 Suppl 1**: S65-77
- Andersen JL, Zimmerman ES, DeHart JL, Murala S, Ardon O, Blackett J, Chen J, Planelles V** (2005) ATR and GADD45alpha mediate HIV-1 Vpr-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **12**: 326-334
- Anderson E, Zink W, Xiong H, Gendelman HE** (2002) HIV-1-associated dementia: a metabolic encephalopathy perpetrated by virus-infected and immune-competent mononuclear phagocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr* **31 Suppl 2**: S43-54
- Andras IE, Pu H, Deli MA, Nath A, Hennig B, Toborek M** (2003) HIV-1 Tat protein alters tight junction protein expression and distribution in cultured brain endothelial cells. *J Neurosci Res* **74**: 255-265
- Appel K, Buttini M, Sauter A, Gebicke-Haerter PJ** (1995) Cloning of rat interleukin-3 receptor beta-subunit from cultured microglia and its mRNA expression in vivo. *J Neurosci* **15**: 5800-5809

- Asensio VC, Campbell IL** (1999) Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci* **22**: 504-512
- Banks WA, Freed EO, Wolf KM, Robinson SM, Franko M, Kumar VB** (2001) Transport of human immunodeficiency virus type 1 pseudoviruses across the blood-brain barrier: role of envelope proteins and adsorptive endocytosis. *J Virol* **75**: 4681-4691
- Barber SA, Herbst DS, Bullock BT, Gama L, Clements JE** (2004) Innate immune responses and control of acute simian immunodeficiency virus replication in the central nervous system. *J Neurovirol* **10 Suppl 1**: 15-20
- Barks JD, Liu XH, Sun R, Silverstein FS** (1997) gp120, a human immunodeficiency virus-1 coat protein, augments excitotoxic hippocampal injury in perinatal rats. *Neuroscience* **76**: 397-409
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L** (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871
- Baud V, Karin M** (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* **11**: 372-377
- Baumgarth N, Roederer M** (2000) A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* **243**: 77-97
- Becher B, Antel JP** (1996) Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. *Glia* **18**: 1-10
- Bennett BA, Rusyniak DE, Hollingsworth CK** (1995) HIV-1 gp120-induced neurotoxicity to midbrain dopamine cultures. *Brain Res* **705**: 168-176
- Bishop KN, Holmes RK, Malim MH** (2006) Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J Virol* **80**: 8450-8458
- Bomsel M** (1997) Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* **3**: 42-47
- Borrego F, Masilamani M, Kabat J, Sanni TB, Coligan JE** (2005) The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor. *Mol Immunol* **42**: 485-488
- Boulanger LM** (2004) MHC class I in activity-dependent structural and functional plasticity. *Neuron Glia Biol* **1**: 283-289

- Boven LA, van der Bruggen T, van Asbeck BS, Marx JJ, Nottet HS** (1999) Potential role of CCR5 polymorphism in the development of AIDS dementia complex. *FEMS Immunol Med Microbiol* **26**: 243-247
- Brack-Werner R** (1999) Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis. *Aids* **13**: 1-22
- Brinkmann R, Schwinn A, Narayan O, Zink C, Kreth HW, Roggendorf W, Dorries R, Schwender S, Imrich H, ter Meulen V** (1992) Human immunodeficiency virus infection in microglia: correlation between cells infected in the brain and cells cultured from infectious brain tissue. *Ann Neurol* **31**: 361-365
- Burudi EM, Fox HS** (2001) Simian immunodeficiency virus model of HIV-induced central nervous system dysfunction. *Adv Virus Res* **56**: 435-468
- Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M** (2002) Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke* **33**: 586-592
- Cannella B, Aquino DA, Raine CS** (1995) MHCII expression in the CNS after long-term demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**: 521-530
- Cannella B, Raine CS** (1995) The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* **37**: 424-435
- Caragounis EC, Gisslen M, Lindh M, Nordborg C, Westergren S, Hagberg L, Svennerholm B** (2008) Comparison of HIV-1 pol and env sequences of blood, CSF, brain and spleen isolates collected ante-mortem and post-mortem. *Acta Neurol Scand* **117**: 108-116
- CDC** (1981) Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**: 305-308
- CDC** (1981) Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**: 250-252
- CDC** (1982) Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **31**: 365-367
- Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB** (1994) Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* **372**: 190-193
- Chakrabarti L, Hurtrel M, Maire MA, Vazeux R, Dormont D, Montagnier L, Hurtrel B** (1991) Early viral replication in the brain of SIV-infected rhesus monkeys. *Am J Pathol* **139**: 1273-1280

- Chiang CS, Stalder A, Samimi A, Campbell IL** (1994) Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain: studies in transgenic mice. *Dev Neurosci* **16**: 212-221
- Chiu YL, Greene WC** (2008) The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu Rev Immunol* **26**: 317-353
- Clifford DB** (2000) Human immunodeficiency virus-associated dementia. *Arch Neurol* **57**: 321-324
- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, et al.** (1986) What to call the AIDS virus? *Nature* **321**: 10
- Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K** (1998) Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* **187**: 2009-2021
- Corasaniti MT, Strongoli MC, Piccirilli S, Nistico R, Costa A, Bilotta A, Turano P, Finazzi-Agro A, Bagetta G** (2000) Apoptosis induced by gp120 in the neocortex of rat involves enhanced expression of cyclooxygenase type 2 and is prevented by NMDA receptor antagonists and by the 21-aminosteroid U-74389G. *Biochem Biophys Res Commun* **274**: 664-669
- Cosenza MA, Zhao ML, Si Q, Lee SC** (2002) Human brain parenchymal microglia express CD14 and CD45 and are productively infected by HIV-1 in HIV-1 encephalitis. *Brain Pathol* **12**: 442-455
- Cummings JS, Cairo C, Armstrong C, Davis CE, Pauza CD** (2008) Impacts of HIV infection on Vgamma2Vdelta2 T cell phenotype and function: a mechanism for reduced tumor immunity in AIDS. *J Leukoc Biol* **84**: 371-379
- Daniel MD, Letvin NL, King NW, Kannagi M, Sehgal PK, Hunt RD, Kanki PJ, Essex M, Desrosiers RC** (1985) Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* **228**: 1201-1204
- Davis LE, Hjelle BL, Miller VE, Palmer DL, Llewellyn AL, Merlin TL, Young SA, Mills RG, Wachsman W, Wiley CA** (1992) Early viral brain invasion in iatrogenic human immunodeficiency virus infection. *Neurology* **42**: 1736-1739
- del Rio-Hortega P** (1932) Microglia. *In* W.Penfield, ed, cytology and cellular pathology of the nervous system. P.B.Hoebaer, New York, N.Y.

- Delhaye S, Paul S, Blakqori G, Minet M, Weber F, Staeheli P, Michiels T** (2006) Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7835-7840
- Demuth M, Czub S, Sauer U, Koutsilieri E, Haaft P, Heeney J, Stahl-Hennig C, ter Meulen V, Sopper S** (2000) Relationship between viral load in blood, cerebrospinal fluid, brain tissue and isolated microglia with neurological disease in macaques infected with different strains of SIV. *J Neurovirol* **6**: 187-201
- Depboylu C, Eiden LE, Weihe E** (2007) Increased APOBEC3G expression is associated with extensive G-to-A hypermutation in viral DNA in rhesus macaque brain during lentiviral infection. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**: 901-912
- Desrosiers RC** (1990) The simian immunodeficiency viruses. *Annu Rev Immunol* **8**: 557-578
- Desrosiers RC** (1995) Non-human primate models for AIDS vaccines. *Aids* **9 Suppl A**: S137-141
- Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA** (1991) Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* **65**: 961-971
- Dickson DW** (1986) Multinucleated giant cells in acquired immunodeficiency syndrome encephalopathy. Origin from endogenous microglia? *Arch Pathol Lab Med* **110**: 967-968
- Dickson DW, Lee SC, Hatch W, Mattiace LA, Brosnan CF, Lyman WD** (1994) Macrophages and microglia in HIV-related CNS neuropathology. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **72**: 99-118
- Dore GJ, Hoy JF, Mallal SA, Li Y, Mijch AM, French MA, Cooper DA, Kaldor JM** (1997) Trends in incidence of AIDS illnesses in Australia from 1983 to 1994: the Australian AIDS cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **16**: 39-43
- Dreyer EB, Kaiser PK, Offermann JT, Lipton SA** (1990) HIV-1 coat protein neurotoxicity prevented by calcium channel antagonists. *Science* **248**: 364-367
- Ellis RJ, Deutsch R, Heaton RK, Marcotte TD, McCutchan JA, Nelson JA, Abramson I, Thal LJ, Atkinson JH, Wallace MR, Grant I** (1997) Neurocognitive impairment is an independent risk factor for death in HIV infection. San Diego HIV Neurobehavioral Research Center Group. *Arch Neurol* **54**: 416-424

- Ensoli F, Cafaro A, Fiorelli V, Vannelli B, Ensoli B, Thiele CJ** (1995) HIV-1 infection of primary human neuroblasts. *Virology* **210**: 221-225
- Eugenin EA, Gamss R, Buckner C, Buono D, Klein RS, Schoenbaum EE, Calderon TM, Berman JW** (2006) Shedding of PECAM-1 during HIV infection: a potential role for soluble PECAM-1 in the pathogenesis of NeuroAIDS. *J Leukoc Biol* **79**: 444-452
- Everall IP, Heaton RK, Marcotte TD, Ellis RJ, McCutchan JA, Atkinson JH, Grant I, Mallory M, Masliah E** (1999) Cortical synaptic density is reduced in mild to moderate human immunodeficiency virus neurocognitive disorder. HNRC Group. HIV Neurobehavioral Research Center. *Brain Pathol* **9**: 209-217
- Farber JM** (1997) Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* **61**: 246-257
- Fiala M, Rhodes RH, Shapshak P, Nagano I, Martinez-Maza O, Diagne A, Baldwin G, Graves M** (1996) Regulation of HIV-1 infection in astrocytes: expression of Nef, TNF-alpha and IL-6 is enhanced in coculture of astrocytes with macrophages. *J Neurovirol* **2**: 158-166
- Fischer HG, Reichmann G** (2001) Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol* **166**: 2717-2726
- Fischer-Smith T, Croul S, Sverstiuk AE, Capini C, L'Heureux D, Regulier EG, Richardson MW, Amini S, Morgello S, Khalili K, Rappaport J** (2001) CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection. *J Neurovirol* **7**: 528-541
- Fischer-Smith T, Rappaport J** (2005) Evolving paradigms in the pathogenesis of HIV-1-associated dementia. *Expert Rev Mol Med* **7**: 1-26
- Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM** (2004) Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* **10**: 1055-1063
- Frendl G** (1992) Interleukin 3: from colony-stimulating factor to pluripotent immunoregulatory cytokine. *Int J Immunopharmacol* **14**: 421-430
- Frendl G, Beller DI** (1990) Regulation of macrophage activation by IL-3. I. IL-3 functions as a macrophage-activating factor with unique properties, inducing Ia and lymphocyte function-associated antigen-1 but not cytotoxicity. *J Immunol* **144**: 3392-3399
- Gabuzda D, Wang J** (1999) Chemokine receptors and virus entry in the central nervous system. *J Neurovirol* **5**: 643-658

- Gartner S** (2000) HIV infection and dementia. *Science* **287**: 602-604
- Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, Betts RF, Popovic M** (1986) Virus isolation from and identification of HTLV-III/LAV-producing cells in brain tissue from a patient with AIDS. *Jama* **256**: 2365-2371
- Gebicke-Haerter PJ, Appel K, Taylor GD, Schobert A, Rich IN, Northoff H, Berger M** (1994) Rat microglial interleukin-3. *J Neuroimmunol* **50**: 203-214
- Gendelman HE, Lipton SA, Tardieu M, Bukrinsky MI, Nottet HS** (1994) The neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J Leukoc Biol* **56**: 389-398
- Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE** (1998) The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol* **76**: 231-248
- Ghafouri M, Amini S, Khalili K, Sawaya BE** (2006) HIV-1 associated dementia: symptoms and causes. *Retrovirology* **3**: 28
- Ghorpade A, Nukuna A, Che M, Haggerty S, Persidsky Y, Carter E, Carhart L, Shafer L, Gendelman HE** (1998) Human immunodeficiency virus neurotropism: an analysis of viral replication and cytopathicity for divergent strains in monocytes and microglia. *J Virol* **72**: 3340-3350
- Giulian D, Yu J, Li X, Tom D, Li J, Wendt E, Lin SN, Schwarcz R, Noonan C** (1996) Study of receptor-mediated neurotoxins released by HIV-1-infected mononuclear phagocytes found in human brain. *J Neurosci* **16**: 3139-3153
- Glass JD, Fedor H, Wesselingh SL, McArthur JC** (1995) Immunocytochemical quantitation of human immunodeficiency virus in the brain: correlations with dementia. *Ann Neurol* **38**: 755-762
- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G** (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* **22**: 219-240
- Gonzalez-Scarano F, Martin-Garcia J** (2005) The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* **5**: 69-81
- Gorry PR, Ong C, Thorpe J, Bannwarth S, Thompson KA, Gatignol A, Vesselingh SL, Purcell DF** (2003) Astrocyte infection by HIV-1: mechanisms of restricted virus replication, and role in the pathogenesis of HIV-1-associated dementia. *Curr HIV Res* **1**: 463-473
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A** (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**: 1425-1431

- Graesser D, Solowiej A, Bruckner M, Osterweil E, Juedes A, Davis S, Ruddle NH, Engelhardt B, Madri JA** (2002) Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. *J Clin Invest* **109**: 383-392
- Griffin DE** (1997) Cytokines in the brain during viral infection: clues to HIV-associated dementia. *J Clin Invest* **100**: 2948-2951
- Hailer NP, Jarhult JD, Nitsch R** (1996) Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* **18**: 319-331
- Hannet I, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Deneys V, DeBruyere M** (1992) Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol Today* **13**: 215, 218
- Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Neuberger MS, Malim MH** (2003) DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**: 803-809
- He J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S, Busciglio J, Yang X, Hofmann W, Newman W, Mackay CR, Sodroski J, Gabuzda D** (1997) CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* **385**: 645-649
- Hemler ME** (2003) Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 397-422
- Hickey WF, Hsu BL, Kimura H** (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* **28**: 254-260
- Hickey WF, Kimura H** (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* **239**: 290-292
- Ho DD, Rota TR, Hirsch MS** (1986) Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. *J Clin Invest* **77**: 1712-1715
- Ho SH, Martin F, Higginbottom A, Partridge LJ, Parthasarathy V, Moseley GW, Lopez P, Cheng-Mayer C, Monk PN** (2006) Recombinant extracellular domains of tetraspanin proteins are potent inhibitors of the infection of macrophages by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **80**: 6487-6496
- Hofmann-Lehmann R, Swenerton RK, Liska V, Leutenegger CM, Lutz H, McClure HM, Ruprecht RM** (2000) Sensitive and robust one-tube real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to quantify SIV RNA load: comparison of one- versus two-enzyme systems. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**: 1247-1257

- Horejsi V, Vlack C** (1991) Novel structurally distinct family of leucocyte surface glycoproteins including CD9, CD37, CD53 and CD63. *FEBS Lett* **288**: 1-4
- Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ** (2000) Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* **290**: 2155-2159
- Hynes RO** (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-687
- Ioannidis JP, Reichlin S, Skolnik PR** (1995) Long-term productive human immunodeficiency virus-1 infection in human infant microglia. *Am J Pathol* **147**: 1200-1206
- Janssen RS** (1992) Epidemiology of human immunodeficiency virus infection and the neurologic complications of the infection. *Semin Neurol* **12**: 10-17
- Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, Scott J, Navaratnam N** (2002) An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* **79**: 285-296
- Johnston JB, Silva C, Gonzalez G, Holden J, Warren KG, Metz LM, Power C** (2001) Diminished adenosine A1 receptor expression on macrophages in brain and blood of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* **49**: 650-658
- Jordan CA, Watkins BA, Kufta C, Dubois-Dalcq M** (1991) Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent. *J Virol* **65**: 736-742
- Kalams SA, Walker BD** (1995) Cytotoxic T lymphocytes and HIV-1 related neurologic disorders. *Curr Top Microbiol Immunol* **202**: 79-88
- Karecla PI, Bowden SJ, Green SJ, Kilshaw PJ** (1995) Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin alpha M290 beta 7 (alpha E beta 7). *Eur J Immunol* **25**: 852-856
- Kaul M, Garden GA, Lipton SA** (2001) Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* **410**: 988-994
- Kaul M, Lipton SA** (1999) Chemokines and activated macrophages in HIV gp120-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8212-8216
- Kestler H, Kodama T, Ringler D, Marthas M, Pedersen N, Lackner A, Regier D, Sehgal P, Daniel M, King N, et al.** (1990) Induction of AIDS in rhesus monkeys by molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *Science* **248**: 1109-1112

- Kim MO, Suh HS, Si Q, Terman BI, Lee SC** (2006) Anti-CD45RO suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in microglia: role of Hck tyrosine kinase and implications for AIDS dementia. *J Virol* **80**: 62-72
- Kim WK, Alvarez X, Fisher J, Bronfin B, Westmoreland S, McLaurin J, Williams K** (2006) CD163 identifies perivascular macrophages in normal and viral encephalitic brains and potential precursors to perivascular macrophages in blood. *Am J Pathol* **168**: 822-834
- Kim WK, Corey S, Alvarez X, Williams K** (2003) Monocyte/macrophage traffic in HIV and SIV encephalitis. *J Leukoc Biol* **74**: 650-656
- Kim WK, Corey S, Chesney G, Knight H, Klumpp S, Wuthrich C, Letvin N, Koralnik I, Lackner A, Veasey R, Williams K** (2004) Identification of T lymphocytes in simian immunodeficiency virus encephalitis: distribution of CD8+ T cells in association with central nervous system vessels and virus. *J Neurovirol* **10**: 315-325
- Kosub DA, Lehrman G, Milush JM, Zhou D, Chacko E, Leone A, Gordon S, Silvestri G, Else JG, Keiser P, Jain MK, Sodora DL** (2008) Gamma/Delta T-cell functional responses differ after pathogenic human immunodeficiency virus and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections. *J Virol* **82**: 1155-1165
- Kramer-Hammerle S, Rothenaigner I, Wolff H, Bell JE, Brack-Werner R** (2005) Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res* **111**: 194-213
- Lackner AA** (1994) Pathology of simian immunodeficiency virus induced disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **188**: 35-64
- Lawrence DM, Major EO** (2002) HIV-1 and the brain: connections between HIV-1-associated dementia, neuropathology and neuroimmunology. *Microbes Infect* **4**: 301-308
- Le Bouteiller P, Piccinni MP** (2008) Human NK cells in pregnant uterus: why there? *Am J Reprod Immunol* **59**: 401-406
- Le Grand R, Vogt G, Vaslin B, Roques P, Theodoro F, Aubertin AM, Dormont D** (1992) Specific and non-specific immunity and protection of macaques against SIV infection. *Vaccine* **10**: 873-879
- Lee TT, Martin FC, Merrill JE** (1993) Lymphokine induction of rat microglia multinucleated giant cell formation. *Glia* **8**: 51-61
- Letvin NL, King NW** (1990) Immunologic and pathologic manifestations of the infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**: 1023-1040

- Ley K** (2002) Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol Rev* **186**: 8-18
- Li H, Peng H, Ma P, Ruan Y, Su B, Ding X, Xu C, Pauza CD, Shao Y** (2008) Association between Vgamma2Vdelta2 T cells and disease progression after infection with closely related strains of HIV in China. *Clin Infect Dis* **46**: 1466-1472
- Lichterfeld M, Yu XG, Le Gall S, Altfeld M** (2005) Immunodominance of HIV-1-specific CD8(+) T-cell responses in acute HIV-1 infection: at the crossroads of viral and host genetics. *Trends Immunol* **26**: 166-171
- Liddament MT, Brown WL, Schumacher AJ, Harris RS** (2004) APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* **14**: 1385-1391
- Ling EA, Wong WC** (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* **7**: 9-18
- Lipton SA** (1997) Treating AIDS dementia. *Science* **276**: 1629-1630
- Lipton SA, Brenneman DE, Silverstein FS, Masliah E, Mucke L** (1995) gp120 and neurotoxicity in vivo. *Trends Pharmacol Sci* **16**: 122
- Liu Y, Tang XP, McArthur JC, Scott J, Gartner S** (2000) Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gp160 sequences from a patient with HIV dementia: evidence for monocyte trafficking into brain. *J Neurovirol* **6 Suppl 1**: S70-81
- Major EO, Rausch D, Marra C, Clifford D** (2000) HIV-associated dementia. *Science* **288**: 440-442
- Marcondes MC, Burdo TH, Sopper S, Huitron-Resendiz S, Lanigan C, Watry D, Flynn C, Zandonatti M, Fox HS** (2007) Enrichment and persistence of virus-specific CTL in the brain of simian immunodeficiency virus-infected monkeys is associated with a unique cytokine environment. *J Immunol* **178**: 5812-5819
- Mariani R, Chen D, Schrefelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B, Munk C, Nymark-McMahon H, Landau NR** (2003) Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**: 21-31
- Martin-Garcia J, Kolson DL, Gonzalez-Scarano F** (2002) Chemokine receptors in the brain: their role in HIV infection and pathogenesis. *Aids* **16**: 1709-1730
- Masliah E, Ge N, Achim CL, Hansen LA, Wiley CA** (1992) Selective neuronal vulnerability in HIV encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol* **51**: 585-593

- Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, Wormser G, Brettman L, Lange M, Murray HW, Cunningham-Rundles S** (1981) An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* **305**: 1431-1438
- McArthur JC, Hoover DR, Bacellar H, Miller EN, Cohen BA, Becker JT, Graham NM, McArthur JH, Selnes OA, Jacobson LP, et al.** (1993) Dementia in AIDS patients: incidence and risk factors. Multicenter AIDS Cohort Study. *Neurology* **43**: 2245-2252
- McArthur JC, Sacktor N, Selnes O** (1999) Human immunodeficiency virus-associated dementia. *Semin Neurol* **19**: 129-150
- McCarthy M, He J, Wood C** (1998) HIV-1 strain-associated variability in infection of primary neuroglia. *J Neurovirol* **4**: 80-89
- McCrossan M, Marsden M, Carnie FW, Minnis S, Hansoti B, Anthony IC, Brettle RP, Bell JE, Simmonds P** (2006) An immune control model for viral replication in the CNS during presymptomatic HIV infection. *Brain* **129**: 503-516
- Mellman I, Koch T, Healey G, Hunziker W, Lewis V, Plutner H, Miettinen H, Vaux D, Moore K, Stuart S** (1988) Structure and function of Fc receptors on macrophages and lymphocytes. *J Cell Sci Suppl* **9**: 45-65
- Meltzer MS, Nakamura M, Hansen BD, Turpin JA, Kalter DC, Gendelman HE** (1990) Macrophages as susceptible targets for HIV infection, persistent viral reservoirs in tissue, and key immunoregulatory cells that control levels of virus replication and extent of disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**: 967-971
- Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R** (2001) Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* **101**: 249-255
- Monken CE, Wu B, Srinivasan A** (1995) High resolution analysis of HIV-1 quasispecies in the brain. *Aids* **9**: 345-349
- Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA** (2004) The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**: 111-126
- Morris A, Marsden M, Halcrow K, Hughes ES, Brettle RP, Bell JE, Simmonds P** (1999) Mosaic structure of the human immunodeficiency virus type 1 genome infecting lymphoid cells and the brain: evidence for frequent in vivo recombination events in the evolution of regional populations. *J Virol* **73**: 8720-8731

- Mukhtar M, Harley S, Chen P, BouHamdan M, Patel C, Acheampong E, Pomerantz RJ** (2002) Primary isolated human brain microvascular endothelial cells express diverse HIV/SIV-associated chemokine coreceptors and DC-SIGN and L-SIGN. *Virology* **297**: 78-88
- Murphy FA KD** (1990) *Virus taxonomy*, Vol second edition
- Murray EA, Rausch DM, Lendvay J, Sharer LR, Eiden LE** (1992) Cognitive and motor impairments associated with SIV infection in rhesus monkeys. *Science* **255**: 1246-1249
- Nath A** (2002) Human immunodeficiency virus (HIV) proteins in neuropathogenesis of HIV dementia. *J Infect Dis* **186 Suppl 2**: S193-198
- Negri DR, Baroncelli S, Catone S, Comini A, Michelini Z, Maggiorella MT, Sernicola L, Crostarosa F, Belli R, Mancini MG, Farcomeni S, Fagrouch Z, Ciccozzi M, Boros S, Liljestrom P, Norley S, Heeney J, Titti F** (2004) Protective efficacy of a multicomponent vector vaccine in cynomolgus monkeys after intrarectal simian immunodeficiency virus challenge. *J Gen Virol* **85**: 1191-1201
- Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, 2nd, Lyman S, Paddock C, Muller WA** (1990) PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* **247**: 1219-1222
- Panek RB, Benveniste EN** (1995) Class II MHC gene expression in microglia. Regulation by the cytokines IFN-gamma, TNF-alpha, and TGF-beta. *J Immunol* **154**: 2846-2854
- Pauls K, Schon M, Kubitza RC, Homey B, Wiesenborn A, Lehmann P, Ruzicka T, Parker CM, Schon MP** (2001) Role of integrin alphaE(CD103)beta7 for tissue-specific epidermal localization of CD8+ T lymphocytes. *J Invest Dermatol* **117**: 569-575
- Peluso R, Haase A, Stowring L, Edwards M, Ventura P** (1985) A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology* **147**: 231-236
- Peress NS, Fleit HB, Perillo E, Kuljis R, Pezzullo C** (1993) Identification of Fc gamma RI, II and III on normal human brain ramified microglia and on microglia in senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* **48**: 71-79
- Perry VH, Lawson LJ, Reid DM** (1994) Biology of the mononuclear phagocyte system of the central nervous system and HIV infection. *J Leukoc Biol* **56**: 399-406
- Persidsky Y, Nottet HS, Sasseville VG, Epstein LG, Gendelman HE** (1995) The development of animal model systems for HIV-1 encephalitis and its associated dementia. *J Neurovirol* **1**: 229-243

- Pierson T, McArthur J, Siliciano RF** (2000) Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol* **18**: 665-708
- Poccia F, Gougeon ML, Agrati C, Montesano C, Martini F, Pauza CD, Fisch P, Wallace M, Malkovsky M** (2002) Innate T-cell immunity in HIV infection: the role of Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes. *Curr Mol Med* **2**: 769-781
- Pomerantz RJ** (2004) Effects of HIV-1 Vpr on neuroinvasion and neuropathogenesis. *DNA Cell Biol* **23**: 227-238
- Prospero-Garcia O, Gold LH, Fox HS, Polis I, Koob GF, Bloom FE, Henriksen SJ** (1996) Microglia-passaged simian immunodeficiency virus induces neurophysiological abnormalities in monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14158-14163
- Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR** (1998) The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* **101**: 746-754
- Qing Z, Sandor M, Radvany Z, Sewell D, Falus A, Potthoff D, Muller WA, Fabry Z** (2001) Inhibition of antigen-specific T cell trafficking into the central nervous system via blocking PECAM1/CD31 molecule. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**: 798-807
- Re F, Belyanskaya SL, Riese RJ, Cipriani B, Fischer FR, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, Brosnan C, Stern LJ, Strominger JL, Santambrogio L** (2002) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces an expression program in neonatal microglia that primes them for antigen presentation. *J Immunol* **169**: 2264-2273
- Reger M, Welsh R, Razani J, Martin DJ, Boone KB** (2002) A meta-analysis of the neuropsychological sequelae of HIV infection. *J Int Neuropsychol Soc* **8**: 410-424
- Rihs S, Walker C, Virchow JC, Jr., Boer C, Kroegel C, Giri SN, Braun RK** (1996) Differential expression of alpha E beta 7 integrins on bronchoalveolar lavage T lymphocyte subsets: regulation by alpha 4 beta 1-integrin crosslinking and TGF-beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**: 600-610
- Roberts ES, Masliah E, Fox HS** (2004) CD163 identifies a unique population of ramified microglia in HIV encephalitis (HIVE). *J Neuropathol Exp Neurol* **63**: 1255-1264
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK** (2004) Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* **17**: 942-964, table of contents

- Rosas-Murrieta N, Herrera-Camacho I, Vallejo-Ruiz V, Millan-Perez-Pena L, Cruz C, Tapia-Ramirez J, Santos-Lopez G, Reyes-Leyva J** (2007) Differential sensitivity to interferon influences the replication and transcription of Urabe AM9 mumps virus variants in nerve cells. *Microbes Infect* **9**: 864-872
- Sarnacki S, Begue B, Buc H, Le Deist F, Cerf-Bensussan N** (1992) Enhancement of CD3-induced activation of human intestinal intraepithelial lymphocytes by stimulation of the beta 7-containing integrin defined by HML-1 monoclonal antibody. *Eur J Immunol* **22**: 2887-2892
- Schnittman SM, Fauci AS** (1994) Human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome: an update. *Adv Intern Med* **39**: 305-355
- Schrader JW** (1986) The panspecific hemopoietin of activated T lymphocytes (interleukin-3). *Annu Rev Immunol* **4**: 205-230
- Schrager LK, D'Souza MP** (1998) Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy. *Jama* **280**: 67-71
- Schwinzer R** (1989) Cluster Report: CD45/CD45R. *In* BD W KNAPP, P RIEBER, R SCHMIDT, WR GILKS, ed, *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. Oxford University Press, Oxford, pp 628-634
- Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dorries R, Butcher GW, ter Meulen V** (1991) Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7438-7442
- Segal BM** (2007) The role of natural killer cells in curbing neuroinflammation. *J Neuroimmunol* **191**: 2-7
- Seguin R, Biernacki K, Prat A, Wosik K, Kim HJ, Blain M, McCrea E, Bar-Or A, Antel JP** (2003) Differential effects of Th1 and Th2 lymphocyte supernatants on human microglia. *Glia* **42**: 36-45
- Sharer LR** (1994) Neuropathology and pathogenesis of SIV infection of the central nervous system. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **72**: 133-145
- Sharer LR, Michaels J, Murphey-Corb M, Hu FS, Kuebler DJ, Martin LN, Baskin GB** (1991) Serial pathogenesis study of SIV brain infection. *J Med Primatol* **20**: 211-217
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH** (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**: 646-650

- Shieh JT, Albright AV, Sharron M, Gartner S, Strizki J, Doms RW, Gonzalez-Scarano F** (1998) Chemokine receptor utilization by human immunodeficiency virus type 1 isolates that replicate in microglia. *J Virol* **72**: 4243-4249
- Siegal FP, Lopez C, Hammer GS, Brown AE, Kornfeld SJ, Gold J, Hassett J, Hirschman SZ, Cunningham-Rundles C, Adelsberg BR, et al.** (1981) Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N Engl J Med* **305**: 1439-1444
- Siliciano RF** (1999) Latency and reservoirs for HIV-1. *Aids* **13 Suppl A**: S49-58
- Simmonds P, Balfe P, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJ** (1990) Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **64**: 5840-5850
- Simmons DL, Walker C, Power C, Pigott R** (1990) Molecular cloning of CD31, a putative intercellular adhesion molecule closely related to carcinoembryonic antigen. *J Exp Med* **171**: 2147-2152
- Song L, Nath A, Geiger JD, Moore A, Hochman S** (2003) Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein directly activates neuronal N-methyl-D-aspartate receptors at an allosteric zinc-sensitive site. *J Neurovirol* **9**: 399-403
- Song X, Tanaka S, Cox D, Lee SC** (2004) Fcγ receptor signaling in primary human microglia: differential roles of PI-3K and Ras/ERK MAPK pathways in phagocytosis and chemokine induction. *J Leukoc Biol* **75**: 1147-1155
- Sopper S, Koutsilieri E, Scheller C, Czub S, Riederer P, ter Meulen V** (2002) Macaque animal model for HIV-induced neurological disease. *J Neural Transm* **109**: 747-766
- Sopper S, Sauer U, Hemm S, Demuth M, Muller J, Stahl-Hennig C, Hunsmann G, ter Meulen V, Dorries R** (1998) Protective role of the virus-specific immune response for development of severe neurologic signs in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol* **72**: 9940-9947
- Sopper S, Stahl-Hennig C, Demuth M, Johnston IC, Dorries R, ter Meulen V** (1997) Lymphocyte subsets and expression of differentiation markers in blood and lymphoid organs of rhesus monkeys. *Cytometry* **29**: 351-362
- Starkstein SE, Jorge R** (2005) Dementia after traumatic brain injury. *Int Psychogeriatr* **17 Suppl 1**: S93-107
- Stewart SA, Poon B, Song JY, Chen IS** (2000) Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis through caspase activation. *J Virol* **74**: 3105-3111

- Stins MF, Pearce D, Di Cello F, Erdreich-Epstein A, Pardo CA, Sik Kim K** (2003) Induction of intercellular adhesion molecule-1 on human brain endothelial cells by HIV-1 gp120: role of CD4 and chemokine coreceptors. *Lab Invest* **83**: 1787-1798
- Stockinger H, Gadd SJ, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrerck W, Strass B, Schnabl E, Knapp W** (1990) Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immunol* **145**: 3889-3897
- Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W, Greene WC** (2003) HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* **12**: 591-601
- Streit WJ, Kincaid-Colton CA** (1995) The brain's immune system. *Sci Am* **273**: 54-55, 58-61
- Sundar KS, Kamaraju LS, Dingfelder J, McMahon J, Gollapudi S, Wilson WH, Kong LY, Hong JS, Weiss JM, Lee JE** (1995) beta-Endorphin enhances the replication of neurotropic human immunodeficiency virus in fetal perivascular microglia. *J Neuroimmunol* **61**: 97-104
- Svenningsson A, Andersen O, Edsbacke M, Stemme S** (1995) Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* **63**: 39-46
- Takahashi K, Wesselingh SL, Griffin DE, McArthur JC, Johnson RT, Glass JD** (1996) Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/in situ hybridization and immunocytochemistry. *Ann Neurol* **39**: 705-711
- Toborek M, Lee YW, Flora G, Pu H, Andras IE, Wylegala E, Hennig B, Nath A** (2005) Mechanisms of the blood-brain barrier disruption in HIV-1 infection. *Cell Mol Neurobiol* **25**: 181-199
- Trkola A** (2004) HIV-host interactions: vital to the virus and key to its inhibition. *Curr Opin Microbiol* **7**: 407-411
- Trowbridge IS, Thomas ML** (1994) CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* **12**: 85-116
- Ullrich O, Diestel A, Eyupoglu IY, Nitsch R** (2001) Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nat Cell Biol* **3**: 1035-1042

- Ulvestad E, Williams K, Bjerkvig R, Tiekotter K, Antel J, Matre R** (1994) Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* **56**: 732-740
- Ulvestad E, Williams K, Mork S, Antel J, Nyland H** (1994) Phenotypic differences between human monocytes/macrophages and microglial cells studied in situ and in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol* **53**: 492-501
- UNAIDS/WHO** (2006) UNAIDS/WHO AIDS Epidemic Update: December 2006.
- Vallat AV, De Girolami U, He J, Mhashilkar A, Marasco W, Shi B, Gray F, Bell J, Keohane C, Smith TW, Gabuzda D** (1998) Localization of HIV-1 co-receptors CCR5 and CXCR4 in the brain of children with AIDS. *Am J Pathol* **152**: 167-178
- Vogt M, Bauer MK, Ferrari D, Schulze-Osthoff K** (1998) Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells. *FEBS Lett* **429**: 67-72
- Wang T, Rumbaugh JA, Nath A** (2006) Viruses and the brain: from inflammation to dementia. *Clin Sci (Lond)* **110**: 393-407
- Watkins BA, Dorn HH, Kelly WB, Armstrong RC, Potts BJ, Michaels F, Kufta CV, Dubois-Dalcq M** (1990) Specific tropism of HIV-1 for microglial cells in primary human brain cultures. *Science* **249**: 549-553
- Wesselingh SL, Takahashi K, Glass JD, McArthur JC, Griffin JW, Griffin DE** (1997) Cellular localization of tumor necrosis factor mRNA in neurological tissue from HIV-infected patients by combined reverse transcriptase/polymerase chain reaction in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Neuroimmunol* **74**: 1-8
- Wiegand HL, Doehle BP, Bogerd HP, Cullen BR** (2004) A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *Embo J* **23**: 2451-2458
- Wilk E, Kalippke K, Buyny S, Schmidt RE, Jacobs R** (2008) New aspects of NK cell subset identification and inference of NK cells' regulatory capacity by assessing functional and genomic profiles. *Immunobiology* **213**: 271-283
- Williams K, Alvarez X, Lackner AA** (2001) Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia* **36**: 156-164

- Wilt SG, Milward E, Zhou JM, Nagasato K, Patton H, Rusten R, Griffin DE, O'Connor M, Dubois-Dalcq M** (1995) In vitro evidence for a dual role of tumor necrosis factor-alpha in human immunodeficiency virus type 1 encephalopathy. *Ann Neurol* **37**: 381-394
- Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, Strand C, Woodroffe MN, Cuzner ML, Hafler DA** (1995) Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* **182**: 1985-1996
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC** (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**: 1431-1433
- Yedavalli VS, Shih HM, Chiang YP, Lu CY, Chang LY, Chen MY, Chuang CY, Dayton AI, Jeang KT, Huang LM** (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with antiapoptotic mitochondrial protein HAX-1. *J Virol* **79**: 13735-13746
- Yoshioka M, Bradley WG, Shapshak P, Nagano I, Stewart RV, Xin KQ, Srivastava AK, Nakamura S** (1995) Role of immune activation and cytokine expression in HIV-1-associated neurologic diseases. *Adv Neuroimmunol* **5**: 335-358
- Zaitseva M, Peden K, Golding H** (2003) HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1614**: 51-61
- Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ** (1993) CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* **14**: 121-125

Anhang

Tab. 1: Zusammenfassung Tiere I

Tier	Experiment	Infektion		Dauer in Jahren	Status	Sektion		Geschlecht
		SIV Klon	Immunisierung			Datum	Alter in Jahren	
1939	86	239	-	5,8	Neuro-AIDS	21.12.2005	10,7	w
2141	126	239	+	2,6	AIDS	11.03.2008	7,0	m
2145	126	239	+	1,6	AIDS	06.03.2007	5,9	m
2161	126	239	+	2,0	AIDS	22.08.2007	6,3	w
2165	126	239	+	2,0	AIDS	28.08.2007	5,3	w
2168	126	239	+	2,3	AIDS	21.11.2007	6,6	m
2175	126	239	+	0,3	AIDS	20.12.2005	4,5	m
2187	127	239	+	1,0	AIDS	24.08.2006	4,6	m
2188	127	239	+	2,7	AIDS	15.04.2008	6,2	w
2194	126	239	-	2,2	Neuro-AIDS	25.10.2007	4,7	m
2208	129	251	+	0,8	AIDS	20.07.2007	5,3	m
2220					unifiziert	01.03.2007	4,8	m
2223	127	239	-	1,1	asymptomatisch	07.09.2006	4,3	m
2231	127	239	-	1,0	asymptomatisch	26.07.2006	3,9	m
2280					unifiziert	31.05.2007	3,2	w
7483					unifiziert	19.10.2006	21,5	m
7541					unifiziert	19.01.2007	7,2	m
7760					unifiziert	30.01.2008	2,0	w
8313	88	251	+	9,3	Neuro-AIDS	20.09.2007	13,2	m
8652	120	239	+	2,3	Neuro-AIDS	18.05.2006	10,4	m
9292					unifiziert	11.04.2008	15,9	w
10142	132	251	-	0,3	asymptomatisch	23.08.2007	10,0	m
10943	132	251	-	0,7	asymptomatisch	18.12.2007	10,2	m
10945	132	251	-	0,6	asymptomatisch	06.11.2007	10,3	m
11165					unifiziert	18.12.2006	5,4	m
11227	118	251	-	0,1	asymptomatisch	15.10.2007	10,0	w
11229					unifiziert	23.01.2008	10,2	w
11231	118	251	+	0,9	asymptomatisch	24.07.2006	7,8	w
11238	132	251	-	0,2	asymptomatisch	28.06.2007	8,6	m
11241	118	251	+	1,2	asymptomatisch	10.08.2006	14,1	m
11590					unifiziert	08.12.2006	4,6	m
11612	129	251	+	1,1	AIDS	18.10.2007	5,4	m
11970	118	251	+	0,8	asymptomatisch	28.06.2006	8,3	w
12056	129	251	+	1,5	AIDS	07.05.2008	5,0	m
12529	132	251	-	0,3	asymptomatisch	04.07.2007	6,3	m
12532	127	239	+	1,3	AIDS	16.11.2006	5,8	m
12534	127	239	+	1,3	AIDS	18.10.2006	5,6	m
12537	127	239	+	2,3	AIDS	10.11.2007	6,5	m
12539	127	239	+	2,7	Neuro-AIDS	17.04.2008	6,9	m
12540	127	239	-	0,4	AIDS	04.01.2006	4,6	m
12541	127	239	+	2,7	AIDS	08.04.2008	6,7	m
12544	127	239	+	2,0	AIDS	30.07.2007	6,0	m
12670	127	239	-	0,5	asymptomatisch	15.02.2006	5,8	m
12673	127	239	-	1,0	asymptomatisch	06.07.2006	5,3	m
13248	129	251	+	0,5	AIDS	29.03.2007	4,9	m
13249	129	251	+	0,7	Neuro-AIDS	24.05.2007	5,0	m
13252	129	251	+	1,0	AIDS	06.09.2007	5,0	m
13254					unifiziert	24.05.2006	3,6	m
13255	129	251	+	0,8	Neuro-AIDS	06.07.2007	4,5	m
13256	129	251	+	0,8	AIDS	12.07.2007	4,5	m
13259	132	251	-	0,7	asymptomatisch	05.12.2007	4,8	m
13261	129	251	+	1,1	AIDS	17.10.2007	4,7	m
13262	129	251	-	0,8	Neuro-AIDS	10.07.2007	4,3	m

m männlich
w weiblich

Tab. 2: Zusammenfassung Tiere II

Tier	histologischer Befund Hauptbefunde	lymphatische System	Zentralnervensystem
1939	Respirationstrakt (subakute interstitielle Pneumonie)	Hyperplasie +++	SIV induzierte Enzephalomyelitis (perivaskuläres Entzündungszellinfiltrat, angrenzende Neurophil mit Myelinverlust)
2141	gekämmerter Abzess (7cm) im Bereich Samenbläsendrüsen, Digestionstrakt (mittelgradige Enteritis, hochgradige Serositis)	Depletion ++	o.B.
2145	Respirationstrakt (hochgradige P.j. Pneumonie), Digestionstrakt (Mykobakteriose), Herzveränderung (thrombotische Endokarditis)	Hyperplasie +++	k.U.
2161	systemische Leukose mit Wucherungen in diversen Organen	Involution	o.B.
2165	Respirationstrakt (hochgradige P.j. Pneumonie), Digestionstrakt (Mykobakteriose)	Involution	o.B.
2168	Extremitäten (2 Umfangsvermehrungen, Verdacht auf Blutgefäßtumor)	Hyperplasie +++	o.B.
2175	Digestionstrakt (ausgedehnte Gastroenteritis, Parasitose), Nieren (Glomerulonephritis)	Hyperplasie ++	o.B.
2187	Respirationstrakt (fibröse Pleuritis/Arteriopathie), Nieren (Hämo- bzw. Myoglobinämie), Herzinsuffizienz	Hyperplasie +	o.B.
2188	lymphoretikuläre System (Lymphknoten malignes Lymphom vom B-Zelltyp, auch Milz mit Verdacht auf Lymphom)	Hyperplasie +++	Meningitis (granulomatöses Entzündungszellinfiltrat)
2194	Niere (beginnend maligne Lymphome), Muskulatur (hochgradige pyogranulomatöse Myositis)	Hyperplasie +++	o.B., vielkernige Riesenzellen in Primärkultur beobachtet
2208	Respirationstrakt (hochgradige P.j. Pneumonie)	Hyperplasie ++	o.B.
2220	k.H.	Hyperplasie +	k.U.
2223	Respirationstrakt (hochgradige eitrig nekrotisierende Bronchitis und Peribronchitis)	Hyperplasie +++	o.B.
2231	Respirationstrakt (mittelgradige interstitielle Pneumonie)	Hyperplasie +++	Großhirn diffuses Astrozytenödem
2280	peripherer Nervenscheidentumor rechter Hinterschenkel (mit Muskulatur, Knochen), Milztumor, Digestionstrakt (Parasitose)	Hyperplasie +	k.U.
7483	linke Niere atrophisch, Veränderungen der Lunge (Lungenmilben, Parasitose)	k.A.	o.B.
7541	Herz (thrombosierende Endokarditis parietalis)	Hyperplasie +	k.U.
7760	Bissverletzung Bereich Unterlippe mit Wundinfektion, Bronchopneumonie, Staphylococcus aureus Infektion	Hyperplasie +	Staphylococcus aureus Infektion
8313	Darmtrakt (Parasitosen)	Hyperplasie ++	SIV induzierte Enzephalopathie (perivaskuläres Entzündungszellinfiltrat)
8652	k.H.	Hyperplasie +++	SIV induzierte Enzephalopathie (perivaskuläres Entzündungszellinfiltrat, einzelne Mikrogranulome)
9292	subakute multifokal herdförmige eitrig nekrotisierende Pneumonie, katarrhale Colitis	k.A.	o.B.
10142	k.H.	k.A.	o.B.
10943	k.H.	k.A.	o.B.
10945	Harnapparat (Amyloidose)	k.A.	o.B.
11165	k.H.	Hyperplasie +	o.B.
11227	Nieren und Pankreas (Cytomegalovirusinfektion) und Medikamentenunverträglichkeit	Involution	geringgradige meningeale Hyperämie
11229	Genitaltrakt bzw. Beckenhöhle (Endometriose)	k.U.	o.B.
11231	k.H.	k.A.	o.B.
11238	k.H.	Hyperplasie +	Groß-/Klein-/ Stammhirn gering bis mittelgradiges Astrozytenödem
11241	k.H.	Hyperplasie ++	o.B.
11590	k.H.	Hyperplasie +	Großhirn geringgradiges Astrozytenödem
11612	Respirationstrakt (hochgradige P.j. Pneumonie), Digestionstrakt (Mischinfektion)	Involution	o.B.
11970	k.H.	Hyperplasie ++	o.B.
12056	Digestionstrakt (hochgradige katarrhale bis proliferative Enteritis)	Hyperplasie +	o.B.
12529	Darmtrakt (chronisch aktive Gastritis)	Hyperplasie +	Groß-/Klein-/ Stammhirn geringgradiges Astrozytenödem
12532	Respirationstrakt (hochgradige P.j. Pneumonie), Digestionstrakt (chronische Entzündungen)	Hyperplasie ++	o.B.
12534	Leber und Pankreas (hochgradige chronische Kryptosporidiose)	Hyperplasie ++	o.B.
12537	Digestionstrakt (Endoskopiebereich Dickdarm fokal herdförmige hochgradige akute ulzerative Colitis und purulente Serositis)	Hyperplasie +++	o.B.
12539	Milz (schnell wachsendes malignes Lymphom vom B-Zelltyp)	Hyperplasie +++	Meningoenzephalitis (perivaskuläres Entzündungszellinfiltrat, vielkernigen Riesenzellen)
12540	k.H.	Aktivierung nur in Milz	Großhirn mittelgradiges Astrozytenödem (minimal lymphozytäre Zellinfiltrate mit Gefäßbezug)
12541	Digestionstrakt (hochgradige akute Colitis), Herz (Cardiomyopathie)	Hyperplasie +	o.B.
12544	systemische Leukose mit Wucherungen in diversen Organen, Darmtrakt (Parasitosen)	Involution	Großhirn fokal ausgedehnte submenigeale Blutungen
12670	k.H.	Hyperplasie +++	o.B.
12673	k.H.	Hyperplasie ++	Großhirn geringgradige Stauungshyperämie
13248	Digestionstrakt (Balantidien)	Hyperplasie ++	k.U.
13249	Respirationstrakt (mittelgradige P.j. Pneumonie), Digestionstrakt (Mischparasitose)	Involution	o.B., vielkernige Riesenzellen in Primärkultur beobachtet
13252	Respirationstrakt (mittelgradige P.j. Pneumonie), Digestionstrakt (Mischparasitose)	Involution	o.B.
13254	petechiale Blutungen in Herzmuskulatur und Haut (Mikroangiopathie)	Depletion +	o.B.
13255	Respirationstrakt (mittelgradige P.j. Pneumonie), Digestionstrakt (Parasitose)	Involution	SIV induzierte Enzephalopathie (vaskuläre/perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate, einzelne Mikrogranulome)
13256	Digestionstrakt (Parasitose)	Involution	o.B.
13259	k.H.	Hyperplasie +	o.B.
13261	Respirationstrakt (hochgradige P.j. Pneumonie), Digestionstrakt (Mischinfektion)	Involution	o.B.
13262	Respirationstrakt (hochgradige P.j. Pneumonie), Digestionstrakt (Mischparasitose)	Involution	SIV induzierte Enzephalopathie (Mikrogranulome, Gliaknoten, vielkerniger Riesenzellen)

+	geringgradig
++	mittelgradig
+++	hochgradig
o.B.	ohne Befund
k.U.	keine Untersuchung
k.A.	keine Aktivierung
k.H.	keine Hauptbefunde

Tab. 3: Zusammenfassung Leukozyten und Lymphozyten

Tier	Gehirn					Blut						
	Mikroglia *	Makrophagen *	Lymphozyten *	B-Zellen **	NK-Zellen **	T-Zellen **	Makrophagen *	Lymphozyten *	B-Zellen **	NK-Zellen **	T-Zellen **	
uninfiziert	2220	95,55	0,75	3,70	1,92	58,85	35,19	25,40	74,60	36,37	4,26	54,89
	2280	99,36	0,46	0,18	-	-	-	35,51	64,49	39,31	1,66	53,43
	7483	93,01	0,47	6,52	0,60	50,73	48,60	36,93	63,07	21,87	5,10	70,80
	7760	99,04	0,02	0,94	5,24	55,90	26,34	34,12	65,88	40,26	2,32	50,74
	9292	96,92	0,40	2,68	10,60	21,04	48,58	33,99	66,01	35,51	6,87	51,38
	11165	96,60	0,19	3,21	4,03	24,95	52,33	3,34	96,66	32,17	1,67	63,10
	11229	94,33	0,24	5,43	1,21	48,69	38,78	55,84	44,16	15,55	2,79	60,48
	11590	97,73	0,12	2,15	4,41	42,91	38,90	11,18	88,82	18,71	3,79	69,55
	Median	96,76	0,32	2,94	4,03	48,69	38,90	34,06	65,94	33,84	3,29	57,69
	asymptomatisch	2223	94,82	0,48	4,70	1,60	17,99	80,20	7,09	92,91	68,59	0,61
2231		99,15	0,17	0,68	1,22	7,12	78,41	-	-	-	-	-
10142		97,15	1,10	1,74	1,14	39,70	43,34	11,71	88,29	12,35	27,08	54,80
10943		95,20	2,44	2,36	2,14	11,90	47,22	25,92	74,08	18,33	5,25	73,49
10945		95,34	0,72	3,94	1,38	35,64	46,22	21,89	78,11	25,37	6,16	64,62
11231		97,50	0,00	2,50	0,31	20,00	79,59	4,11	95,89	9,78	4,29	84,87
11238		98,30	0,53	1,17	3,53	8,86	77,59	5,06	94,94	9,80	6,56	80,66
11241		84,33	0,92	14,75	1,71	15,38	82,11	7,17	92,83	22,91	12,89	63,89
11970		-	-	-	-	-	-	2,41	97,59	61,78	2,61	35,11
12529		96,35	0,92	2,73	6,53	56,61	26,99	31,73	68,27	7,31	32,24	45,25
12670		98,62	0,24	1,14	0,31	54,75	98,37	54,10	45,90	39,14	1,52	58,11
12673		92,83	1,42	5,75	0,38	1,19	44,54	-	-	-	-	-
13259		93,54	1,92	4,55	1,75	54,40	18,82	0,00	99,72	15,98	4,55	17,04
Median		95,84	0,82	2,61	1,49	18,99	62,41	7,17	92,83	18,33	5,25	58,11
AIDS		2141	95,87	0,55	3,58	1,79	9,75	74,62	55,86	44,14	30,59	2,95
	2145	96,84	0,20	2,96	4,23	23,76	65,63	19,67	80,33	54,31	3,21	29,77
	2161	97,04	0,37	2,58	4,32	42,13	38,91	19,89	80,11	17,26	8,84	71,22
	2165	90,65	2,05	7,30	2,06	54,74	36,21	35,94	64,06	13,88	23,71	61,35
	2168	80,36	0,88	18,76	2,60	60,99	18,76	13,41	86,59	26,30	19,69	48,04
	2175	92,86	3,43	3,71	2,03	18,43	78,49	20,49	79,51	4,84	2,04	89,56
	2187	92,88	3,30	3,82	3,48	4,44	62,71	14,19	85,81	64,02	1,44	32,06
	2188	96,65	0,39	2,96	7,45	18,72	58,51	5,30	94,70	85,28	1,27	9,56
	2208	98,90	0,13	0,97	1,44	48,74	38,54	47,47	52,53	31,41	19,98	39,70
	11612	95,71	0,74	3,56	4,02	8,61	78,09	74,75	25,25	53,02	7,47	36,31
	12056	95,03	0,93	4,04	0,88	72,61	17,55	21,90	78,10	17,97	35,57	42,97
	12532	93,82	3,28	2,90	6,73	23,14	56,04	11,73	88,27	24,96	3,54	69,81
	12534	98,46	0,24	1,30	0,00	49,21	50,11	11,37	88,63	34,12	10,28	54,55
	12540	97,98	0,49	1,53	2,49	9,97	87,43	23,21	76,79	5,57	2,97	89,83
	12541	97,13	0,48	2,39	1,06	20,70	60,67	6,87	93,13	27,69	5,32	30,39
	12544	96,54	0,31	3,15	3,43	19,54	63,50	28,55	71,45	12,29	12,31	62,50
	13248	96,23	0,68	3,09	3,60	15,61	70,33	77,14	22,86	25,98	1,75	62,05
	13252	90,68	0,10	9,22	1,48	69,57	14,69	55,58	44,42	17,51	19,70	58,89
	13256	96,70	1,27	2,03	2,48	49,09	43,18	22,01	77,99	7,88	12,39	77,84
	13261	86,98	0,94	12,07	35,65	9,30	41,65	45,45	54,55	62,33	1,61	33,32
Median	96,05	0,61	3,12	2,55	21,92	57,28	21,96	78,04	26,14	6,39	56,28	
Neuro-AIDS	2194	78,65	1,54	19,81	0,62	39,89	53,41	40,27	59,73	6,46	14,71	67,76
	12539	88,79	1,22	9,99	13,10	8,69	63,30	36,89	63,11	23,16	7,91	56,26
	13249	91,09	0,77	8,14	2,31	10,95	75,28	31,74	68,26	32,90	6,37	57,32
	13255	73,41	9,02	17,57	39,91	20,48	33,12	38,56	61,44	19,87	14,47	62,45
	13262	65,64	17,44	16,92	10,47	18,08	66,69	36,86	63,14	38,54	3,41	53,85
	8313	47,78	7,70	44,52	1,53	9,42	88,90	0,53	99,47	60,39	2,73	32,11
	Median	76,03	4,62	17,24	6,39	14,51	65,00	36,88	63,12	28,03	7,14	56,79

* Anteil an Leukozyten in %
 ** Anteil an Lymphozyten in %

Tab. 4: Zusammenfassung Cerebrospinalflüssigkeit

	Tier	B-Zellen *	NK-Zellen *	T-Zellen*	CD4+ T-Zellen **	CD28+***	CD69+***	CD183+***	MHCII+***	CD8+ T-Zellen **	CD28+***	CD69+***	CD183+***	MHCII+***	
uninfiziert	2209				42,70	99,40	63,00			46,00	61,40	57,20			
	2249				62,80	97,60	48,00			31,70	77,50	55,10			
	2284				44,30	97,20	45,60			50,00	51,40	49,30			
	2290				46,70	99,00	60,60			46,80	72,40	61,00			
	11161	6,94	0,33	92,41	61,00					26,80					
	11590	9,76	4,61	85,64	50,60	97,50	36,20	93,70	26,90	35,40	65,20	54,50	95,50	27,70	
	12045	33,77	3,15	63,08	65,40					21,90					
	12149				63,60			29,00		29,40				11,60	
	13082	26,90	7,61	65,48	49,60	56,20	43,70	48,40	42,20	40,30	34,60	46,20	51,90	44,20	
	13086	8,39	4,61	87,00	57,80	81,70	52,50	91,70	23,30	35,40	51,00	64,60	91,20	36,70	
	13087	1,84	2,11	96,05	70,60	89,50	30,70	69,80	28,90	23,50	66,30	57,10	76,30	36,70	
	13406	2,91	1,62	95,47	64,06	99,00	65,90		38,10	28,30	80,60	76,50		45,70	
	13566	2,94	2,35	94,70	45,60	95,80	62,70	82,30	32,30	49,30	80,70	83,90	95,70	43,60	
	13572	1,47	1,69	96,84	69,50	82,40	38,40	71,10	27,50	24,90	65,40	60,20	86,60	35,10	
	13573	3,24	2,39	94,37	40,10	78,40	61,30	80,60	53,20	51,70	65,70	83,20	87,10	63,60	
	Median	5,09	2,37	93,39											
	infiziert	2145				7,10	78,30	28,30	43,40	20,80	88,90	61,10	75,60	53,20	39,70
2187					9,16	93,30				88,00	60,20				
2231					6,04	98,50				77,70	72,50				
2223					8,20	98,30		91,90	27,10	85,40	68,80		95,00	54,50	
11231					56,70	91,30			29,10	34,80	73,10			34,60	
11970					36,40	96,10			29,30	55,20	56,20			59,00	
12532					22,80	99,50		59,40		61,40	29,80				
12534					20,80	100,00	0,00		40,00	41,70	30,00	80,00		40,00	
12673					6,09	92,50				85,30	70,20				
13081					28,30	97,70		86,50	22,20	60,80	84,30		98,90	69,10	
13084					36,10	88,50			35,20	57,40	49,50			54,60	
13088					46,30	90,60			21,90	46,60	67,40			40,60	
13092					57,40	98,80			21,90	37,70	64,80			25,80	
13094					39,70	96,10			37,30	55,40	7,61			75,30	
13096					49,60	83,50			26,30	44,40	58,70			59,10	
13097					52,10	97,50			40,60	41,60	77,10			70,90	
13098					51,40	98,60			26,90	43,00	5,75			53,40	
13099				45,10	87,70		53,40	8,56	37,40	46,10			86,40		
13249				37,80					56,40				15,80		
Median															

* Anteil an Lymphozyten in %

** Anteil an den T-Zellen in %

*** Anteil an den CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen in %

Tab. 5: normalisierte Fluoreszenzintensitäten - FITC

	Tier	29	45	21	29	64	63	103	28	83	40	56	45RB
uninfiziert	2220	2,09	2,49	0,93	2,15	5,50	1,36	1,36	0,94	1,13	0,94	0,97	1,24
	2280	1,42								0,97			
	7483	2,28	1,50	0,72	2,02		0,71		0,59				
	7760	1,58	2,02	0,97	1,56	3,14	1,17	1,15	0,92	1,08	0,94	0,97	
	9292	2,05	2,93	0,91		10,49	1,31		2,10	1,13	0,92	0,95	
	11229	2,75	3,77	1,02	1,22	7,80	2,86	2,48	1,22	1,63	1,40	1,72	
	11590	1,16	1,03	0,85	0,98	3,89	1,05	1,01	0,82		0,90	0,93	1,04
	Median	2,05	2,26	0,92	1,56	5,50	1,24	1,25	0,93	1,13	0,94	0,97	1,14
asymptotisch	10142	1,72								1,09			
	10943	1,91				2,54		1,37		1,11			
	10945	3,02				4,14		1,92		1,30			
	11238	2,26								1,07			
	12529	1,91								1,27			
	13259	2,06				5,77		1,76		1,36			
	Median	1,99				4,14		1,76		1,19			
	AIDS	2141	2,35	4,57	0,93	2,28	6,27	1,72	1,38	0,91	1,12	0,95	1,00
2145		2,41	3,18	1,01	2,29	4,04	1,44	1,21	0,97		1,05	1,08	1,45
2161		1,78	3,17	0,97	1,78		1,41	1,21	0,81				1,05
2165		1,99	3,66	1,05	2,07		1,54	1,22	0,97				1,02
2168		2,29				5,38		1,54		1,09			
2188		2,22	2,83	0,99	2,17	6,91		1,33	0,96			1,01	
2208		2,42	2,80	0,95	2,38	6,45	1,28	1,68	0,89				0,91
11612		1,74								1,11			
12056		1,67	2,56	1,03	1,73	5,39	0,97	1,53	0,99				
12532		1,76	4,20	0,91	1,80	1,83	1,75	1,09	0,89				
12534		1,78	1,02	0,76	1,45	1,62	0,96	0,81	0,64				
12541		2,10	2,49	0,80	2,08	6,94		1,37	1,02			0,99	
12544		1,77	3,14	0,97	1,79	6,26	1,34	1,42	0,97				0,92
13248		2,15	2,49	1,02	1,92	5,65	1,28	1,30	0,95		1,01		
13252		1,65	2,14	1,03	1,64	5,77	1,25	1,69	0,92				0,99
13256		1,73	2,52	0,95	1,71	4,77	1,20	1,24	0,96				1,16
13261		1,91											1,06
Median	1,91	2,81	0,97	1,86	5,65	1,31	1,33	0,96	1,11	1,01	1,00	1,03	
Neuro-AIDS	2194	2,39								1,08			
	12539		2,53	0,89	1,73	3,75		1,22				1,10	
	13249	1,72	3,10	0,98	1,74	9,78	1,27	1,15	1,00		0,99		
	13255	4,44	7,54	1,07	4,46	12,30	2,80	1,74	0,95				1,82
	13262	3,21	4,47	0,98	2,68	9,40	2,01	1,62	0,94				2,54
	8313	2,34	2,28	1,07	2,32	4,18	2,50	2,08	1,04				2,99
	Median	2,39	3,10	0,98	2,32	9,40	2,26	1,62	0,97	1,08	0,99	1,10	2,54

Mittelwert Negativkontrolle plus doppelte Standardabweichung (cut off) = 1,13

Tab. 6: normalisierte Fluoreszenzintensitäten - PE

	Tier	183	11b	80	86	163	127	MHCII	49d	11c	123	62L	31
uninfiziert	2220	0,98	18,67	1,61	1,39	1,21	0,95	1,66	1,00	1,04	2,02	1,57	1,42
	2280	1,97								0,82			
	7760	1,02	12,24	1,42	1,43	2,35	1,01	2,19	3,07	0,99	1,35	1,33	1,59
	9292	1,02	26,18	2,51		4,59	1,21		1,94	2,62	1,73	1,85	2,28
	11165	0,91	30,23	1,47	1,40	0,81	0,95	1,33	0,87	0,94	2,94	2,69	1,44
	11229	1,25	39,99	1,96	1,13	1,04	1,21	1,60	1,13	1,26	3,59	1,93	
	11590	1,15	24,70	1,48	1,17	0,77	1,03	0,96	0,79	0,91	1,25	1,00	1,05
	Median	1,02	25,44	1,54	1,39	1,13	1,02	1,60	1,07	0,99	1,88	1,71	1,44
	<hr/>												
asymptotisch	2223	1,05	30,42	1,28	1,37	1,02	0,99						
	2231		9,10	1,19	1,69	1,33	1,13						
	10142	1,02								1,02			
	10943	0,95								1,02	2,03		1,09
	10945	1,07								1,21	2,93		1,34
	11231		32,54	1,52	1,67	1,31	1,10						
	11238	1,13								1,22			
	11241		27,30	1,38		0,74	0,66						
	12529	0,90								0,99			
	12670		37,60	1,64									
	12673		23,46	1,25	1,56	0,91	0,94						
	13259	0,95								1,13			
	Median	1,02	28,86	1,33	1,61	1,02	0,99			1,07	2,48		1,22
<hr/>													
AIDS	2141	1,04	41,39	1,83	2,02	2,19	1,07	8,13	0,98	1,01	2,28	1,70	1,83
	2145	1,05	19,49	1,76	1,51	0,96	0,98	1,60	1,03	1,02	2,12	1,38	1,37
	2161	1,00	16,46	1,82	1,88		1,02	5,91	0,80	1,00			1,62
	2165	1,10	29,27	1,75	1,93		1,10	10,28	1,03	1,06			1,59
	2168	1,06								1,14	2,60		1,31
	2175		21,40	1,14									
	2187		52,20	1,34	1,84	0,80	0,80			1,33			
	2188	1,09	23,79	1,67	1,52	0,99		2,10		1,02			1,21
	2208	0,91	25,98	2,12	1,52	3,43	0,96	2,97	0,95	0,94			1,45
	11612	1,04								1,03			
	12056	1,16	25,12	2,37	2,37	2,53		2,96					
	12532	0,99	44,51	2,55	2,81	1,42	1,12	10,59	1,11				
	12534	0,81	4,66	1,44	1,23	0,67	0,60	2,02	0,59	0,55			
	12540		16,01	1,34									
	12541	1,12	23,99	1,35	1,69	1,13		4,42		1,07			1,75
	12544	0,92	30,16	2,37	1,98	0,96	1,05	4,63	1,00	0,94			1,26
	13248	1,21	14,24	1,72	1,55	1,04	0,96	2,21	1,04	0,95			
	13252	1,10	18,34	2,85	1,94	0,96	1,16	2,99	1,11	1,00			1,39
	13256	0,93	20,36	1,67	1,62	0,94	0,97	1,91	1,02	0,98			1,36
	13261	0,94								0,93			
	Median	1,04	23,79	1,75	1,84	0,99	1,00	2,98	1,02	1,01	2,28	1,54	1,39
<hr/>													
Neuro-AIDS	2194	0,98											
	8652		16,46	1,32	1,67	0,69	0,68						
	12539		15,90	1,71	2,36	1,11		7,75		1,02			1,38
	13249	0,96	17,90	2,45	2,53	0,88	0,95	14,47	1,06	0,96			
	13255	0,67	38,45	4,62	3,57	1,55	1,14	36,32	2,09	1,12			4,07
	13262	1,09	22,61	2,20	2,65	1,19	1,07	2,43	1,34	1,25			2,84
	8313	2,30	17,30	3,83	5,63	1,87	1,71	42,73	1,75	2,32	5,10		2,77
	Median	0,98	17,60	2,32	2,59	1,15	1,07	14,47	1,55	1,12	5,10		2,81

Mittelwert Negativkontrolle plus doppelte Standardabweichung (cut off) = 1,33

Tab. 7: normalisierte Fluoreszenzintensitäten - APC

	Tier	45	195	195	86	69	45	95	45	45	1c	22	11a
uninfiziert	2220	19,47	2,41	1,92	1,33	1,20	15,79	1,11	21,10	20,46	1,35	1,15	3,23
	2280	14,32								11,61			
	7483			5,39	1,41	1,83		2,30					2,43
	7760	22,40	2,38	2,03	1,43	1,32	15,87	1,47	21,22	20,99	1,09	1,14	4,47
	9292	12,68	1,38	1,54	1,10		20,01	1,23		18,15	0,54	0,85	4,15
	11165	41,73	2,90	1,92	1,52	1,33	36,00	1,21	37,57		1,63	1,18	5,46
	11229	14,19	1,53	1,61	1,37	1,00	37,82	1,66	7,98	4,92	1,13	1,26	
	11590	21,90	1,37	2,04	1,48	1,33	5,12	1,24	1,61		1,40	1,16	1,53
	Median	19,47	1,96	1,92	1,41	1,32	17,94	1,24	21,10	18,15	1,24	1,16	3,69
	asymptomatisch	2223			4,18	1,24	1,25		2,29				
10142		10,36								10,22			
10943		33,85					21,16	1,55		31,88			4,98
10945		22,18					13,68	1,12		24,30			5,78
11238		26,06								17,90			
12529		30,13								30,75			
13259		43,82					44,97	1,21		50,88			0,97
Median		28,10		4,18	1,24	1,25	21,16	1,38		27,52			4,42
AIDS	2141	55,06	1,89	3,04	1,89	1,52	37,33	2,67	54,83	49,62	0,37	1,24	8,48
	2145	25,79	2,51	1,85	1,35	1,28	22,19	1,23	24,39		1,13	1,40	3,83
	2165	17,16	0,85	1,28	1,10	0,55	0,00	1,05	19,46		0,53		3,23
	2168	26,46					44,35	1,23		50,40			4,17
	2188	23,84	1,50	1,63	1,30	1,21	20,36		30,71		1,00		3,64
	2208	20,56	3,48	2,21	1,45	1,29	15,99	1,38	18,63		1,35		4,32
	11612	18,19								21,39			
	12532	51,52	3,54	2,45	2,33	1,34	48,03	2,30	49,01				
	12534			3,09	2,30	1,34		2,41			1,40		5,38
	12541	19,90	1,43	1,87	1,33	1,16	18,88		36,59		0,58		5,02
	12544	15,73	3,02	2,06	1,59	1,19	13,43	1,36	15,16		1,20		4,90
	13248	30,93	1,88	1,59	1,40	1,17	22,80	1,34	30,26		1,05		
	13252	20,04	3,82	2,77	1,47	1,36	14,80	1,48	13,02		1,20		4,36
	13256	22,75	0,97	2,33	1,54	1,27	19,94	1,35	26,71		1,07		4,54
	13261	22,34								27,74			
	Median	22,54	1,89	2,14	1,46	1,28	20,15	1,36	26,71	38,68	1,07	1,32	4,36
	Neuro-AIDS	2194	14,18					9,95			13,99		
12539		40,23		2,88	2,21	1,23	21,49		29,98		1,30		2,61
13249		30,24	2,25	2,77	1,92	1,44	27,11	2,54	34,62		1,02		
13255		65,90	1,69	2,12	3,03	1,75	42,50	5,41	62,37		0,88		8,65
13262		38,95	2,54	2,34	2,33	1,62	31,80	3,14	44,33		1,21		8,03
8313		49,76	1,77	2,44	3,28	2,38	2,04	2,94	2,86	0,00	1,44	0,00	5,21
Median		39,59	2,01	2,44	2,33	1,62	24,30	3,04	34,62	7,00	1,21	0,00	6,62

Mittelwert Negativkontrolle plus doppelte Standardabweichung (cut off) = 1,49

Tab. 8: normalisierte Fluoreszenzintensitäten – ECD, PerCP-Cy5.5, APC-Cy7

	Tier	ECD 45RA		PerCP-Cy5.5			APC-Cy7 MHCII	
		69		14	28	4		4
uninfiziert	2220	1,04	0,94	1,80	1,64	1,22	2,29	0,87
	2280	1,29					4,49	
	7760	1,06	1,05	1,88	1,00	1,02	3,66	1,07
	9292	1,20	0,99	3,43	1,01	1,07	3,42	
	11165	1,14	0,96	2,86	0,96	1,09	2,07	1,04
	11229	1,02	1,04	1,89	0,90	0,99	2,95	1,08
	11590	1,33	0,75	1,77	1,01	0,83	1,21	
	13254			3,35				
	Median	1,14	0,98	1,89	1,01	1,05	2,95	1,06
	asymptotisch	2223			4,44	1,54	0,99	2,92
2231				3,30				
10142		0,98		1,27			1,68	
10943		1,06		2,18			11,65	
10945		1,00		2,14			5,94	
11231				3,30				
11238		1,01		1,74			6,38	
11241				6,95				
12529		1,18		2,40			10,84	
12670				2,70				
12673				3,52				
13259		0,97		0,93			3,05	
Median		1,00		2,55	1,54	0,99	5,94	
AIDS		2141	1,10	0,93	3,15	1,17	1,18	22,27
	2145	1,04	1,13	1,55	1,05	1,03	1,32	0,76
	2161	1,18	1,13	1,64	1,08		11,70	0,80
	2165	1,27	1,20	1,48	1,07		15,43	0,65
	2168	1,09		1,67			16,05	
	2175			4,05				
	2187			2,90				
	2188	0,99	1,07	1,67	0,93	1,08	2,70	0,92
	2208	1,11	1,06	2,18	0,95	1,06	4,26	0,86
	11612	2,92		2,51			2,46	
	12056	0,96	0,88	1,73	1,01		3,24	
	12532	1,05	0,94	3,73	0,95	1,27	22,21	1,46
	12534	1,88	1,37	3,16	1,55	0,89	4,40	
	12540			2,67				
	12541	1,03	0,89	2,13	0,99	1,15	8,91	0,86
	12544	1,07	0,94	2,31	1,04	1,04	7,22	
	13248	1,13	1,00	1,69	0,40	0,77	2,89	0,92
	13252	1,05	0,90	2,27	0,93	1,14	5,35	
	13256	1,09	1,00	1,98	1,07	1,13	2,43	0,73
	13261	1,20		2,87			6,71	
Median	1,09	1,00	2,22	1,02	1,08	5,35	0,84	
Neuro-AIDS	2194	1,08		2,30			33,02	
	8652			2,98				
	12539	1,11	1,28	2,40	0,89		26,00	
	13249	1,13	1,07	2,80	0,96	1,07	41,27	0,94
	13255	1,22	1,50	5,41	1,37	1,19	45,15	0,92
	13262	1,58	1,36	3,48	1,20	1,14	4,98	0,86
	8313	1,02	1,63	3,02	1,20		52,29	
	Median	1,12	1,36	2,98	1,20	1,14	37,15	0,92

Mittelwert Negativkontrolle plus doppelte Standardabweichung (cut off) = 1,00

Tab. 9: Zusammenfassung Makrophagen

	Tier	Gehirn Anteil CD16+ in %	Blut Anteil CD16+ in %
uninfiziert	2220	20,80	5,82
	2280	2,25	6,87
	7483	61,60	2,10
	7760	6,82	10,30
	9292	49,20	49,00
	11165	6,88	7,83
	11229	39,20	2,06
	11590	40,50	5,62
	Median	30,00	6,35
	asymptomatisch	2223	63,20
2231		61,60	-
10142		25,30	18,40
10943		53,50	15,40
10945		6,91	13,60
11231		-	3,24
11238		10,10	38,60
11241		22,60	12,50
12529		57,20	10,40
12670		5,33	-
12673		62,50	-
Median		39,40	13,05
AIDS		2141	31,00
	2145	9,59	1,89
	2161	43,40	13,90
	2165	76,70	14,90
	2168	14,00	16,50
	2175	72,30	24,40
	2187	17,60	2,86
	2188	45,30	14,30
	2208	40,90	7,73
	11612	26,40	10,10
	12056	9,29	13,20
	12532	50,40	2,64
	12534	76,50	0,96
	12540	25,00	10,40
	12541	47,00	11,50
	12544	15,90	22,10
	13248	29,50	4,70
	13252	21,20	18,40
	13256	70,30	47,30
	13261	16,60	3,92
Median	30,25	12,35	
Neuro-AIDS	2194	57,30	16,80
	12539	52,20	8,92
	13249	35,10	4,22
	13255	72,70	12,10
	13262	85,10	17,80
	8313	12,30	26,20
	Median	54,75	14,45

Tab. 10: Zusammenfassung B-Zellen

	Tier	Gehirn			Blut		
		Anteil CD21+ in %	Anteil CD23+ in %	Anteil CD80+ in %	Anteil CD21+ in %	Anteil CD23+ in %	Anteil CD80+ in %
uninfiziert	2220	34,40	9,82	59,80	13,30	9,80	85,40
	7483	26,40	-	41,30	40,90	-	47,40
	7760	65,50	16,20	24,60	59,50	33,00	20,60
	9292	43,30	12,50	51,70	6,77	3,40	88,90
	11165	30,40	14,20	64,20	23,80	18,50	78,20
	11229	48,10	3,10	21,70	31,10	15,10	39,00
	11590	-	-	-	51,30	41,90	41,90
	Median	38,85	12,50	46,50	31,10	16,80	47,40
AIDS	2141	5,13	2,56	10,30	5,49	3,72	91,70
	2165	23,50	7,41	56,80	6,30	1,50	52,90
	2187	-	-	66,20	-	-	61,20
	2188	9,38	1,06	78,90	0,82	0,61	99,10
	12056	69,40	25,80	11,30	75,00	63,40	20,90
	12532	6,60	-	84,00	14,80	-	87,80
	12534	41,60	-	23,00	54,40	-	37,20
	12541	8,82	0,00	73,50	7,62	6,82	91,00
	12544	54,20	11,90	23,70	58,10	53,70	37,20
	13248	39,60	37,60	45,50	27,20	22,70	70,70
	13252	31,60	5,26	17,10	99,50	76,90	0,31
	13256	47,10	40,20	20,60	60,80	52,10	35,30
	Median	31,60	7,41	34,60	27,20	22,70	57,05
	Neuro-AIDS	12539	46,70	2,59	64,40	86,30	57,60
13249		31,10	14,10	31,50	90,30	77,80	7,77
13255		56,50	38,70	16,00	65,70	56,20	17,50
13262		80,30	94,10	0,36	95,90	97,30	0,34
8313		90,20	54,00	8,65	97,20	37,50	2,64
Median		56,50	38,70	16,00	90,30	57,60	7,77

Tab. 11: Zusammenfassung NK-Zellen

	Tier	GEHIRN CD16+	NKG2a-	NKG2a+	CD16-	Anteil CD16+ an Lymphe	BLUT CD16+	NKG2a-	NKG2a+	CD16-	
uninfiziert	2220	95,40	82,00	13,40	4,58	48,25	84,10	21,20	62,90	16,00	
	7483	98,38	95,00	3,38	1,59	48,19	73,10	21,80	51,30	26,90	
	7760	93,60	81,60	12,00	6,40	45,61	65,30	16,40	48,90	34,70	
	9292	85,10	10,60	74,50	14,60	2,23	97,00	29,40	67,60	2,80	
	11165	91,90	47,00	44,90	8,16	10,49	92,10	11,20	80,90	7,88	
	11229	97,96	96,00	1,96	1,92	46,74	82,10	53,60	28,50	17,90	
	11590	90,60	38,60	52,00	9,35	16,56	80,83	2,43	78,40	19,20	
	Median	93,60	81,60	13,40	6,40	45,61	82,10	21,20	62,90	17,90	
	asymptomatisch	2223	97,85	90,20	7,65	2,14	16,22				
		2231	90,80	64,40	26,40	9,20	12,46				
10142		93,40	47,60	45,80	6,67	18,90	96,50	10,10	86,40	3,27	
10943		96,70	45,50	51,20	3,29	5,42	95,71	4,81	90,90	4,33	
10945		96,06	87,30	8,76	3,97	31,11	95,10	50,60	44,50	4,77	
11231		79,55	72,30	7,25	18,70	14,46	79,40	56,50	22,90	19,90	
11238		61,75	58,50	3,25	35,80	5,18	78,76	5,86	72,90	21,20	
11241		85,80	52,50	33,30	14,20	8,08	86,40	15,30	71,10	13,50	
12529		92,70	14,90	77,80	7,28	8,43	81,41	2,01	79,40	18,60	
12673		98,48		90,70	1,49	4,26					
13259		95,70	84,70	11,00	2,05	46,08	87,40	48,80	38,60	7,89	
Median		93,40	58,50	26,40	6,67	12,46	86,90	12,70	72,00	10,70	
AIDS		2141	20,77	16,80	3,97	78,80	1,64	71,70	23,80	47,90	28,00
		2145	89,92	86,90	3,02	9,92	20,65	71,40	53,60	17,80	28,60
	2161	92,30	76,70	15,60	7,45	32,32	61,20	17,00	44,20	35,90	
	2165	91,20	75,50	15,70	8,11	41,33	34,53	7,23	27,30	65,40	
	2168	95,40	85,30	10,10	3,66	52,03	89,62	1,72	87,90	9,09	
	2175	94,00	71,90	22,10	5,99	13,25					
	2188	73,30	63,10	10,20	26,10	11,81	69,40	26,80	42,60	30,60	
	2208	57,60	37,30	20,30	38,40	18,18	63,40	10,80	52,60	32,90	
	11612	78,64	9,04	69,60	21,40	0,78	78,32	4,32	74,00	21,50	
	12056	97,90	83,70	14,20	2,40	60,77	92,77	5,07	87,70	7,00	
	12532	79,30	60,60	18,70	20,70	14,03					
	12534	94,90	84,30	10,60	1,84	41,48					
	12540	86,70	17,30	69,40	13,30	1,92					
	12541	86,60	51,00	35,60	12,90	10,56	69,30	21,90	47,40	30,10	
	12544	91,00	45,40	45,60	9,02	8,87	86,90	21,80	65,10	13,00	
	13248	86,10	11,80	74,30	13,90	1,84	73,50	14,30	59,20	25,00	
	13252	93,67	87,30	6,37	3,79	60,73	83,50	4,10	79,40	16,50	
	13256	92,40	74,70	17,70	6,74	36,65	92,70	27,50	65,20	7,15	
	13261	78,20	31,70	46,50	20,90	2,95	84,60	28,10	56,50	15,10	
	Median	89,92	63,10	17,70	9,92	14,03	73,50	17,00	56,50	25,00	
Neuro-AIDS	2194	96,17	90,80	5,37	3,82	36,22	79,91	2,81	77,10	19,20	
	12539	31,23	7,53	23,70	67,20	0,59	73,11	3,81	69,30	26,20	
	13249	62,20	17,20	45,00	37,90	1,88	47,30	11,70	35,60	52,80	
	13255	95,30	26,90	68,40	4,74	5,51	97,17	4,57	92,60	2,81	
	13262	91,70	40,70	51,00	8,34	7,36	88,96	3,56	85,40	10,90	
	8313	91,70	71,60	20,10	8,00	6,74	80,30	24,20	56,10	17,30	
	Median	91,70	33,80	34,35	8,17	6,13	80,11	4,19	73,20	18,25	

Tab. 12: Zusammenfassung T-Zellen I

Tier	Gehirn		Blut		
	Anteil αβ+ in %	Anteil γδ+ in %	Anteil αβ+ in %	Anteil γδ+ in %	
uninfiziert	2220	65,60	34,40	93,20	6,41
	2280	-	-	97,80	2,31
	7483	82,30	6,84	86,30	7,62
	9292	82,90	14,90	97,00	2,74
	11165	90,50	9,53	97,50	2,60
	11229	92,60	7,36	92,50	7,55
	11590	87,60	12,00	92,80	7,36
Median		85,25	10,77	93,20	6,41
asymptomatisch	10142	80,40	18,70	96,90	3,13
	10943	91,10	8,63	95,00	5,01
	10945	83,30	16,70	96,40	3,58
	11238	50,60	49,50	95,90	4,21
	12529	74,20	25,80	97,50	2,61
	13259	59,70	39,40	88,70	10,20
Median		77,30	22,25	96,15	3,90
AIDS	2141	92,00	8,02	85,20	14,80
	2145	81,60	18,60	92,60	7,44
	2161	81,40	18,60	97,50	2,46
	2165	73,00	25,90	85,60	13,80
	2168	75,00	21,80	92,30	2,63
	2188	62,90	37,10	82,10	17,90
	2208	63,80	36,20	93,20	7,25
	11612	88,20	11,70	90,90	8,98
	12056	69,10	14,60	86,70	4,37
	12532	93,40	6,85	98,90	1,10
	12534	-	-	85,40	3,09
	12541	83,50	16,40	95,60	4,27
	12544	90,20	9,27	96,20	3,78
	13248	61,30	37,80	80,80	19,30
	13252	62,10	37,60	93,20	6,84
	13256	79,10	20,80	94,70	5,34
	13261	89,6	10,4	96,90	3,12
Median		80,25	18,6	92,6	5,34
Neuro-AIDS	2194	81,30	18,30	88,30	11,50
	12539	95,70	4,29	96,40	3,37
	13249	95,40	4,56	96,60	3,57
	13255	89,90	10,40	95,10	4,95
	13262	86,00	13,90	85,60	13,60
	8313	95,60	4,37	96,40	2,41
Median		92,65	7,48	95,75	4,26

Tier	Gehirn		Blut		
	Anteil CD4+ in %	Anteil CD8+ in %	Anteil CD4+ in %	Anteil CD8+ in %	
uninfiziert	2220	36,40	54,20	66,40	26,00
	2280	-	-	82,60	13,50
	7483	42,80	34,20	83,10	13,50
	7760	22,30	68,50	60,90	29,20
	9292	37,90	49,00	70,50	28,20
	11165	34,60	51,20	71,20	21,00
	11229	38,20	36,70	63,00	26,70
	11590	28,60	58,70	66,30	24,00
Median		36,40	51,20	68,45	25,00
asymptomatisch	2223	7,33	79,00	38,30	55,00
	2231	5,12	77,30	-	-
	10142	41,00	39,80	63,40	30,70
	10943	0,46	84,90	30,00	64,00
	10945	55,60	20,20	53,00	31,40
	11231	28,80	52,70	79,70	15,20
	11238	12,70	32,70	52,30	44,80
	11241	0,77	82,50	28,30	57,90
	11970	12,60	80,30	34,40	51,10
	12529	9,22	77,40	81,70	14,70
	12670	17,40	71,20	25,70	63,70
	12673	6,25	65,00	-	-
	13259	2,83	57,10	44,50	32,30
Median		9,22	71,20	44,50	44,80
AIDS	2141	1,36	92,70	43,00	49,40
	2145	6,37	80,80	44,80	42,90
	2161	11,70	78,80	36,10	62,40
	2165	2,53	80,80	26,60	73,00
	2168	6,49	69,20	33,60	59,50
	2175	3,63	93,40	33,00	56,70
	2187	1,19	97,20	52,00	41,50
	2188	3,20	87,00	44,70	45,50
	2208	12,90	83,60	40,00	59,80
	11612	2,08	79,00	19,20	71,50
	12056	0,93	91,60	24,40	71,70
	12532	2,40	84,30	50,20	38,90
	12534	-	-	29,40	61,70
	12540	7,40	75,30	54,80	36,80
	12541	3,78	88,20	25,80	67,60
	12544	2,05	92,20	24,20	69,00
	13248	1,13	84,20	48,20	39,80
	13252	18,30	74,30	50,10	48,70
	13256	3,31	83,90	36,60	58,10
	13261	3,51	85,40	26,10	66,90
Median		3,31	84,20	36,35	58,80
Neuro-AIDS	2194	0,47	87,10	44,80	49,00
	12539	8,69	77,30	16,50	73,30
	13249	3,82	81,10	42,90	49,20
	13255	2,58	76,10	64,10	27,40
	13262	2,12	91,90	31,30	58,00
	8313	16,60	82,20	22,10	76,20
Median		3,20	81,65	37,10	53,60

Tab. 13: Zusammenfassung CD4 positive T-Zellen - Gehirn

	Tier	Gehirn CD28	CD69	CD183	MHCII	CD28+/CD95+	CD28-/CD95+	CD28+/CD95-	CD49d+/CD95-	CD49d+/CD95+	CD49d-/CD95+	CD95+/CD28+/CD49d-
uninfiziert	2220	85,57	42,62	84,90	3,98	78,50	12,90	7,07	1,05	36,90	58,00	18,70
	7483		43,60									
	7760	71,90	27,52	33,20	1,80	45,40	26,90	26,50	3,36	35,30	36,60	8,82
	9292			25,80	1,05							
	11165	79,60	63,69	63,10	1,25	42,90	19,30	36,70	26,10	50,30	15,70	2,97
	11229	64,20	21,60	65,40	7,32	53,70	34,50	10,50	6,00	67,50	22,30	7,71
	11590											
MEDIAN		75,75	42,62	63,10	1,80	49,55	23,10	18,50	4,68	43,60	29,45	8,27
asymptomatisch	2223				5,21							
	10945				0,88							
	11231				7,91							
	11241				5,14							
	11970				18,69							
	12670											
	12673				15,63							
MEDIAN				6,56								
AIDS	2141	97,20	81,20	16,09	23,30	55,60	2,78	44,40	11,10	44,40	33,30	8,33
	2145	77,40	28,30	75,20	1,35	57,40	21,30	20,00	13,50	63,90	18,10	1,94
	2161	93,60	22,20	72,00		81,70	5,02	11,90	1,37	21,50	65,30	2,74
	2165		37,20	82,40								
	2187	91,90	34,60			45,60	3,90	46,30				
	2188		16,50	44,40	21,20							
	2208		25,00	80,43								
	12056			36,20								
	12532		13,00	70,10	3,23							
	12534		5,26									
	12540				27,55	1,56	19,50	47,70				
	12541	81,10	17,84	9,04	2,85	65,40	17,30	15,70				
	12544	96,50	12,71	43,70		40,40	1,75	56,10	28,10	1,75	1,75	0,00
	13248	84,00	21,20	61,80		26,00	16,00	58,00	32,00	16,00	4,00	0,00
	13252	69,90	42,13	12,00	1,35							
	13256	80,37	10,60		1,96	3,57	16,10	76,80	28,60	5,36	8,93	1,79
MEDIAN		84,00	21,70	53,10	3,04	45,60	16,00	46,30	20,80	18,75	13,52	1,87
Neuro-AIDS	12539	98,90	56,49		29,01	0,90	0,45	98,00	49,50	0,68	0,23	0,00
	13249	92,20	8,00	3,15	1,33	41,70	7,81	50,50	7,81	15,60	24,00	3,65
	13255		3,84		3,65							
	13262		2,96		3,36							
	8313	10,02	59,50	37,40	8,06	2,63	89,80	7,39	9,87	77,10	9,48	0,34
MEDIAN		92,20	8,00	20,28	3,65	2,63	7,81	50,50	9,87	15,60	9,48	0,34

Tab. 14: Zusammenfassung CD4 positive T-Zellen - Blut

	Tier	Blut CD28	CD69	CD183	MHCII	CD28+/CD95+	CD28-/CD95+	CD28+/CD95-	CD49d+/CD95-	CD49d+/CD95+	CD49d-/CD95+	CD95+/CD28+/CD49d-	
uninfiziert	2220	99,30	1,33	26,64	1,65	49,90	0,33	49,40	6,81	31,80	20,40	11,80	
	7483		1,57										
	7760	93,20	1,69	34,40	0,85	64,70	6,22	28,50	6,00	54,90	20,00	8,42	
	9292		2,87	30,34	1,41								
	11165	99,30			1,18	44,20	0,98	55,10	6,24	27,30	20,70	11,50	
	11229	90,60	1,10	27,41	3,19	63,30	9,22	27,30	10,60	46,20	21,70	15,10	
	11590		0,68	26,11	0,75	38,00	0,57	61,40	5,43	26,00	15,80	9,24	
MEDIAN		96,25	1,45	27,41	1,30	49,90	0,98	49,40	6,24	31,80	20,40	11,50	
asymptomatisch	2223				5,28								
	10945				0,88								
	11231				1,44								
	11241				2,37								
	11970				5,62								
	12670				4,93								
	12673												
MEDIAN				3,65									
AIDS	2141	99,80	1,17	46,08	4,59	52,80	0,62	47,00	3,27	44,00	29,60	7,43	
	2145	98,00	0,89	50,20	1,16	68,40	1,62	29,60	4,28	59,20	14,80	2,72	
	2161	99,90	0,53	68,70	0,56	49,60	0,08	50,70	16,70	34,20	2,96	0,00	
	2165		0,98		0,29								
	2187	96,60	2,47		1,93	82,10	0,60	14,50					
	2188		1,46	76,29	23,22								
	2208	99,90	0,50	17,12	0,40	19,50	0,12	80,40	6,05	10,70	7,86	4,46	
	12056		2,56	21,01	1,07								
	12532		0,27	8,27	0,20								
	12534		1,07										
	12540	97,08	1,56		0,12	7,58	2,13	89,50					
	12541	97,80	0,87	31,08	2,24	12,50	47,80	0,06					
	12544	99,90	19,92	2,09	19,90	0,26	80,00	4,56	11,40	5,25		1,16	
	13248	99,20	0,20	19,03	0,42	20,50	0,46	78,70	3,72	13,40	7,91	2,53	
	13252	96,50	1,26	7,06	0,55	3,50	3,08	93,00	1,88	5,87	22,70	1,85	
	13256	99,20	0,29		0,15	11,40	0,86	87,80	3,26	8,40	4,64	0,93	
MEDIAN		99,20	0,98	21,01	0,56	19,90	0,62	78,70	4,00	12,40	7,89	2,19	
Neuro-AIDS	12539	98,90	0,19	47,10	4,83								
	13249		0,19	9,79	0,50	15,90	1,19	83,00	2,20	11,70	4,70	1,14	
	13255	99,58	0,23		0,26	8,98	0,34	90,60	3,59	7,24	3,79	0,63	
	13262	99,27	0,55		0,19	5,97	0,49	93,30	2,25	3,76	7,07	0,98	
	8313	61,00	26,44	29,29	5,92	28,00	38,90	33,00	5,64	60,20	11,60	1,50	
	MEDIAN		99,09	0,39	29,29	0,50	12,44	0,84	86,80	2,92	9,47	5,89	1,06

Tab. 15: Zusammenfassung CD8 positive T-Zellen - Gehirn

	Tier	Gehirn CD28	CD69	CD183	MHCII	CD28+/CD95+	CD28-/CD95+	CD28+/CD95-	CD49d+/CD95-	CD49d+/CD95+	CD49d-/CD95+	CD95+/CD28+/CD49d-
uninfiziert	2220	23,97	69,70	70,80	5,95	15,70	76,00	8,27	1,61	41,30	55,60	15,30
	7483		60,38									
	7760	30,74	84,80	17,56	0,77	2,84	69,70	27,90	41,50	27,30	12,40	0,66
	9292			54,80	8,77							
	11165	60,10	93,04	74,21	4,12	39,90	40,20	20,20	21,20	51,20	18,30	0,25
	11229	35,70	60,44	56,42	13,58	18,80	64,70	16,90	20,50	44,70	27,80	2,82
MEDIAN		33,22	69,70	56,42	5,95	17,25	67,20	18,55	20,85	43,00	23,05	1,74
asymptotisch	2223				7,10							
	2231				17,56							
	10945				0,54							
	11231				7,28							
	11241				7,69							
	11970				27,90							
	12670				2,68							
	12673				5,48							
MEDIAN				7,19								
AIDS	2141	29,81	91,83	71,90	46,59	23,60	69,10	6,21	4,72	27,50	41,00	3,78
	2145	53,00	74,62	80,41	3,81	37,00	48,00	16,00	7,74	53,90	34,80	2,56
	2161	45,98	70,40	50,28		38,70	52,50	7,28	0,12	4,92	85,70	3,55
	2165		74,50	48,12								
	2187	87,10	73,20			16,60	10,60	70,50				
	2188		82,30	34,70	19,83							
	2208		82,90	67,65	1,13							
	12056	62,40	50,60	40,97	6,20	20,90	35,40	41,50				
	12532		72,60	58,10	14,51							
	12534		75,79									
	12540	98,33			9,47	1,23	0,27	97,10				
	12541	90,00	69,40	28,24	21,48	26,20	8,93	63,80				
	12544	90,00	67,80	20,50	1,89	16,40	7,80	73,60	33,80	0,64	2,07	0,00
	13248	32,80	74,20	45,78	2,15	17,50	66,30	15,30	55,90	14,30	5,61	0,00
	13252	81,40	69,13	50,36	4,21							
	13256	18,67	55,70		5,50	14,30	81,60	4,37	55,20	9,89	11,50	1,35
MEDIAN		62,40	73,20	49,20	5,85	19,20	41,70	28,75	20,77	12,10	23,15	1,96
Neuro-AIDS	12539	91,34	65,89		8,39							
	13249		62,91	4,80	4,03	2,44	6,25	88,90	26,60	0,31	0,30	0,00
	13255	8,79	57,20		4,23	2,86	90,00	5,93	50,80	10,50	6,09	1,07
	13262		66,40		4,81							
	8313	10,61	64,73	20,30	23,27	3,95	89,10	6,66	7,48	69,10	19,00	1,45
MEDIAN		10,61	64,73	12,55	4,81	2,86	89,10	6,66	26,60	10,50	6,09	1,07

Tab. 16: Zusammenfassung CD8 positive T-Zellen - Blut

	Tier	Blut CD28	CD69	CD183	MHCII	CD28+/CD95+	CD28-/CD95+	CD28+/CD95-	CD49d+/CD95-	CD49d+/CD95+	CD49d-/CD95+	CD95+/CD28+/CD49d-	
uninfiziert	2220	76,40	6,73	46,20	2,49	15,30	23,60	61,10	6,34	16,60	19,80	3,03	
	7483		7,48										
	7760	74,00	18,29	51,10	1,71	27,80	26,20	46,20	5,74	39,60	16,10	3,75	
	9292		12,57	58,40	12,74								
	11165	71,70			3,66	35,50	28,30	36,20	5,37	40,70	25,40	3,81	
	11229	91,00	6,71	5,29	5,71	30,40	7,99	60,60	50,50	25,80	13,80	4,85	
	11590		3,60	43,59	2,04	18,80	40,00	41,20	8,65	37,70	22,90	1,66	
	MEDIAN		75,20	7,11	46,20	3,08	27,80	26,20	46,20	6,34	37,70	19,80	3,75
asymptomatisch	2223				14,27								
	2231												
	10945				2,36								
	11231				5,58								
	11241				9,79								
	11970				26,10								
	12670				5,56								
	12673												
MEDIAN				7,69									
AIDS	2141	38,80	18,30	63,10	38,42	36,90	60,90	1,90	6,98	36,50	40,40	8,77	
	2145	58,40	11,37	50,20	9,22	40,40	41,90	18,00	7,43	61,30	23,30	1,90	
	2161	94,10	10,02	46,20		29,90	5,76	64,20	26,70	28,90	4,32	0,00	
	2165		17,53		0,49								
	2187	96,30	24,38		17,03	43,80	2,56	52,50					
	2188		21,26	71,20	20,94								
	2208	92,30	9,85	45,70	2,88	19,70	4,81	72,60	30,50	21,90	10,70	4,27	
	12056		15,93	49,20	6,46								
	12532		6,06	14,99	6,67								
	12534		35,88										
	12540	94,60	24,75		1,13	27,20	0,36	67,40					
	12541		17,20	59,80	17,68								
	12544	41,90		52,00	10,44	24,90	56,50	17,00	29,00	20,40	19,00	4,62	
	13248	60,80	10,15	64,90	3,07	33,20	39,00	27,60	13,00	39,70	22,80	1,66	
	13252	52,90	9,35	55,10	2,05	15,20	45,70	37,70	7,62	24,90	35,80	2,43	
	13256	53,10	22,78		5,87	24,30	47,30	28,80	29,10	20,20	18,20	3,44	
MEDIAN		59,60	17,20	52,00	6,57	28,55	40,45	33,25	19,85	26,90	20,90	2,94	
Neuro-AIDS	12539			58,00	10,38								
	13249	95,80	3,48	43,10	7,04	17,60	4,46	78,20	8,69	11,30	11,20	1,90	
	13255	53,32	11,70		2,76	9,22	45,50	44,10	25,70	7,89	8,43	0,69	
	13262	53,00	13,18		2,35	21,30	47,10	31,70	6,54	5,40	21,90	0,85	
	8313	32,10	46,37	27,90	11,01	18,20	67,30	13,90	2,48	47,60	40,40	3,64	
	MEDIAN		53,16	12,44	43,10	7,04	17,90	46,30	37,90	7,62	9,60	16,55	1,38

Tab. 17: Zusammenfassung PCR

Tier	Mikroglia APOBEC3G	MxA	Gehirn APOBEC3G	MxA	Viruslast Mikroglia	Gehirn	CSF	Mikroglia-Kulturüberstand
2220	-	-	0,01	0,83				
7483	0,81	6,65	0,00	0,36				
7541	-	-	0,00	0,93				
7760	0,36	5,73	-	-				
9292	0,47	3,10	0,00	0,57				
11165	0,80	1,24	0,01	0,32				
11229	0,59	1,75	0,00	0,30				
11590	0,81	4,17	0,00	0,63				
13254	0,42	7,75	-	-				
Median	0,59	4,17	0,00	0,57				
2223	1,06	12,81	0,01	1,50	276	0	9117	12313
2231	0,64	38,56	0,00	1,06	0	0	7157	1630
10142	1,21	6,21	0,00	0,73	54	0	-	-
10943	-	-	0,00	0,59	-	341	-	-
10945	0,65	4,39	0,00	0,45	0	553	5283	-
11231	0,37	0,81	0,00	1,35	0	0	0	119
11238	0,68	3,64	0,01	1,38	44	0	0	-
11241	1,28	23,57	0,00	1,63	67	0	0	-
11970	0,73	34,27	0,01	2,66	347	0	0	3093
12529	0,98	32,42	0,00	8,66	444	199	37167	-
12670	-	-	0,02	4,56	-	0	9697	-
12673	0,00	0,11	0,00	1,37	0	0	12938	9009
13259	1,01	37,50	0,00	1,43	1060	328	9726	-
Median	0,73	12,81	0,00	1,38	54	0	7157	3093
2141	0,27	11,27	0,00	1,47	0	0	0	-
2145	1,02	47,14	0,01	5,17	157	0	1581	5761
2161	1,67	93,30	0,01	8,42	1424	0	2965	-
2165	2,46	138,03	0,01	3,16	0	0	0	-
2168	1,20	50,52	0,00	1,30	1027	0	2125	-
2175	1,29	114,87	0,01	6,34	6420	0	9043	-
2187	0,75	11,66	0,00	1,99	0	0	0	-
2188	0,14	7,97	0,00	0,93	0	127	5746	-
2208	0,84	49,65	0,03	7,56	0	0	0	309
11612	2,27	36,22	0,00	9,25	139	0	17403	-
12056	1,72	117,69	0,00	4,26	162	349	-	-
12532	-	-	0,02	14,97	-	0	4331	-
12534	0,24	9,09	0,02	13,63	0	0	0	-
12540	0,61	50,52	0,01	9,28	1754	622	41126	-
12541	1,34	21,32	0,01	1,51	0	185	1119	-
12544	0,89	102,46	0,00	28,42	320	0	-	-
13248	0,79	14,71	0,00	2,78	116	0	-	-
13252	1,44	25,61	0,01	5,81	135	0	0	809
13256	1,02	45,53	0,02	4,80	74	0	35305	-
13261	3,07	58,85	0,01	13,26	6939	0	61483	-
Median	1,02	47,14	0,01	5,49	135	0	1853	809
2194	1,20	183,40	0,00	4,25	104	0	3222	14606
12539	0,80	32,42	0,02	9,71	34728	28454	14865406	-
13249	1,44	206,34	0,03	20,80	1495	0	64669	36040
13255	1,55	106,44	0,05	13,87	776100	776292	-	-
13262	2,05	100,35	0,01	15,23	353	483	9554	4610
1939	0,73	27,74	0,00	2,45	0	157	0	-
8313	1,22	40,33	0,01	14,87	0	0	0	-
8652	2,09	20,45	0,01	8,28	0	129	0	-
Median	1,33	70,34	0,01	11,79	229	143	3222	14606

Tanja Bischoff

geboren am 21.04.1980 in Guben

Staatsangehörigkeit: deutsch

seit 2005

Deutsches Primatenzentrum GmbH

- Abteilung Virologie und Immunologie, Arbeitsgruppe Neurovirologie (PD Dr. Sieghart Sopper)
- Externe Promotion (Universität Göttingen)

2003

Universität Bergen

- Erasmus Programm: 1 Semester
- 3 monatiges Praktikum am Molekularbiologischen Institut (Prof. Dr. Dag E. Helland)

1999 – 2004

Universität Göttingen

- Ausbildung zur Diplom-Biologin
- Studienschwerpunkte: Mikrobiologie und Immunologie/Virologie
- Diplomarbeit zum Thema:
„Massenspektrometrische Charakterisierung verschiedener Kernanreicherungsverfahren bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*“

1992 – 1999

Pestalozzi Gymnasium in Guben

- Abschluss: allgemeine Hochschulreife

1986 – 1992

Grundschule 4 in Guben

Göttingen, 15.09.2008

Tanja Bischoff