

**Der Medizinischen Fakultät der Georg-August Universität
eingereicht von PD Dr. rer. nat. S. Sopper**

Kinetik von natürlichen Killer-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen nach
Infektion von Rhesusaffen mit Immundefizienzviren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Ralph Griesbach
aus Wuppertal

Göttingen 2010

Diese Arbeit wurde von 2006-2010 in der Abteilung Virologie des Deutschen Primatenzentrum unter Leitung von Prof. Dr. med. G. Hunsmann erstellt.

Dekan: **Prof. Dr. med. C. Frömmel**

I Berichterstatter: **PD Dr. rer. nat. S. Sopper**

II Berichterstatter/in: **Prof. Dr. med. Dressel**

III Berichterstatter/in: **Prof. Dr. med. Legler**

Tag der mündlichen Prüfung: **12. August 2010**

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS ERWORBENE IMMUNDEFEKTSYNDROM (AIDS)	1
1.2	DAS HUMANE-IMMUNDEFIZIENZ-VIRUS (HIV)	2
1.3	INFEKTIONSVERLAUF	3
1.4	DAS AFFEN-IMMUNDEFIZIENZ-VIRUS (SIV)	3
1.4.1	Die Morphologie des SIV	4
1.4.2	Prävalenz von SIV	5
1.5	DAS SIV-RHESUSAFFEN-TIERMODELL	6
1.6	NATÜRLICHE KILLER-ZELLEN (NK-ZELLEN)	6
1.7	T-LYMPHOZYTEN	9
1.8	ZIELE DER ARBEIT	11
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	MATERIALIEN	13
2.1.1	Geräte	13
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3	Chemikalien	13
2.1.4	Medien, Puffer, Enzyme	14
2.1.5	Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper	14
2.1.6	Software	16
2.1.7	Versuchstiere, Viren	16
2.2	METHODEN	16
2.2.1	Durchflusszytometrische Analysen	16
2.2.2	Färbeschemata	17
2.2.3	Markierung von Antigenen auf der Zelloberfläche	17
2.2.4	Probenmessung im Durchflusszytometer und Datenverarbeitung	18
2.2.5	Datenauswertung und statistische Analyse	19
3	ERGEBNISSE	20
3.1	ZUSAMMENSETZUNG DER VERSUCHSREIHEN	20
3.2	VERLAUF DER SIV-INFREKTION UND ERKRANKUNG	20
3.3	ZEITPUNKTE DER PROBENGEWINNUNG	23
3.4	BESTIMMUNG DER VIRUSLAST NACH BELASTUNGSINFREKTION VON SIV MIT HILFE DER POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	23
3.5	DEFINITION DER LEUKOZYTENSUBPOPULATIONEN	26
3.6	KINETIK DER NK-ZELL-POPULATION	28
3.6.1	NK- Zellen vor der Infektion	28
3.6.2	NK-Zellen nach der Infektion	29
3.6.3	CD16- und CD159a-positive NK-Zellen nach der Infektion	33
3.6.4	Korrelation des NK-Zellanteils mit der Virusbelastung im Zeitverlauf	36
3.7	KINETIK DER $\gamma\delta$ -T-ZELLEN / VERSUCH 3	36
3.7.1	$\gamma\delta$ -T-Zellen vor der Infektion	36
3.7.2	$\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen nach der Infektion	37
3.7.3	CD8-, CD69- und CD159a-positive $\gamma\delta$ -T-Zellen	38

3.7.3.1	CD8-, CD69- und CD159a-positive $\gamma\delta$ -T-Zellen vor der Infektion	39
3.7.3.2	CD8-, CD69- und CD159a-positive $\gamma\delta$ -T-Zellen nach der Infektion	40
3.7.4	Kinetik der einfach- und doppelpositiven $\gamma\delta$ -T-Zellen	42
3.7.4.1	Korrelation des $\gamma\delta$ -T-Zellanteils mit der Virusbelastung im Zeitverlauf	45
4	DISKUSSION	47
5	ZUSAMMENFASSUNG	57
6	LITERATURVERZEICHNIS	58

Abbildungsverzeichnis

Abb.1. 1 Die weltweite Prävalenz von HIV	1
Abb.1. 2 Schematischer Aufbau von SIV (Norley, Robert Koch Institut).	5
Abb.1. 3 Aktivierungsmechanismen von NK-Zellen.	9
Abb.1. 4 Interaktion einer $\gamma\delta$ -TCR-positiven T-Zelle mit einer antigenpräsentierenden Zelle.	11
Abb.2. 1 Beispielhafte Darstellung der gemessenen Signale in einem Histogramm und in einem Streudiagramm.	18
Abb. 3. 1 Anzahl der viralen RNA-Kopien pro Milliliter Blutplasma im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion	25
Abb.3 2 Auswertungsschema der durchflusszytometrischen Messung.	27
Abb.3. 3 Präinfektionswerte für die NK-Zellen.	28
Abb.3. 4 Zeitverlauf des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten im Versuch 1 .	29
Abb.3. 5 Zeitverlauf des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten im Versuch 2.	30
Abb.3. 6 Zeitverlauf des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten im Versuch 3.	31
Abb.3. 7 Zeitverlauf des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten im Versuch 1/2/3.	32
Abb.3. 8 Zeitverlauf des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten, gruppiert nach dem Krankheitsverlauf.	33
Abb.3. 9 Kinetik der CD16/CD159a-doppeltpositiven, sowie CD16- und CD159a-einzelpositiven NK-Zellen in Versuch 1.	34
Abb.3. 10 Kinetik der CD16/CD159a-doppeltpositiven, sowie CD16- und CD159a-einzelpositiven NK-Zellen in Versuch 2.	35
Abb.3. 11 Kinetik der CD16/CD159a-doppeltpositiven, sowie CD16- und CD159a-einzelpositiven NK-Zellen in Versuch 3.	35
Abb.3. 12 Korrelation der Viruslast mit den prozentualen Anteilen der NK-Zellen (normalisiert auf Präwerte).	36
Abb.3. 13 Präinfektionswerte der $\gamma\delta$ -T-Zellen.	37
Abb.3. 14 Zeitverlauf der $\gamma\delta$ -T-Zellen.	38
Abb.3. 15 Auswertungsschema der durchflusszytometrischen Messung für die $\gamma\delta$ -TCR-positiven T-Zellen.	39
Abb.3. 16 Präinfektionswerte für die CD8-, CD69- und CD159a-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen	40
Abb.3. 17 Zeitverlauf der CD8-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dargestellt sind die Zeitverläufe der einzelnen Tiere.	40
Abb.3. 18 Zeitverlauf der CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen	41
Abb.3. 19 Zeitverlauf der CD159a-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen.	42
Abb.3. 20 Auswertungsschema der durchflusszytometrischen Messung für doppelpositive $\gamma\delta$ -T-Zellen.	43
Abb.3. 21 Schematische Darstellung der einfach und mehrfach Expression von CD8, CD69 und CD159a auf $\gamma\delta$ -T-Zellen.	44
Abb.3. 22 Zeitverlauf der CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen und der Subpopulationen	45
Abb.3. 23 Korrelation der Viruslast mit den normalisierten $\gamma\delta$ -T-Zellen.	46

Tabellenverzeichnis

Tab.2. 1 Übersicht verwendeter Fluoreszenzfarbstoffe, der zur Messung im Durchflusszytometer verwendeten Laser und Filter, sowie der Absorptions- und Emissionsmaxima.	15
Tab.2. 2 Übersicht verwendeter muriner anti-human AK, der Fluoreszenzfarbstoffe, an die sie gekoppelt sind, und Bezugsquellen.	15
Tab.2. 3 Übersicht verwendeter Kombinationen von Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten zur Charakterisierung von Leukozyten isoliert aus peripherem Blut.	17
Tab.3. 1 Liste der verwendeten Rhesusaffen.	22

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	engl.: acquired immunodeficiency syndrome
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cy7
bp	Basenpaare
BSA	engl.: bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	engl.: cluster of differentiation
c/ml	engl.: copies/ml
CTL	engl.: cytotoxic T-Lymphocyte
D	Dichte
dest.	destilliert
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid
ECD	Texas-Red PE
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
env	engl.: envelope, retrovirales Gen
et al.	lat.: et alii
etc.	lat.: et cetera
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	engl.: forward scatter
g	Gramm / Erdbeschleunigung
gp	Glykoprotein
γδ-T-Zelle	γδ -TCR-positive T-Zelle
HAD	HIV-assoziierte Demenz
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	engl.: human leukocyte antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
KGF	engl.: keratinocyte growth factor
KIR	engl.: killer cell immunnoglobulin-like receptors
lat.	lateinisch
LTNP	engl.: long-term non-progressor

M	molar
MHC	engl.: major histocompatibility complex
mg	Milligramm
min	Minuten
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mRNA	engl.: messenger RNA
NCR	engl.: natural cytotoxicity rezeptor
Nef	engl.: negative factor, virales Protein
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PcP	Pneumocystis-carinii-Pneumonie
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PE	Phycoerithrin
PE-Cy7	Phycoerithrin-Cy7
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
pH	lat.: potentia Hydrogenii
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
RNA	engl.: ribonucleic acid
RP	engl.: rapid progressor
RT	engl.: reverse transkriptase
SSC	engl.: side scatter
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
SIVmac	engl.: simian immunodeficiency virus of macaques
Tab.	Tabelle
Tat	engl.: transactivator of transcription, virales Protein
TCR	engl.: T-cell receptor
Th1	T-Helferzelle 1
Th2	T-Helferzelle 2
TNFα	engl.: tumor necrosis factor α
TLR	engl.: toll-like-receptor
U	engl.: units (aktive Einheit eines Enzyms)
UN	engl.: United Nations
USA	engl.: United States of America
Vif	engl.: virion infectivity factor, virales Protein
VLA-4	engl.: very late antigen-4
Vpr	engl.: viral protein R, virales Protein
WHO	eng.: World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Das erworbene Immundefektsyndrom (AIDS)

Im Jahr 1981 gab es in den USA erste Berichte über schwere Immunschwächen bei homosexuellen Männern (Gottlieb MS et al., 1981; Masur et al., 1981; Siegal et al., 1981). Auch Patienten, die Bluttransfusionen erhielten, waren von diesem Krankheitsbild betroffen. Bei diesen Personen wurden gehäuft Krankheiten wie zum Beispiel Kaposi-Sarkome und Pneumonien mit *Pneumocystis carinii* (PcP) diagnostiziert. Die späte Phase der Erkrankung war zusätzlich durch eine Gewichtsabnahme gekennzeichnet und wurde als erworbenes Immundefekt-Syndrom bezeichnet (AIDS). In den vergangenen 20 Jahren breitete sich die Erkrankung weltweit aus.

Nach Berichten der Vereinten Nationen (UN) waren 2006 weltweit rund 39.000.000 Menschen mit dem Humanen-Immundefizienz-Virus, HIV, dem Erreger der Erkrankung infiziert. Im Jahre 2006 gab es rund 4.300.000 Neuinfektionen, 2.900.000 Menschen verstarben an den Folgen von AIDS. Seit Ausbruch der Epidemie wurde der Tod von rund 25.000.000 Menschen mit AIDS in Verbindung gebracht (UNAIDS/WHO, 2006).

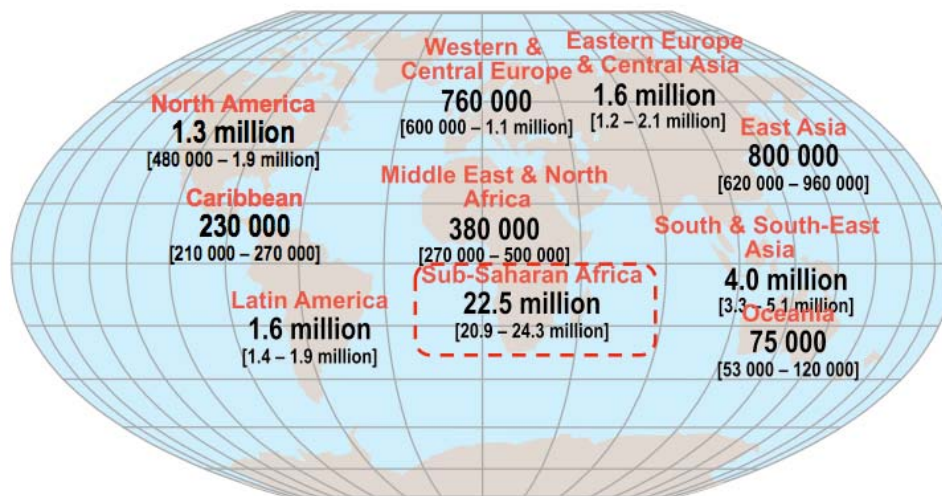


Abb.1. 1 Die weltweite Prävalenz von HIV

Im Jahr 2006 waren etwa 39.000.000 Menschen mit HIV infiziert (UNAIDS/WHO, 2006).

1.2 Das Humane-Immundefizienz-Virus (HIV)

HIV gehört zu einer Gruppe von komplexen Retroviren, die zur Gattung der *Lentiviridae* zusammengefasst werden (Murphy, 1990). Die unterschiedlichen Isolate dieses Virus werden als HIV-1 bezeichnet. Ein weiteres HIV wurde im Jahr 1986 isoliert. Die Sequenz dieses Virus unterschied sich deutlich von der von HIV-1. Daher wird es als HIV-2 bezeichnet (Clavel et al., 1986). Die beiden Virustypen differenzieren sich in ihrer geographischen Prävalenz. Infektionen mit HIV-2 sind überwiegend in westafrikanischen Ländern anzutreffen (Smith et al., 2008), HIV-1 kommt hingegen weltweit vor (Levrero et al., 1990). Auch in ihrer Virulenz bestehen Unterschiede. Nach HIV-2-Infektionen tritt die Erkrankung später auf als bei HIV-1-Infektionen (Marlink et al., 1994).

Trotz Immundefizienz ist das Fortschreiten der HIV-Erkrankung paradoxerweise durch eine zunehmende Immunaktivierung gekennzeichnet (Shearer, 1998). Die Aktivierung bestimmter Immunzellen ist zwar zur effektiven Bekämpfung pathogener Erreger essenziell, erlaubt jedoch dem HIV eine bessere Vermehrung (Tsoukas and Bernard, 1994).

Als Bestandteil des unspezifischen Immunsystems spielen natürliche Killer-Zellen in den ersten Tagen nach HIV-Infektion eine entscheidende Rolle bei der Abtötung Virus-infizierter Zellen und der Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch Sekretion von Zytokinen, wie Interferon γ (Meier et al., 2005).

Die symptomatische Phase der HIV-Infektion wird ausgelöst durch schwere Defekte der adaptiven, zellvermittelten Immunantwort, wie eine allgemeine Dysregulation und chronische Überaktivierung des Immunsystems (Kuwata et al., 2009). Dadurch werden immunologische Zellen, wie zum Beispiel CD4- und CD8-positive T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und natürliche Killer-Zellen geschädigt (Kosub et al., 2008). Es treten vermehrt Karzinome auf, wie der Gebärmutterhalskrebs der Frau oder das Kaposi-Sarkom, aber auch Lymphome wie das Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphom. Charakteristisch für das Krankheitsbild ist zudem die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit opportunistischen Erregern (Atemwege, Verdauungstrakt). Die Infektion des ZNS führt von motorischen und kognitiven Ausfällen bis hin zur HIV-assoziierten Demenz (HAD) (Ghafouri et al., 2006; Kaul et al., 2001).

Das adaptive Immunsystem bekämpft Virusinfektionen (Meier et al., 2005) mit B- sowie T-Zell-vermittelten Antworten, die auch bei der Kontrolle von HIV eine wichtige Rolle spielen (Johnson and Desrosiers, 2002). Nach einer HIV-Infektion kommt es zu

charakteristischen Veränderungen in der Zusammensetzung des T-Zell-Kompartiments im Blut (Clark et al., 1999). Die Konzentration CD4-positiver Zellen sinkt stetig (Crowe et al., 1991), die der CD8-positiven nimmt bis kurz vor Ausbruch von AIDS zu (Imami and Gotch, 2002), aber im Endstadium der Erkrankung ab (Margolick and Donnenberg, 1997). Die Aktivität von $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor (TCR)-positiven T-Zellen kann AIDS verzögern (Milush et al., 2007). Ihre genaue Funktion hierbei ist bisher nicht bekannt. Durch eine HIV-Infektion wird die Funktion der $\gamma\delta$ -TCR-positiven T-Zellen beeinträchtigt (Kosub et al., 2008/b). So ist die Elimination von HIV-infizierten Zellen durch $\gamma\delta$ -T-Zellen deutlich eingeschränkt (Kosub et al., 2008/a).

1.3 Infektionsverlauf

Drei bis sechs Wochen nach HIV-Infektion, der so genannten akuten Phase, klagen Patienten häufig über grippeähnliche Symptome, welche die HIV-Infektion verschleiern können. Zu diesem Zeitpunkt ist die Virusreplikationsrate im Blut der Betroffenen signifikant erhöht. Im weiteren Verlauf fällt sie auf relativ konstante Werte ab. Dieser Wendepunkt wird als „viraler Setpoint“ bezeichnet. Von der Höhe der Viruslast zu diesem Zeitpunkt, hängt nicht nur die Infektivität des Infizierten, sondern auch die Dauer seines Überlebens ab (Mellors et al., 1997). Der virale Setpoint korreliert auch zum Verlust der CD4-positiven Lymphozyten, die in der akuten Phase der HIV-Infektion vermindert sind. Neben dem Defizit an CD4-positiven T-Zellen ist auch die HIV-spezifische T-Zellfunktion eingeschränkt (Altfeld et al., 2001; Rosenberg et al., 1997). In der anschließenden Latenzphase der HIV-Infektion vermindert sich die Zahl der CD4-positiven T-Lymphozyten langsamer. Die Rekrutierung HIV-spezifischer CD8-positiver T-Zellen reduziert die Viruslast. In der Endphase mit ausgeprägtem AIDS steigt die Viruslast als Folge der weiteren Verminderung CD4-positiver Lymphozyten erneut an.

1.4 Das Affen-Immundefizienz-Virus (SIV)

Das Affen-Immundefizienzvirus (Simian-Immundefizienz-Virus, SIV) gehört wie HIV-1 und HIV-2 zur Familie der Retroviren. Die wichtigste biologische Besonderheit von Retroviren ist das Replikationsenzym Reverse Transkriptase (RT) (Temin and

Mizutani, 1970). Die Reverse Transkriptase ermöglicht das Umschreiben des RNA-Virusgenoms in DNA, so dass diese in das Wirtsgenom integriert werden kann. SIV ist wie HIV aufgrund seiner Genomstruktur und Morphologie ein Lentivirus (Daniel et al., 1985; Gelderblom, 1991; Letvin et al., 1985). Lentiviren unterscheiden sich durch bestimmte Eigenschaften von anderen Viren (Joag et al., 1997); es sind komplexe Retroviren, die die Regulation ihrer eigenen Gene steuern. Darüber hinaus sind sie genetisch außerordentlich variabel (Haase, 1986). Der langsame Krankheitsverlauf dieser Virusklasse hat ihnen ihren Namen gegeben (lat. *lentus* = langsam). SIV und HIV-2 sind sich in ihrem genomischen Aufbau sehr ähnlich, gegenüber HIV-1 bestehen größere Unterschiede.

1.4.1 Die Morphologie des SIV

SIV hat einen Durchmesser von etwa 100nm. Die äußere Hülle des Partikels ist eine Lipid-Doppelmembran, in die sowohl zelluläre wie auch virale Proteine eingelagert sind (Gelderblom et al., 1987). Sie enthält 72 virale Glycoproteinkomplexe. Diese Komplexe bestehen aus zwei Proteinen, dem externen gp120 und dem membranständigen gp41. Beide sind kovalent verbunden und lagern sich zu Trimeren zusammen. Das Protein gp120 bindet an den CD4-Rezeptor, vorrangig exprimiert auf T-Zell-Subpopulationen. An der inneren Lipidschicht der Virusmembran ist gp17 (Matrixprotein) verankert. Dieses Protein ist für die Diagnostik von großer Bedeutung.

Während der Knospung des Virus aus der virusproduzierenden Zelle gelangen zusätzlich Proteine der Wirtszelle, wie MHC I und II, β -2-Mikroglobulin, Aktin und Ubiquitin auf die Virushülle (Gelderblom et al., 1987). Die Hülle des Virusinnenkörpers, das Kapsid, besteht aus p24-Proteinen. Der Nachweis dieser Proteine, wie auch der Matrixproteine, wird diagnostisch genutzt.

Das SIV-Genom besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen.

Im Kapsid befinden sich drei wichtige Enzyme für die Virusvermehrung; die Reverse Transkriptase, die RNaseH und die Integrase. Das Partikel enthält zusätzlich die virale Protease, die für die Reifung des Viruspartikels wichtig ist.

Neben den Strukturproteinen werden zusätzlich regulatorische und akzessorische Proteine, wie Tat, Nef, Vpr und Vif in das Viruspartikel eingebaut (Cohen et al., 1990; Liu et al., 1995).

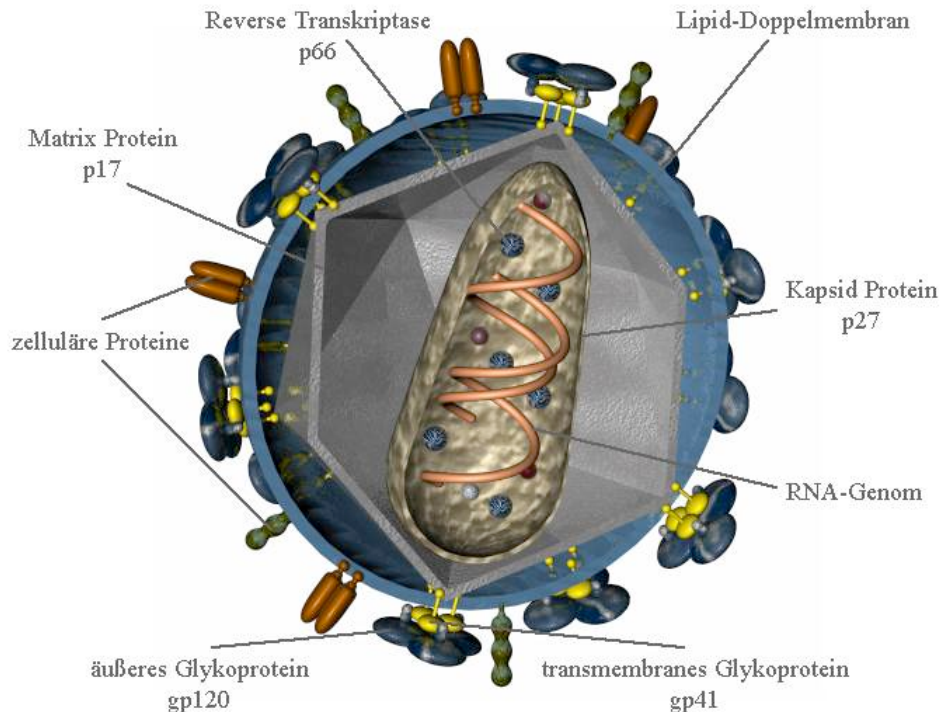


Abb.1. 2 Schematischer Aufbau von SIV (Norley, Robert Koch Institut).

Das Viruspartikel ist von einer Doppellipidschicht umgeben, auf der sich die Proteinkomplexe gp41 und gp120 befinden. Der Kern des Virus wird aus einer Aneinanderreihung von p24- und p27 Proteinen gebildet. Im Kern enthalten sind verschiedene Strukturproteine, sowie das diploide RNA-Genom. An diesem sind durch molekulare Wechselwirkungen verschiedene Enzyme angelagert. Das Enzym Protease ist im gesamten Virus zu finden (Gelderblom, 1991).

1.4.2 Prävalenz von SIV

Bis heute konnte in rund 40 afrikanischen Primatenspezies eine Infektion mit SIV-Lentiviren nachgewiesen werden (VandeWoude and Apetrei, 2006). Bei den natürlichen SIV-Wirten wurde trotz hoher Viruslasten im peripheren Blut keine Krankheitssymptomatik beobachtet (Hahn et al., 2000; Santiago et al., 2002). Obgleich 50% der afrikanischen Grünen Meerkatzen (*Chlorocebus sabaeus*) mit SIV infiziert sind, sind diese Tiere asymptotische Träger dieser Lentiviren (Muller et al., 1993). Afrikanische Affen scheinen durch eine permanente Koexistenz einen Weg gefunden zu haben, mit dem Virus zu leben. Man geht davon aus, dass sich

während einer langen Zeit der Koevolution ein für beide Seiten apathogener Krankheitsverlauf entwickelt hat (Muller and Barre-Sinoussi, 2003).

Eine AIDS-ähnliche Symptomatik konnte in Affen beobachtet werden, die nicht natürlich mit SIV infiziert waren (Ling et al., 2004). In Primatenzentren gehaltene Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), eine asiatische Affenart aus der Gruppe der Meerkatzenverwandten, zeigten erstmals ein pathogenes AIDS-ähnliches Krankheitsbild (Wertheim and Worobey, 2009). Wahrscheinlich steckten sich die Tiere durch Bissverletzungen bei afrikanischen Affen an, die ebenfalls in Gefangenschaft lebten.

Erste Tierversuche zur Erforschung von AIDS wurden mit Rhesusaffen durchgeführt. Das zur Infektion verwendete SIV-Isolat wurde als SIV_{mac} (engl. *simian immunodeficiency virus of macaques*) bezeichnet (Coffin et al., 1986). Diese Tiere zeigten nach Infektion mit dem SIV AIDS-Symptome. Sie entwickelten Neoplasien, schwere opportunistische Infektionen, einen Verlust der CD4-positiven T-Zellen und eine hohe Virusbeladung im Blut (Ling et al., 2004). Die Tiere erkrankten nach einer Immundefizienz-Virus-Infektion schneller als Menschen. In einem Zeitraum von zwei Monaten bis zu zwei Jahre entwickelten sie AIDS (Letvin and King, 1990).

1.5 Das SIV-Rhesusaffen-Tiermodell

Die Infektion von Rhesusaffen mit SIV entspricht der HIV-Infektion des Menschen. Es ist das aussagekräftigste Tiermodell für AIDS. Die Viren sind nah miteinander verwandt, ebenso wie Mensch und Rhesusaffe (Burudi and Fox, 2001; Persidsky et al., 1995). Die Modell-Infektion eignet sich sehr gut, um die Immunantwort zu untersuchen (Choi et al., 2008). Die verkürzte Latenzzeit, die Möglichkeit Viren unterschiedlichen Pathogenitätspotentials zu verwenden, die Wahl der Virusdosis, des Infektionswegs und von Versuchstieren unterschiedlicher Empfänglichkeit, aber auch die Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen menschliche Lymphozytenantigene sind die großen Vorteile dieses Modells.

1.6 Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen)

NK-Zellen sind Bestandteil des frühen zellulären Immunsystems und spielen in den ersten Tagen nach einer Virusinfektion, bevor die spezifische Immunantwort aktiviert wird, eine wichtige Rolle (Biron and Brossay, 2001; Biron et al., 1999). Es sind vom

Knochenmark stammende, große, granuläre Lymphozyten (Cooper et al., 2001). Sie produzieren Zytokine, die zytotoxisch für Virus-befallene und mutierte Zellen sind (Trinchieri, 1989). Eine vorherige Antigenerkennung ist für ihre Aktivierung nicht erforderlich (Biron et al., 1999). NK-Zellen wurden einst als Lymphozyten identifiziert, die in der Lage waren, leukämische Zellen ohne vorherige Aktivierung abzutöten (Kiessling et al., 1975/a; Kiessling et al., 1975/b). Der Anteil dieser Zellen an den Lymphozyten im peripheren Blut macht etwa 5-20% aus (Andoniou et al., 2006).

NK-Zellen werden durch eine Balance von aktivierenden und inhibierenden Signalen gesteuert (Lanier, 2003). Es können drei verschiedene hemmende Rezeptoren für die Inaktivierung von NK-Zellen unterschieden werden. *Killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIRs), sind für die klassische MHC-I-Erkennung verantwortlich (Long, 1999). C-type-lectin-Rezeptoren wie CD159A (NKG2A), -B, -C, -E und -F, interagieren mit CD94 und binden an *non-classical* HLA-E. Ein weiterer Rezeptor ist der *natural cytotoxicity receptor* (NCR) (Lakshmikanth et al., 2009). NCRs können Tumor-Zellen erkennen und abtöten (Lakshmikanth et al., 2009). Der NCR ist sowohl auf ruhenden als auch auf aktivierten NK-Zellen nachweisbar (Pereira et al., 2008).

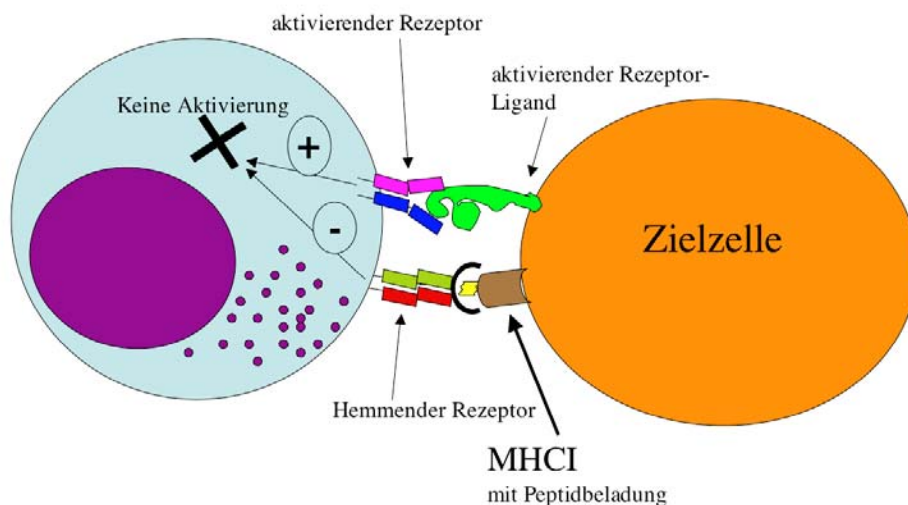
MHC-Moleküle sind für die Regulation von NK-Zellen besonders wichtig. MHC I exprimierende Tumor- oder Virus-infizierte Zellen werden von CD8-positiven T-Zellen (CTL) direkt abgetötet (Pereira et al., 2008). Virusinfektionen können zu einer Herabregulation von MHC I auf der Zelloberfläche führen, um den CTL zu entgehen (Andoniou et al., 2006). Die verminderte Dichte der MHC I Moleküle auf der Zelloberfläche führt zu einer NK-Zell-Aktivierung. Sie werden zudem besonders leicht aktiviert, wenn ein geeigneter Ligand für einen aktivierenden Rezeptor zur Verfügung steht. Dies sind Liganden, die auf Zellstress oder Virus-Infektion exprimiert werden und mit dem aktivierenden Rezeptor NKG2D interagieren (Gonzalez et al., 2008). Bindung von NKG2D an MHC-I-ähnliche Liganden löst Effektormechanismen von NK-Zellen aus, wie Zytotoxizität und Zytokinsekretion, die CD8-positive T-Zellen stimulieren (Bauer et al., 1999; Cosman et al., 2001; Groh et al., 2001). Auch Stress-induzierte Proteine können NK-Zellen aktivieren. NK-Zellen sind für Virus-infizierte Zellen zytotoxisch, da sie durch Exozytose Enzyme der Familie der Serin-Proteasen sezernieren, hierzu zählen die Perforine und Granzyme. Durch Bildung von Wasserkanälen in der Doppellipidschicht der Zielzellen führen Perforine zur Zerstörung der Zellmembran. Granzyme, insbesondere des Typ A, führen zur Caspase-unabhängigen Apoptose. Granzyme vom Typ B aktivieren sowohl die

Caspase-abhängige als auch Caspase-unabhängige Apoptose (Andoniou et al., 2006). NK Zellen sind außerdem eine reiche Quelle von Interferon (IFN) γ und β -Chemokinen mit antiviralen Eigenschaften, z.B. gegen HIV (Fehniger et al., 1998). NK-Zellen wurden anfänglich als reine Killerzellen wahrgenommen, später erst wurde ihr Einfluss auf die erworbene Immunantwort bekannt (Weber et al., 2000). Bei dieser Aktivierung scheinen hemmende oder aktivierende Zytokine oder Chemokine eine Hauptrolle einzunehmen (Raulet, 2004). Sie können zum Beispiel die Hämatopoese beeinflussen (Raulet, 2004), die einen direkten Einfluss auf die Entwicklung von Zellen des adaptiven Immunsystems ausübt.

NK-Zellen spielen zudem bei der Immunantwort gegen HIV und SIV eine wichtige Rolle (Alter and Altfield, 2009). Das Nef-Protein in Virus-infizierten Zellen führt zu einer beschleunigten Endozytose bzw. Retention von MHC I im Golgi Apparat. Die verringerte Dichte von MHC I auf der Zelloberfläche (Schwartz et al., 1996), als Bindungspartner des spezifischen inhibitorischen KIR (Moretta, et al., 2002/a; Moretta, et al., 2002/b), erleichtert eine Aktivierung der NK-Zelle (Andoniou et al., 2006).

HIV-1-infizierte Zellen können die Funktion von NK-Zellen einschränken (Mavilio et al., 2005; Quaranta et al., 2007).

A)



B)

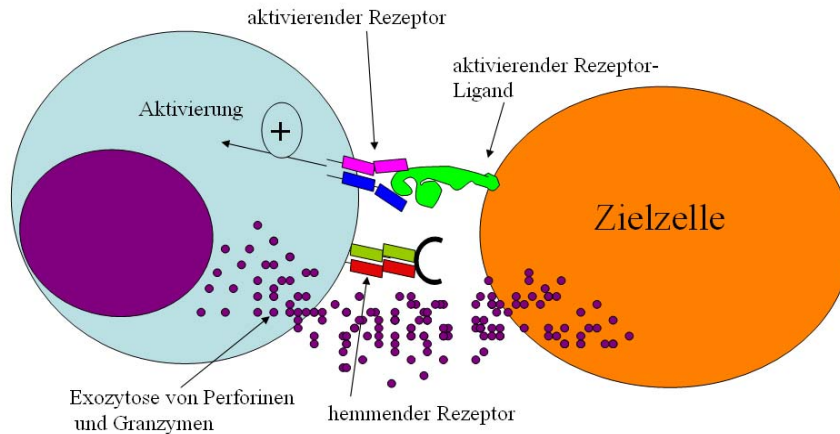


Abb.1. 3 Aktivierungsmechanismen von NK-Zellen.

A) Sowohl an den hemmenden als auch an den aktivierenden Rezeptoren kommt es zu einer Bindung an MHC I oder an einen anderen Liganden. Die Aktivität der hemmenden und aktivierenden Rezeptoren steht im Gleichgewicht. Es resultiert keine Aktivierung der NK-Zelle.

B) Am hemmenden Rezeptor steht kein MHC I zur Verfügung. Der aktivierende Rezeptor bindet an einen Liganden. Das Gleichgewicht verschiebt sich zugunsten einer NK-Zellaktivierung. Es folgt die Exozytose von Zytokinen und Granzymen.

1.7 T-Lymphozyten

T-Zellen sind CD3-positiv, stammen aus dem Knochenmark und reifen im Thymus. Dort werden die Gene für den T-Zellrezeptor (TCR) so angeordnet, dass für jeden Zellklon ein individueller Antigenrezeptor entsteht. Offensichtlich produziert der Thymus eine Reihe von hormon-ähnlichen Peptiden, die die T-Zell-Reifung kontrollieren (Ho et al., 1983). T-Lymphozyten unterscheiden sich in ihrem individuellen TCR (Whetsell et al., 1991). Diesen werden von Antigen präsentierenden Zellen (APCs) MHC-gebundene Antigene präsentiert. Der TCR besteht entweder aus den durch Disulfidbrücken verbundenen α - und β -Ketten oder γ - und δ -Ketten. Diese Ketten sind Glycoproteine der Immunglobulin-Familie (Thomassen et al., 2006). $\alpha\beta$ -T-Zellen machen etwa 95% der T-Zellen im peripheren Blut aus. 2/3 davon sind CD4-positive T-Helferzellen, 1/3 CD8-positive zytotoxische T-Zellen (Forslund et al., 1985). CD4 positive T-Helfer-Zellen, die Antigene präsentieren bzw. Antikörper produzieren, aktivieren Makrophagen und B-Zellen

mittels Zytokinen. Im Gegensatz dazu werden Zellen, die mit Viren oder Bakterien infiziert sind, direkt durch CD8-positive zytotoxische T-Zellen eliminiert. Diese werden zuvor von professionell Antigen präsentierenden Zellen aktiviert (Kroger et al., 2008). Zytotoxische T-Zellen eliminieren HIV-infizierte Zellen in der akuten und chronischen Infektionsphase (Goulder and Watkins, 2004).

$\gamma\delta$ -Zellen machen etwa 2 - 15 % der zirkulierenden T-Zellen im Blut aus (Borst et al., 1987), im Schleimhaut-assoziierten lymphoiden Gewebe sind es etwa 50% (Carding and Egan, 2002; Kosub et al., 2008/a), dort sind sie an der Virusabwehr beteiligt (Kosub et al., 2008/a). $\gamma\delta$ -T-Zellen können sowohl CD4- als auch CD8-negativ sein (Taupin et al., 1999). Sie erkennen eine Vielfalt von Antigenen, z.B. Hitzeschockproteine, Phospholipide und MHC I-Moleküle (Brandes et al., 2009). Die MHC-Präsentation ist aber nicht zwingend erforderlich (Janis et al., 1989).

$\gamma\delta$ -T-Zellen können Oberflächenrezeptoren von NK-Zellen exprimieren. Dazu gehört der Homodimer CD94 und die mit ihm komplexierten Mitglieder der NKG2-Familie (Becker et al., 2000; Uhrberg et al., 1997). $\gamma\delta$ -T-Zellen werden für die Abwehr verschiedener Infektionskrankheiten gebraucht. Ihre Funktion war lange unklar (Hayday, 2000). Sie scheinen zudem an Autoimmunerkrankungen, Entzündungen (Girardi et al., 2002; Jahng et al., 2001) und Heilungsprozessen beteiligt zu sein. Die Gewebsheilung wird von $\gamma\delta$ -T-Zellen sezernierten *keratinocyte growth factors* (KGFs) unterstützt (Chen et al., 2002; Jameson et al., 2002). $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-T Zellen sind zudem daran beteiligt, maligne oder Virus-infizierte Zellen aufzulösen (Jameson et al., 2003). Zudem können $\gamma\delta$ -T-Zellen mit Zytokinen Th1-Zellen und Th2-Zellen des erworbenen Immunsystems aktivieren. Sie scheinen in einer Kooperation zwischen angeborener und erworbener Immunität zu vermitteln (Shen and Kaplan, 2002), so dass eine effiziente Immunantwort möglich ist (Martini L et al., 2000).

Sie sind somit Bestandteil des angeborenen als auch erworbenen Immunsystem (Legrand et al., 2009). Im Verlauf einer HIV-Infektion verändert sich die Anzahl der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut (Haas et al., 1993). Nach einer HIV-Infektion werden $\gamma\delta$ -T-Zellen aktiviert und akkumulieren am Ort der Virusreplikation (Sciammas and Bluestone, 1999). Ihr Anteil und die absolute Zahl im peripheren Blut sind erhöht (Kozbor et al., 1993). Möglicherweise können $\gamma\delta$ -T-Zellen bei den natürlichen SIV Wirten (z.B. Rußmangaben) die Entstehung von AIDS unterdrücken (Milush et al., 2007). Ihre Funktionsweise ist jedoch im Zuge der chronischen HIV/SIV-Infektion zunehmend beeinträchtigt, so dass die Proliferation als Antwort auf opportunistische pathogene

Mycobakterien erniedrigt ist (Poccia et al., 1996). In vitro Stimulationen zeigten, dass auch weniger IFN γ produziert wird (Martini F et al., 2002; Martini L et al., 2000).

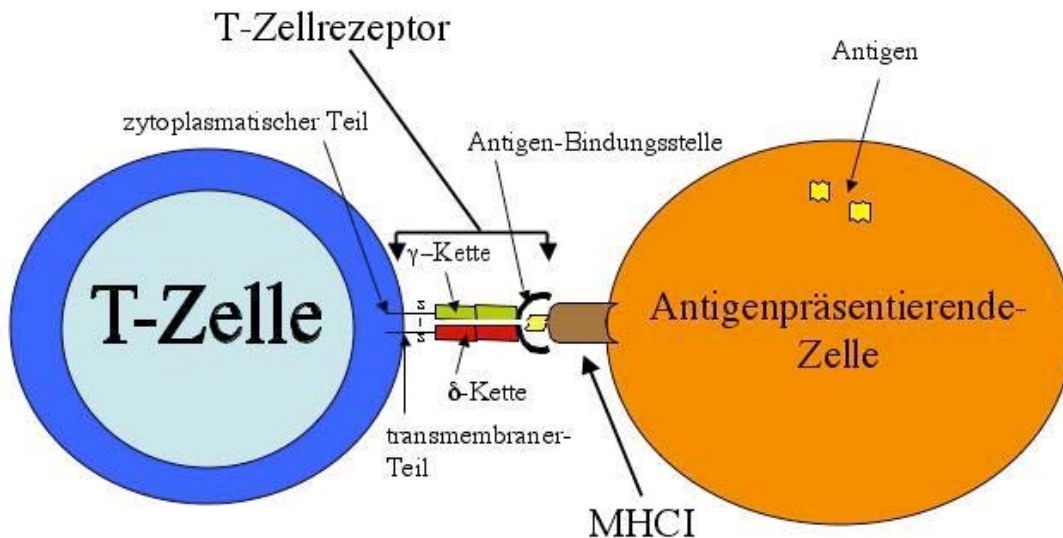


Abb.1. 4 Interaktion einer $\gamma\delta$ -TCR-positiven T-Zelle mit einer Antigen präsentierenden Zelle.

Die Zelle verwendet ihren $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor, um Kontakt mit dem MHC-I-Komplex der Antigen-präsentierenden-Zelle aufzunehmen. Die T-Zelle wird auf diesem Wege aktiviert.

1.8 Ziele der Arbeit

Die Pathogenese der HIV-Erkrankung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass die Reaktion des Immunsystems in der frühen Phase der Infektion mit Immundefizienzviren einen wichtigen Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf hat. Es sind unter anderem die Viruslast und die CD4-T-Zellzahlen zu Beginn der chronischen Phase entscheidend.

Das Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkungen der Infektion im SIV-Rhesusaffentiermodell in der frühen Phase zu erfassen. Dabei nehmen die Lymphozyten-Subpopulationen der NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen eine Schlüsselrolle ein. NK-Zellen als Komponenten des angeborenen unspezifischen Immunsystems können ohne vorherige Aktivierung Virus-infizierte Zellen abtöten und somit direkt in den Krankheitsverlauf eingreifen. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen sind ebenfalls an der Elimination von Virus-infizierten Zellen in der frühen Infektionsphase beteiligt. Weiterhin spielen beide Populationen auch bei der Aktivierung des spezifischen Immunsystems eine wichtige Rolle. Von Interesse sind die Veränderungen in den Populationen der NK

Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen, sowie deren Auswirkungen auf den weiteren Krankheitsverlauf. Dafür soll in mehreren Versuchen durch Anwendung der polychromatischen Durchflusszytometrie die Charakterisierung verschiedener Leukozytenpopulationen von Rhesusaffen nach einer SIV-Infektion im Zeitverlauf erfasst werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Durchflusszytometer BD LSRII	BD Biosciences
Kühl-/Gefrierkombination	Liebherr
Laminarbank	HeraSafe Heraeus
Pipetten	Eppendorf AG
Pipettierhilfe (pipetus-akku)	Hirschmann
Inversmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Vortex	Laborbedarf Schütt
Zählkammer (Neubauer)	Roth
Zentrifuge Multifuge 3SR	Heraeus

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

BD-Falcon-5-ml-Rundboden-Röhrchen	BD Biosciences
BD Vacutainer EDTA oder Zitrat	BD Biosciences
Kompensationsbeads	Spherotech
Leucosep-Röhrchen	BD Biosciences
Reaktionsgefäße 0,5 und 1,5ml	Greiner
Röhrchen 15ml (Cellstar)	Greiner
Serologische Pipetten 5ml, 10ml und 25ml	Sarstedt

2.1.3 Chemikalien

Bovines Serumalbumin (BSA)	Pasching
Formaldehyd 37%	Roth
KH_2PO_4	Merck
Natriumazid	Sigma
NaCl	Roth

Na ₂ HPO ₄	Merck
Trypanblau	Aldrich

2.1.4 Medien, Puffer, Enzyme

FACS-Flow, FACS-Rinse, FACS-Safe	BD Biosciences
Ficoll (Lymphocyte Separation Medium)	PAA
Lyse-Puffer	BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences), 1:10 verdünnt in H ₂ O dest.
FACS Puffer	PBS supplementiert mit 0,5% Bovinem Serumalbumin (BSA) und 0,03% Natriumazid
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 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 (CD) 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]	Langpass-filter ¹ [nm]	Bandpass-filter ² [nm]	Absorptions-maximum [nm]	Emissions-maximum [nm]
Alexa 405	405		440/40	401	421
Alexa 700	635	685	725/50	696	720
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 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 AK, der Fluoreszenzfarbstoffe, an die sie gekoppelt sind, und Bezugsquellen.

mAK-Spezifität	Ig- (Sub) Klasse	Klon	Fluorochrom	Quelle
CD3	IgG1 I	SP34-2	Alexa 700	1
CD4	IgG1 I	SK3	Alexa 405	1
CD8	IgG2a	3B5	PO	3
CD11a	IgG1 I	HI 111	APC	1
CD11b	IgG1 I	ICRF44	Pacific Blue	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	4
CD69	IgG2b I	TP1.55.3	ECD	2
gd	IgG1	5A6.E9	FITC	3
NKG2a	IgG2b I	Z199	PE	2

1 BD Biosciences Pharmingen

2 Beckman Coulter

3 Caltag

4 IQProducts

2.1.6 Software

Für die Datenanalyse, Bearbeitung und Darstellung wurden folgende Programme genutzt:

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 5	Graph Pad Software
Microsoft Office	Microsoft Corporation

2.1.7 Versuchstiere, Viren

Die Untersuchungen wurden an adulten Affen der Art *Macaca mulatta* durchgeführt. Die Rhesusaffen indischer Subspezies stammen aus der Zucht des Deutschen Primatenzentrums, aber auch von anderen Züchtern. Alle Tiere wurden am Deutschen Primatenzentrum gehalten und von Tierärzten und Tierpflegern der Abteilung Virologie und Immunologie gemäß den Richtlinien des Deutschen Primatenzentrums und des Deutschen Tierschutzgesetzes (in der aktuellen Fassung 25. Mai 1998) betreut.

Für die Infektion der Tiere wurden die SIV Isolate SIV_{mac}239 (Kestler et al., 1990) und SIV_{mac}251 (Le Grand et al., 1992) verwendet. Alle klinischen Parameter wurden von Tierärzten des Deutschen Primatenzentrums erhoben.

2.2 Methoden

2.2.1 Durchflusszytometrische Analysen

Die polychromatische Durchflusszytometrie (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, Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (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).

2.2.2 Färbeschemata

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

2.2.3 Markierung von Antigenen auf der Zelloberfläche

Die in den Färbeschemata (siehe 2.3) festgelegten Kombinationen von Antikörpern wurden für die einzelnen Färbungen in 5-ml-Rundboden-Röhrchen pipettiert. Nach Zugabe von 50µl Vollblut pro Röhrchen wurde der Ansatz durchmischt. Danach wurde 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Um mögliche Störfaktoren während der Durchflusszytometrie zu eliminieren, wurden die Erythrozyten lysiert. Dazu wurde 1ml FACS Lyse-Puffer (hypotone Ammonium-Chlorid Lösung) dazugegeben. Nach kurzem durchmischen und Inkubation 10 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde mit PBS gewaschen und anschließend bei 310g für 5min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden dann durch Zugabe von 3 ml 3,5%igem Formaldehyd und anschließende Inkubation für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur fixiert. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt bei 310g für 5 min und die Zellen wurden in 100µl FACS-PBS aufgenommen. In diesem Zustand konnten die Zellen bis zur Messung bei 4°C und in Dunkelheit gelagert werden.

Tab.2. 3 Übersicht verwendeter Kombinationen von Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten zur Charakterisierung von Leukozyten isoliert aus peripherem Blut.

Versuch	Fluorochrom									
	FITC	PE	ECD	Per-Cy5.5	Pe-Cy7 [#]	APC	Alexa 700	APC-Cy7	Alexa 405 / Pacific Blue	AmCyan / Pacific Orange
1	CD21	NKG2a	-	CD14	CD20	CD11a	CD3	CD16	CD4	CD8
2	CD21	NKG2a	-	CD14	CD20	CD11a	CD3	CD16	CD4	CD8
3	TCR g/d	NKG2a	CD69	CD14	CD20	CD11a	CD3	CD16	CD11b	CD8

[#] Fluorochrom ist mit Streptavidin konjugiert

* anti CD95 Antikörper ist biotinyliert

2.2.4 Probenmessung im Durchflusszytometer und Datenverarbeitung

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

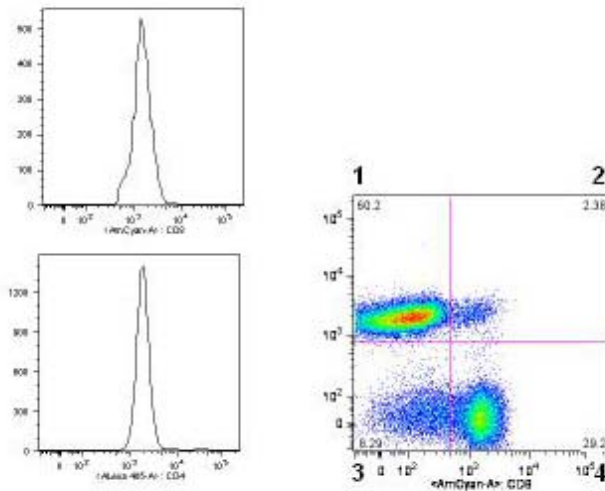


Abb.2. 1 Beispielhafte Darstellung der gemessenen Signale in einem Histogramm und in einem Streudiagramm.

Die Messdaten konnten im Histogramm, Auftragung Anzahl gemessener Ereignisse gegen Signalintensität, oder im Streudiagramm, durch paarweise Auftragung von Signalintensitäten eines Ereignisses, dargestellt werden. In Abbildung 2.1 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.

2.2.5 Datenauswertung und statistische Analyse

Die Darstellung, Auswertung und statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm Graph Pad-Prism. Für die graphische Darstellung der Messdaten wurden die Postinfektionswerte in Bezug zu den Präinfektionswerten dargestellt. Zur Abbildung der Mittelwerte wurde das geometrische Mittel mit Standardabweichung verwendet. Die beiden erhobenen Präwerte dienten somit als Nullwert und entsprachen in der Darstellung dem Normalzustand und somit 100%. Für den Vergleich zwischen zwei Zeitpunkten wurde der nicht parametrische gepaarte Wilcoxon-Test gewählt, zweiseitig mit einem Konfidenzintervall von 95%. Für die Korrelationsanalysen wurde die nicht parametrische Spearman-Korrelation mit einer zweiseitigen Analyse und einem Konfidenzintervall von 95% durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden in beiden Tests Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner als 0,05 angesehen.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes von Rhesusaffen nach SIV-Infektion als Modell für die HIV-Infektion des Menschen untersucht. Von besonderem Interesse waren dabei die Auswirkungen der SIV-Infektion auf die Populationen der NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen.

3.1 Zusammensetzung der Versuchsreihen

Für drei unabhängige Versuche standen insgesamt 20 Rhesusaffen zur Verfügung. In Tabelle 3.1 sind die verwendeten Tiere zusammengefasst. Versuch 1 enthielt sechs männliche, Versuch 2 sieben männliche, ein weibliches und Versuch 3 sechs männliche Tiere. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Infektion zwischen drei und fünf Jahren alt.

3.2 Verlauf der SIV-Infektion und Erkrankung

In Versuch 1 wurden sechs Tiere untersucht, von denen zwei auch drei Jahre nach Infektion keine AIDS-Symptome zeigten. Diese Tiere galten damit als *long term non progressors* (LTNPs). Beide waren positiv für das MamuA*01-Gen, einen im Bezug auf die HIV-Infektion genetisch vorteilhafte Variante des MHC. Die vier verbleibenden Tiere entwickelten AIDS und wurden bei Krankheitsausbruch euthanasiert und sezirt. Es fanden sich opportunistische Infektionen und maligne neoplastische Entartungen. Zwei Tiere zeigten einen schnellen Krankheitsverlauf (*RPs*) und wurden innerhalb der ersten sechs Monate nach Infektion sezirt. Die beiden anderen nach zwei Jahren.

Versuch 2 bestand aus acht Tieren. Ein Tier zeigte auch drei Jahre nach Infektion keine Anzeichen einer AIDS-Erkrankung. Die verbliebenen sieben Tiere wurden innerhalb von drei Jahren nach Infektion sezirt. *Drei* Tiere entwickelten AIDS und wurden infolgedessen euthanasiert. Das Tier 2191 (Mamu A*01-positiv) erkrankte jedoch erst nach drei Jahren und wurde damit wie das noch lebende Tier, als LTNP klassifiziert. Die zwei anderen Tiere zeigten einen schnellen Krankheitsverlauf (*RPs*). Vier Tiere die sezirt wurden, zeigten Krankheitssymptome wie pathologische Veränderungen der Haut, des Respirations- und Darmtrakts, sowie eine deutliche

Aktivierung des lymphatischen Systems. Die beschriebenen Symptome konnten aber nicht in Zusammenhang mit AIDS gebracht werden.

In Versuch 3 waren drei der sechs Tiere zwei Jahre nach Infektion ohne AIDS-Symptomatik. Zwei von ihnen waren positiv für vorteilhafte MHC-Varianten. Die drei verbleibenden Tiere erkrankten innerhalb dieses Zeitraums an AIDS. Neben den charakteristischen Veränderungen der lymphatischen Organe fanden sich bei ihnen Infektionen des Respirations- und Darmtraktes.

Von den insgesamt 20 untersuchten Tieren aller drei Versuche, zeigten sechs auch nach über zwei Jahren Infektionsdauer keine Symptome einer AIDS-Erkrankung (LTNPs). Von den 14 euthanasierten Tieren waren vier asymptomatisch und zehn an AIDS erkrankt, wobei vier Tiere einen schnellen Krankheitsverlauf (RPs) zeigten und ein Tier den LTNPs zugeordnet wurde.

Tab. 3.1 Liste der verwendeten Rhesusaffen.

Versuch 1:									
Tier	Geburtsdatum	Geschlecht	Infektion SIV Klon	Dauer	Sektion Datum	Status	Krankheitsmerkmale lymphatische System	Hauptbefunde	Genom-Besonderheiten
2139	19.03.2001	m	239	über 3j					Mamu A01
2155	15.05.2001	m	239	über 3j					Mamu A01
2165	12.05.2001	w	239	1j11m	28.06.2007	AIDS	Involution	Respirationstrakt (hochgradige P.c. Pneumonie), Digestionstrakt (Mikrobakteriose)	
2171	21.06.2001	m	239	6m	08.03.2006	AIDS		keine Hauptbefunde	
2175	29.06.2001	m	239	3m	20.12.2005	AIDS	Hyperplasie ++	Digestionstrakt (ausgedehnte subakute Gastroenteritis, Zellsynizien SIV positiv, Parasitose), Nieren (Glomerulonephritis)	
2194	06.03.2002	m	239	2j1m	25.10.2007	AIDS	Hyperplasie +++	Niere (beginnend maligne Lymphome), Muskulatur (hochgradige pyogranulomatöse Myositis)	
Versuch 2:									
Tier	Geburtsdatum	Geschlecht	Infektion SIV Klon	Dauer	Sektion Datum	Status	Krankheitsmerkmale lymphatische System	Hauptbefunde	Genom-Besonderheiten
2191	25.02.2002	w	239	3j	13.08.2008	AIDS	Hyperplasie ++	Darmtrakt (Enteritis und Enterocolitis mit NematodenTrichuris sp.), Hautveränderungen (Ödem)	Mamu A01
2223	20.06.2002	m	239	1j1m	07.09.2006	asymptomatisch	Hyperplasie +++	Respirationstrakt (hochgradige eitrig nekrotisierende Bronchitis und Peribronchitis)	
2231	24.09.2002	m	239	1j1m	26.07.2006	asymptomatisch	Hyperplasie +++	Respirationstrakt (mittelgradige interstitielle Pneumonie)	
12529	05.03.2001	m	239	1j11m	04.07.2007	asymptomatisch	Hyperplasie +	Darmtrakt (chronisch aktive Gastritis)	
12540	04.06.2001	m	239	4m	04.01.2006	AIDS	Depletion	Darmtrakt (chronische Enteritis)	
12670	07.06.2000	m	239	6m	15.02.2006	AIDS	Hyperplasie +++	keine Hauptbefunde	
12672	25.05.2000	m	239	über 3j					Mamu A01
12673	16.04.2001	m	239	1j1m	06.07.2006	asymptomatisch	Hyperplasie ++	ulzerative Dermatitis	
Versuch 3:									
Tier	Geburtsdatum	Geschlecht	Infektion SIV Klon	Dauer	Sektion Datum	Status	Krankheitsmerkmale lymphatische System	Hauptbefunde	Genom-Besonderheiten
2192	19.03.2002	m	251	1j9m	09.07.2008	AIDS	Involution und Depletion	Digestionstrakt (hochgradige chronisch-aktive Enteritis), Oberschenkelmuskulatur (eitrig-nekrotisierende Myositis)	
2233	20.03.2003	m	251	über 2j					
12538	18.05.2001	m	251	über 2j					Mamu A01
13257	02.02.2003	m	251	über 2j					MamuE17
13260	08.03.2003	m	251	2j	09.10.2008	AIDS	Hyperplasie ++	Digestionstrakt (mittelgradige Enteritis (bakteriell)), Leber (Gallengangfibrose und -hyperplasie)	
13262	13.03.2003	m	251	9m	10.07.2007	AIDS	Involution	Respirationstrakt (hochgradige P.c. Pneumonie), Digestionstrakt (Mischparasitose)	

+ geringgradig
 ++ mittelgradig
 +++ hochgradig

3.3 Zeitpunkte der Probengewinnung

In den drei Versuchen sollten die zeitlichen Veränderungen der NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen (Versuch 3) nach SIV-Infektion untersucht werden. Blutproben wurden zweimalig vor Infektion und bis Woche vier bzw. sechs im zwei Wochen Intervall, danach alle vier Wochen entnommen. Um die frühe Phase der Infektion genauer zu untersuchen, wurden in Versuch 2 und 3 innerhalb der ersten 14 Tage zusätzliche Proben entnommen.

3.4 Bestimmung der Viruslast nach Belastungsinfektion von SIV mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ein wichtiger Parameter zur Erfassung des Krankheitsverlaufs nach Virusinfektion stellt der Nachweis der Konzentration von Viruspartikeln im peripheren Blut dar.

Die Viruslast wurde quantitativ als Anzahl viraler Kopien im Blutplasma der Versuchstiere durch die Arbeitsgruppe Immungenetik von Frau Dr. Sauermann am Deutschen Primatenzentrum erfasst.

Zwei Wochen nach Infektion wurde ein Anstieg der Viruslast in den drei Versuchen registriert. Zu dieser Messung wurde der Spitzenwert (viraler Peak) erreicht. Bereits in Woche vier und acht nach Infektion erniedrigte sich die Viruslast (viraler Setpoint) im Blut der Affen, zur darauf folgenden Messung erhöhte sich die Anzahl viraler Kopien erneut und verblieb im weiteren Beobachtungsbereich auf diesem Plateau bestehen.

Im Vergleich zeigt Versuch 1 mit SIV_{mac239} und tonsillärer Infektion im Mittel den höchsten Spitzenwert ($1,6 \times 10^7$ c/ml) der Versuchsreihen, gefolgt von Versuch 3 ($5,7 \times 10^6$ c/ml) und Versuch 2 ($3,7 \times 10^6$ c/ml). Der Abfall nach Erreichen des Spitzenwertes fiel im 3 Versuch am geringsten aus. Das von den Werten im Anschluss gebildete Plateau lag in Versuch 3 und 1 mit etwa 2×10^6 c/ml höher als im Versuch 2 mit ca. 2×10^5 c/ml. Die individuelle Varianz der Tiere war in Versuch 3 am geringsten.

Der Vergleich der Virusbeladung im Blutplasma der einzelnen Tiere ergab, dass es bei einigen Tieren die Träger des MamuA*01-MHC-Allels waren (2139, 2155, 2191), es zu einer deutlich schnelleren und stärkeren Reduktion der Virusbeladung im Blutplasma kam. Ebenso war die Spitzenvirämie in diesen Tieren erheblich geringer. In den Versuchen 1 und 2 wiesen die LTNPs die geringsten Virusbeladungen auf.

Bei Tier 12529, ohne genetisch vorteilhaften Hintergrund und asymptomatischen Krankheitsverlauf, konnte nur eine sehr geringe Viruslast von maximal 225 c/ml in Woche *zwei* erfasst werden.

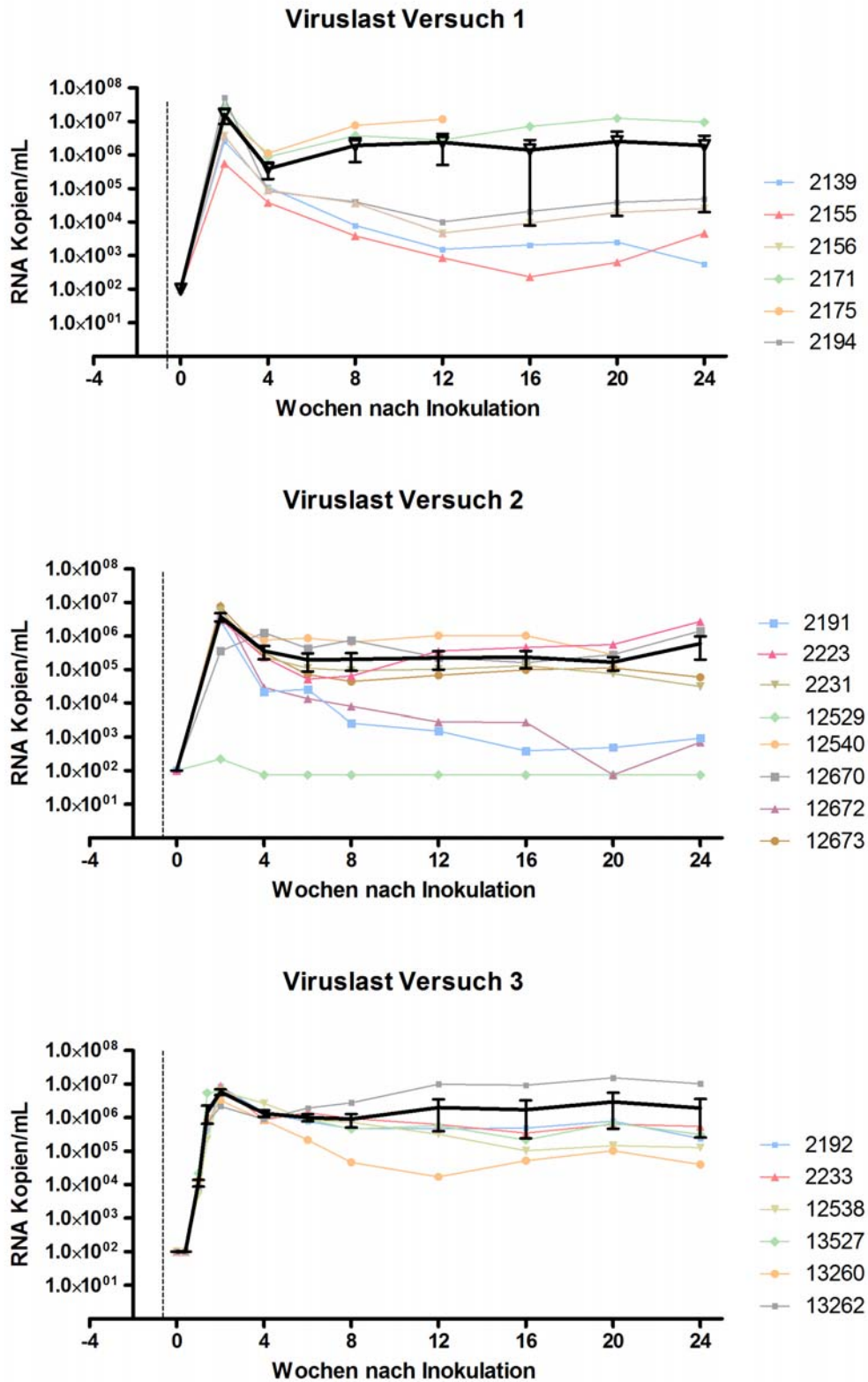


Abb. 3. 1 Anzahl der viralen RNA-Kopien pro Milliliter Blutplasma im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion. Die einzelnen Tiere sind jeweils farbig dargestellt. Der gemeinsame Mittelwert der Tiere mit der Standardabweichung ist schwarz.

3.5 Definition der Leukozytensubpopulationen

Die peripheren Blut-Leukozyten wurden durchflusszytometrisch analysiert. Für jede Zelle wurde die Expression von bis zu zehn Oberflächenantigenen mit unterschiedlichen Fluoreszenz markierten monoklonalen Antikörpern, sowie Größe und Granularität untersucht. Jede Probe wurde nach gleichem Protokoll analysiert und ausgewertet, wie in Abbildung 3.2 exemplarisch für Tier 2192 (Versuch 3) zum Präinfektionszeitpunkt dargestellt.

Die Leukozyten wurden als CD11a-positiv (Leukozyten Funktions-assoziiertes Antigen1, LFA-1) definiert. Diese Integrin-Untereinheit tragen alle Leukozyten. Zusätzlich wurde CD20, ein Marker für B-Zellen zur Definition der Leukozyten gemessen, da ein Teil der B-Zellen CD11a nur sehr schwach exprimiert. Anhand der Granularität und CD14-Expression wurden Makrophagen und Lymphozyten definiert und von den Granulozyten unterschieden. Bei den Lymphozyten wurden B-Zellen als CD20-positiv, T-Zellen als CD3-positiv und NK-Zellen als CD16-positiv bzw. CD159a (NKG2a)-positiv definiert. Weiterhin wurden die NK Zellen über die Expression der Oberflächenmarker CD16 und CD159a unterteilt. In Versuch 3 wurden zusätzlich TCR- $\gamma\delta$ -positive und negative T-Zellen unterschieden.

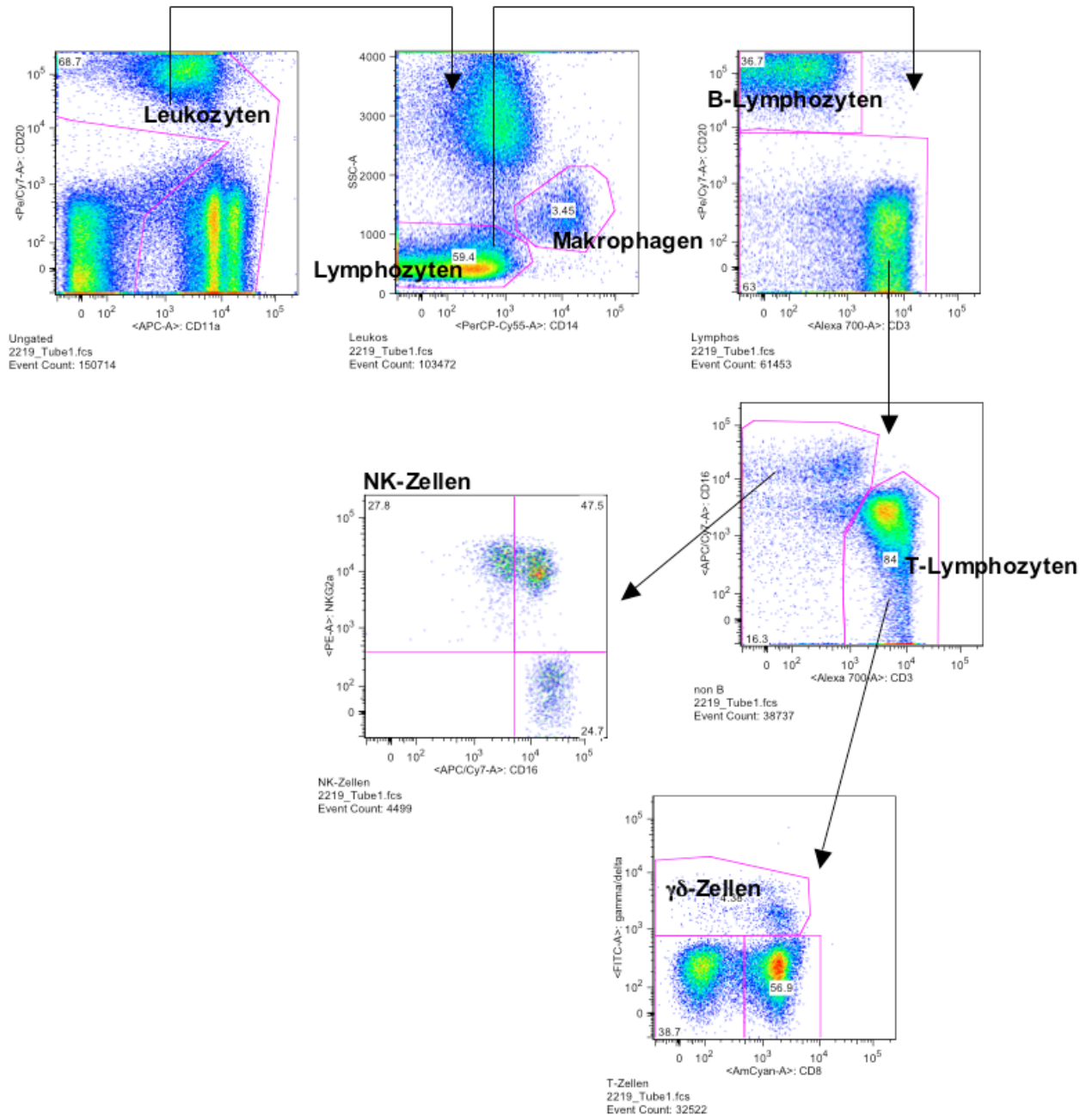


Abb.3 2 Auswertungsschema der durchflusszytometrischen Messung. Mit der Definition der mononukleären Leukozyten beginnend, zeigen die Pfeile die Auswertungswege zur Einteilung der Lymphozyten, Makrophagen, sowie in die Lymphozytensubpopulationen B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen.

3.6 Kinetik der NK-Zell-Population

3.6.1 NK- Zellen vor der Infektion

Die Erhebung von Präinfektionswerten ermöglichte eine Definition des Normalzustandes. Durch die Darstellung der Postinfektionswerte in Relation zu den Präinfektionswerten konnten Veränderungen nach Infektion anschaulich verdeutlicht werden. Die Veränderungen der NK-Zell-Population nach Infektion wurden bei jedem Tier auf dessen Präinfektionswert bezogen.

In allen drei Versuchen wurden jeweils zwei Vorinfektionswerte erhoben.

Bei den Tieren des Versuchs 1 waren sieben Tage vor Inokulation im Mittel 5,4% der Lymphozyten NK-Zellen. Am Tag der Inokulation 8,1%. Statistisch unterschieden sich die Werte dieser beiden Entnahmen signifikant (Wilcoxon Test, $p = 0,03$). An diesen beiden Messtagen waren zwischen 1,7% und 11,6% der Lymphozyten NK-Zellen. Im Versuch 2 waren 7 Tage vor Infektion im Mittel 11,2% der Lymphozyten NK-Zellen, am Tag der Inokulation 7,3%. Die Werte unterschieden sich signifikant (Wilcoxon Test, $p = 0,03$). Die Messungen wiesen eine hohe Spannweite auf. Minimal waren 4,3%, maximal 23% der Lymphozyten NK-Zellen. Im Versuch 3 waren 15 Tage vor Infektion in den Proben 10,3% der Lymphozyten NK-Zellen, drei Tage vor Infektion 8,5%. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Der Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten lag zwischen 3,2% und 17,5%. Die drei Versuche unterschieden sich untereinander nicht signifikant.

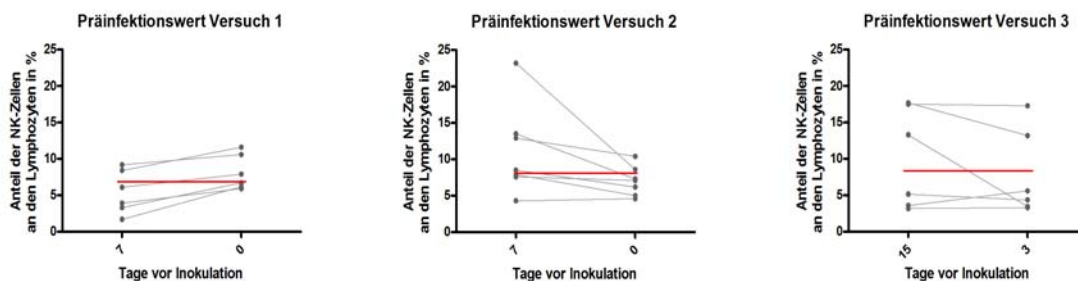


Abb.3. 3 Präinfektionswerte für die NK-Zellen. Dargestellt sind zwei Messzeitpunkte vor Infektion der Tiere. Diese sind jeweils für ein Tier mit einer grauen Linie verbunden. In rot ist der Mittelwert aller Messungen eingetragen.

3.6.2 NK-Zellen nach der Infektion

Vier der sechs Tiere des Versuchs 1 zeigten bereits zwei Wochen nach Infektion einen deutlichen Anstieg der NK-Zellen. Zu diesem Zeitpunkt war die Konzentration von NK-Zellen im Mittel doppelt so hoch wie vor der Infektion, aber nicht signifikant verändert (Wilcoxon Test, $p = 0,06$). Im Einzelnen waren die Werte im Verlauf jedoch hoch variabel. Bei den Tieren 2171 und 2175, mit einem schnellen Krankheitsverlauf (RPs) wurde der Höchstwert der NK-Zellen erst vier Wochen nach Infektion erreicht. In Woche vier war mit durchschnittlich 175% der Anstieg der NK-Zellen signifikant erhöht (Wilcoxon Test, $p < 0,03$), ebenso in Woche acht. Im weiteren Infektionsverlauf nahm der NK-Zell-Anteil an den Lymphozyten stetig ab. Er lag in Woche 12 nach Infektion nur noch 12% über dem Präinfektionswert und in Woche 16 um 24% darunter, beim Tier 2155 sogar um 47%.

NK-Zell-Kinetik / Versuch 1

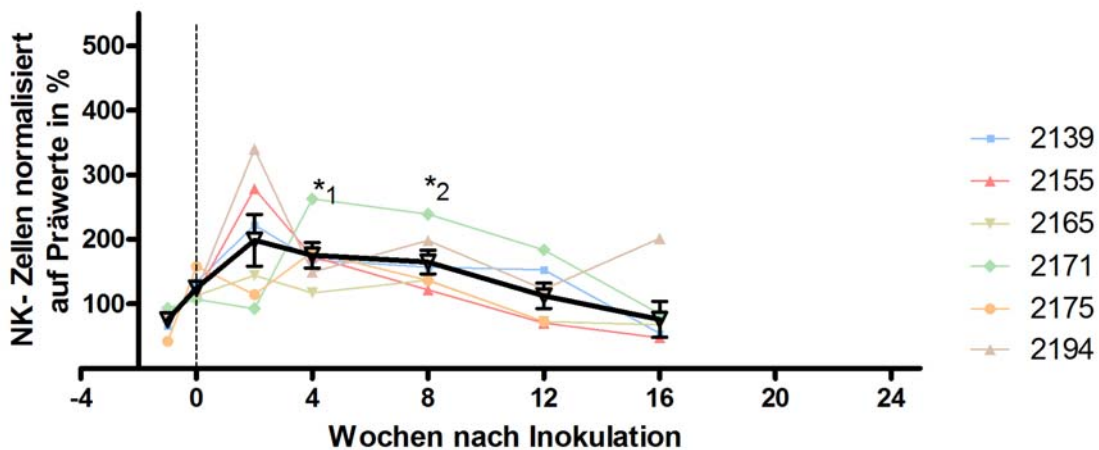


Abb.3. 4 Zeitverlauf des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten im Versuch 1. Die Zeitverläufe der einzelnen Tiere sind jeweils farbig dargestellt. Der gemeinsame Mittelwert mit der Standardabweichung ist schwarz. In Woche vier (*1) und acht (*2) konnte eine signifikante Erhöhung des Mittelwertes erfasst werden (Wilcoxon Test, $p < 0,03$).

Im Versuch 2 stieg der durchschnittliche NK-Zellanteil bis Woche vier an, wo er den Spitzenwert von 214% erreichte. Der Anteil war in Woche zwei und vier gegenüber den Präinfektionswerten signifikant erhöht (Wilcoxon Test, $p < 0,03$). Im weiteren Verlauf kam es zu einer Abnahme der NK-Zellen, bis auf 80% in Woche acht.

Daraufhin erhöhten sich die Messwerte erneut und verblieben auf dem Niveau der Vorinfektionswerte.

Die Varianz unter den Tieren war sehr groß. Die Tiere 2231, 12529 und 12673 zeigten einen überdurchschnittlich hohen Anteil an NK-Zellen im gesamten Zeitverlauf. Sie wurden ein bis zwei Jahre nach Infektion euthanasiert und zeigten bis dahin einen asymptomatischen Krankheitsverlauf. Im Gegensatz dazu hatten die beiden LTNPs die wenigsten NK-Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum und zeigten weder in Woche zwei noch vier einen deutlichen Anstieg.

NK-Zell-Kinetik / Versuch 2

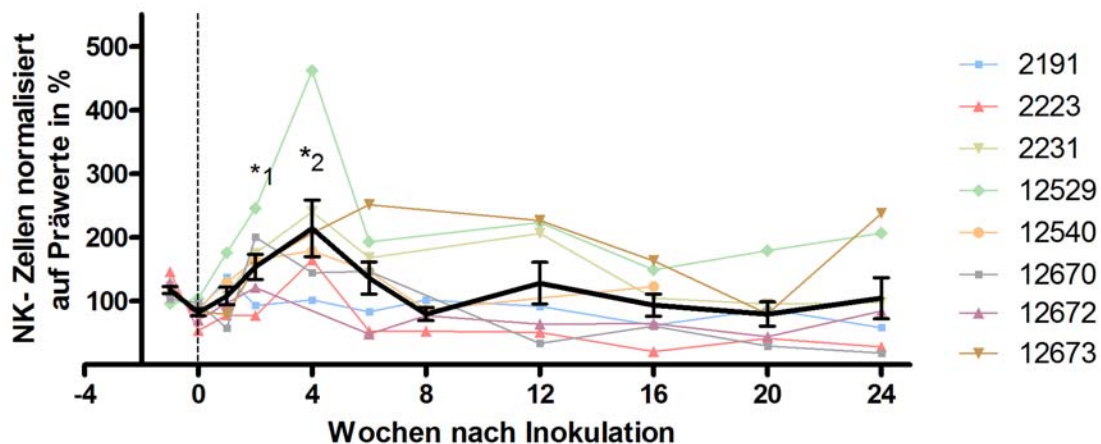


Abb.3. 5 Zeitverlauf des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten im Versuch 2. Die Zeitverläufe der einzelnen Tiere sind jeweils farbig dargestellt. Der gemeinsame Mittelwert mit der Standardabweichung ist schwarz. In Woche zwei (*1) und vier (*2) konnte eine signifikante Erhöhung des Mittelwertes erfasst werden (Wilcoxon Test, $p < 0,03$).

In Versuch 3 erfolgte die Infektion nicht tonsillär mit SIV_{mac}239, sondern intravenös mit SIV_{mac}251. Die ersten 14 Tage nach Inokulation wurden dabei engmaschiger untersucht. Der Anteil der NK-Zellen steigerte sich ab dem ersten Messzeitpunkt, erst in Woche vier wurde der Spitzenwert von 260% erreicht. Dabei war Woche zwei und vier signifikant erhöht (Wilcoxon Test, $p < 0,03$). Daraufhin reduzierten sich die NK-Zellen und lagen bis Woche 24 zwischen 194% und 236%. Die individuelle Varianz der Tiere war sehr groß. Bei Tier 13262 waren die NK-Zellen in Woche vier sogar fünffach erhöht, auch im Folgenden hatte es die höchsten NK-Zellanteile. Dieses Tier hatte zudem eine hohe Virusbeladung und zeigte den schnellsten Krankheitsverlauf in Versuch 3.

NK-Zell-Kinetik / Versuch 3

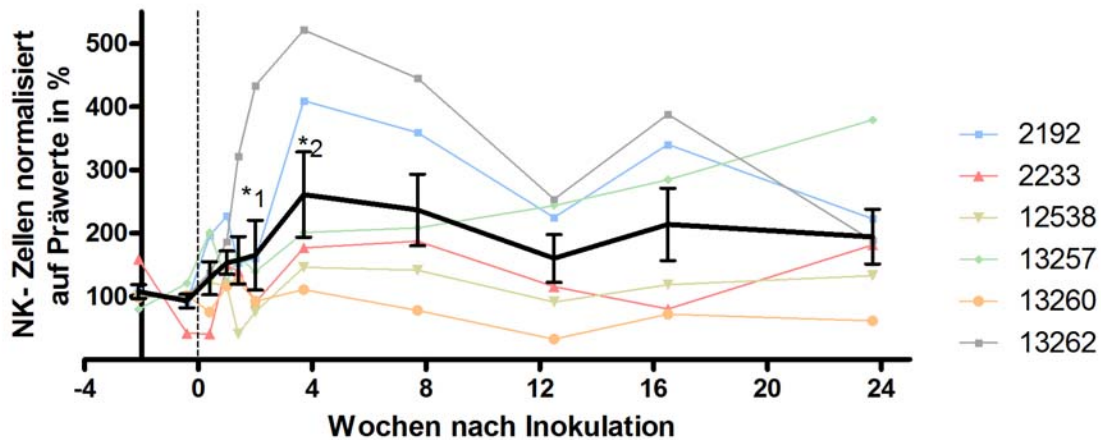


Abb.3. 6 Zeitverlauf des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten im Versuch 3. Die Zeitverläufe der einzelnen Tiere sind jeweils farbig dargestellt. Der gemeinsame Mittelwert mit der Standardabweichung ist schwarz. In Woche zwei (*1) und vier (*2) konnte eine signifikante Erhöhung des Mittelwertes erfasst werden (Wilcoxon Test, $p < 0,03$).

Die drei Versuche mit insgesamt 20 Tieren wurden zudem auch als Ganzes, durch die Bildung eines Mittelwertes betrachtet. Es konnte dabei ein signifikanter Anstieg in Woche zwei und bei Erreichen des Spitzenwertes mit 216% in Woche vier erfasst werden, sowie in Woche acht (Wilcoxon Test, $p < 0,03$). Daraufhin nahm der NK-Zellanteil stetig ab, so dass in Woche 16 nur noch 133% gemessen wurden.

Im Vergleich zeigt Versuch 3 mit den intravenös SIV_{mac}251 infizierten Tieren die größte Steigerung der NK-Zellen. Auch nach Erreichen des Spitzenwertes war im weiteren Verlauf der Anteil der NK-Zellen überdurchschnittlich hoch. Versuch 1 und 2, Infektion mit SIV_{mac}239, variierten im Zeitpunkt der Spitzenwerte. Bei beiden Versuchen war der NK-Zellanteil im Verlauf aber deutlich niedriger als in Versuch 3.

Zusammenfassung

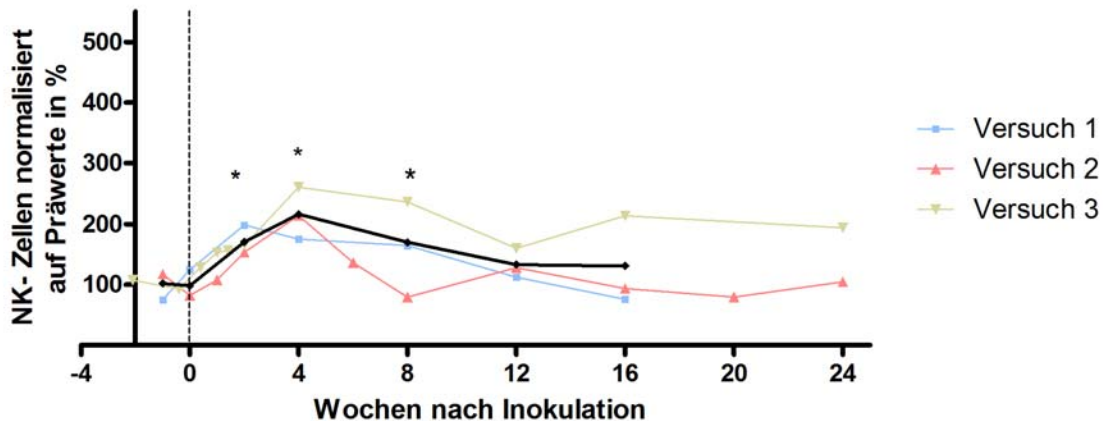


Abb.3. 7 Zeitverlauf des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten im Versuch 1/2/3. Die Zeitverläufe der einzelnen Versuche sind jeweils farbig dargestellt. Der gemeinsame Mittelwert ist schwarz. In Woche zwei (*), vier (*) und acht (*) konnte eine signifikante Erhöhung des Mittelwertes erfasst werden (Wilcoxon Test, $p < 0,03$).

Es wurden zudem alle 20 Tiere nicht nach Versuchen, sondern nach dem Krankheitsverlauf sortiert, so dass vier Gruppen gebildet werden konnten (Abb. 3.8). Die Einteilung erfolgte nach Infektionsdauer bzw. Ausbildung von AIDS (Tab.3.1). Tiere die innerhalb von sechs Monaten erkrankten wurden als RPs eingestuft (vier Tiere). Tiere die innerhalb von zwei Jahren erkrankten wurden in der AIDS-Gruppe zusammengefasst (fünf Tiere). Tiere die länger überlebten galten als LTNPs (sieben Tiere). Alle Tiere die vor Ausbruch von AIDS euthanasiert werden mussten, wurden als asymptomatisch beschrieben (vier Tiere).

Unabhängig vom Krankheitsverlauf der Tiere wurde eine allgemeine Zunahme der NK-Zellen nach Infektion gemessen. Die Tiere der asymptomatischen und der AIDS-Gruppe zeigten die deutlichste Zunahme der NK-Zellen und waren im gesamten Zeitverlauf über dem Mittelwert. Die NK-Zellen der Tiere mit einem schnellem Krankheitsverlauf (RP) lagen leicht unterhalb des Mittelwertes, die Tiere mit einem langsamen (LTNP) deutlich darunter, besonders zum Zeitpunkt der Spitzenwerte.

Zusammenfassung nach Krankheitsverlauf

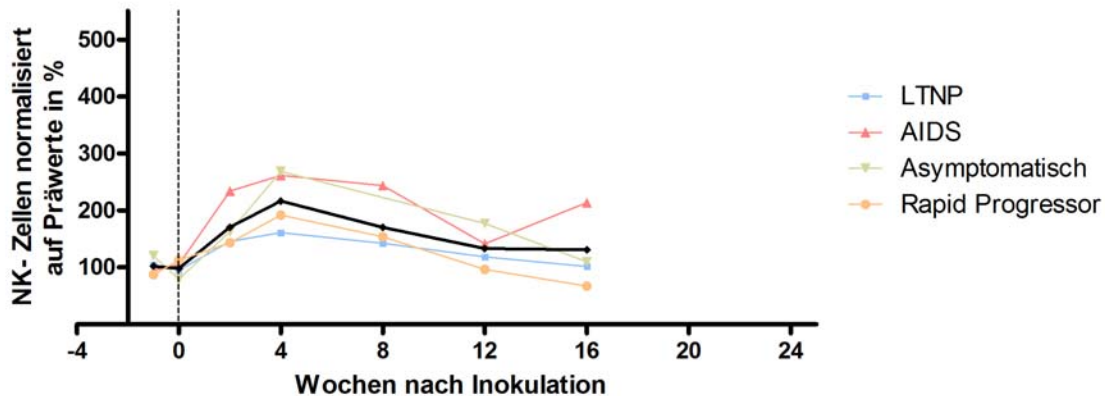


Abb.3. 8 Zeitverlauf des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten, gruppiert nach dem Krankheitsverlauf. Die Zeitverläufe der vier Gruppen sind jeweils farbig dargestellt. Der gemeinsame Mittelwert ist schwarz.

3.6.3 CD16- und CD159a-positive NK-Zellen nach der Infektion

In den drei Versuchen wurden die Veränderungen der drei funktionell unterschiedlichen NK-Zell-Subpopulationen CD16-einfachpositiv, CD159a-einfachpositiv und CD16/CD159a-doppeltpositiv erfasst. Die Zeitverläufe sind in Relation zu den Präinfektionswerten dargestellt.

In Versuch 1 erhöhte sich der Anteil der NK-Zellen in allen drei Subpopulationen zur ersten Messung in Woche zwei. Die CD159a-einzelpositiven NK-Zellen wiesen dabei die größte Steigerung auf und erreichten den signifikanten Spitzenwert (Wilcoxon Test, $p = 0,03$). In Woche vier und acht konnte in allen drei Subpopulationen eine signifikante Erhöhung gemessen werden (Wilcoxon Test, $p = 0,03$), wobei die Erhöhung der CD16-einzelpositiven am geringsten ausfiel. Im weiteren Verlauf reduzierten sich alle Subpopulationen. In Woche 16 lagen die Werte der CD159a-einzelpositiven mit 147% noch deutlich über Vorinfektionsniveau, die der CD16-einzel- bzw. CD16/CD159a-doppeltpositiven mit 85% und 60% darunter.

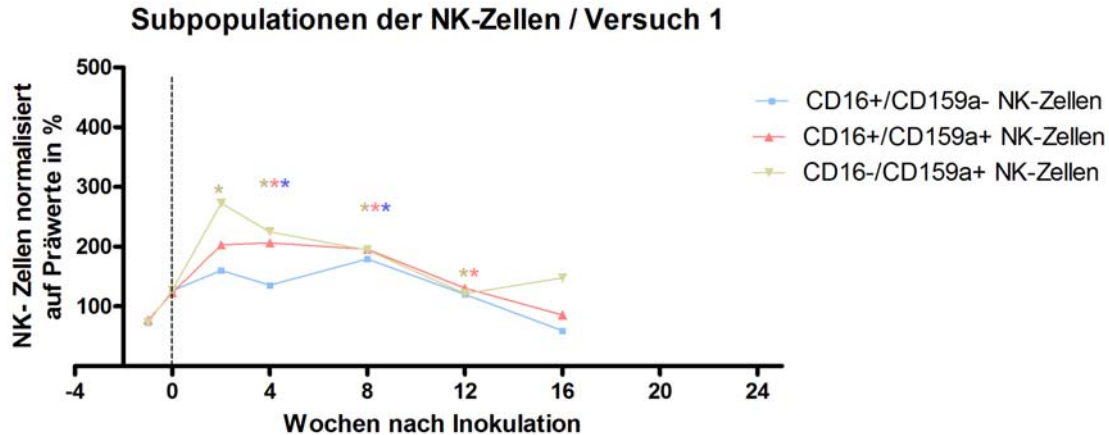


Abb.3. 9 Kinetik der CD16/CD159a-doppeltpositiven, sowie CD16- und CD159a-einzelpositiven NK-Zellen in Versuch 1. Die Subpopulationen wurden jeweils farbig als Mittelwert dargestellt. Die Farbe der Sterne bezieht sich auf die jeweilige Population. Signifikante Unterschiede gegenüber den Präinfektionswerten konnten in Woche zwei (Wilcoxon Test mit $p < 0,03$), vier, acht und zwölf (Wilcoxon Test mit $p = 0,03$) erfasst werden.

In Versuch 2 waren eine Woche nach Infektion noch keine Veränderungen in den NK-Zellpopulationen erkennbar. Zwei Wochen nach Infektion erhöhten sich die CD159a-einzelpositiven signifikant (Wilcoxon Test, $p = p < 0,03$) und erreichten vier Wochen nach Infektion mit 329% den signifikanten Spitzenwert (Wilcoxon Test, $p < 0,03$). Daraufhin reduzierten sich die Werte, zur Woche acht wurde das Vorinfektionsniveau unterschritten. Anschließend steigerte sich ihr Anteil erneut und bildete in Woche 16 und 24 einen weiteren signifikanten Spitzenwert (Wilcoxon Test, $p < 0,03$). Bei den CD16/CD159a-doppeltpositiven NK-Zellen konnte in Woche zwei eine signifikante Steigerung registriert werden (Wilcoxon Test, $p < 0,03$). In Woche vier wurde der Spitzenwert mit 243% erreicht. Daraufhin reduzierten sich ihre Anteile kontinuierlich, so dass ab Woche 8 die Vorinfektionswerte unterschritten wurden. Die Population der CD16-einzelpositiven NK-Zellen zeigte eine Erhöhung mit einem Spitzenwert in Woche zwei (153%). Anschließend nahm ihr Anteil ab, in Woche 16 wurden die Vorinfektionswerte unterschritten. In Woche 24 wurde ein signifikanter Verlust dieser Zellen registriert (Wilcoxon Test, $p = 0,03$).

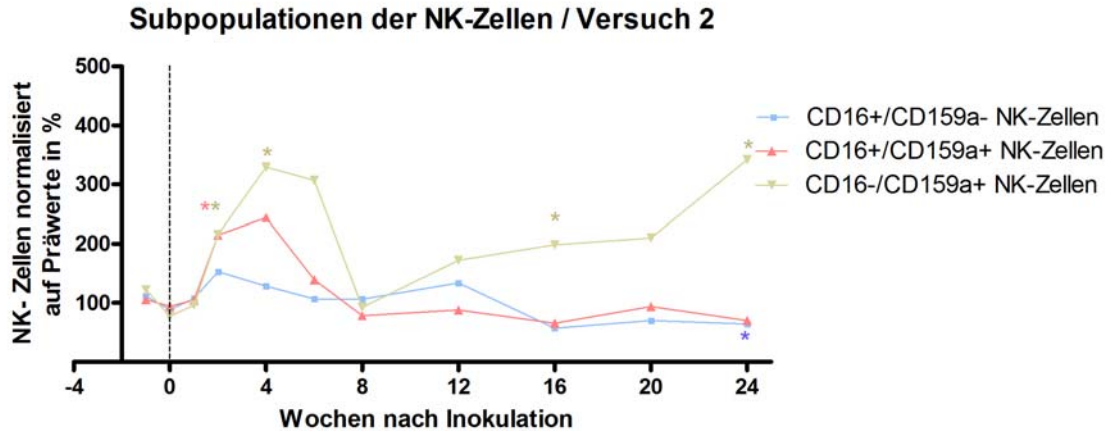


Abb.3. 10 Kinetik der CD16/CD159a-doppeltpositiven, sowie CD16- und CD159a-einzelpositiven NK-Zellen in Versuch 2. Die Subpopulationen wurden jeweils farbig als Mittelwert dargestellt. Die Farbe der Sterne bezieht sich auf die jeweilige Population. Signifikante Unterschiede gegenüber den Präinfektionswerten konnten in Woche zwei **, vier*, 16*, 24* (Wilcoxon Test mit $p < 0,03$) und * 24 bei den CD16+/CD159a- (Wilcoxon Test mit $p = 0,03$) erfasst werden.

Im Versuch 3 war die Varianz der Messwerte erheblich. Tendenziell ist in allen drei Subpopulationen eine signifikante Zunahme (Wilcoxon Test, $p = 0,03$) der Werte, ein bis zwei Wochen nach Infektion zu beobachten. Die CD16-einzelpositiven und CD16/CD159a-doppeltpositiven NK-Zellen sind im weiteren Beobachtungszeitraum ab Woche acht deutlich, zum Teil signifikant über den Vorinfektionswerten (Wilcoxon Test, $p = 0,03$). Die Population der CD159a-einzelpositiven NK-Zellen verblieben ab Woche vier auf Vorinfektionsniveau.

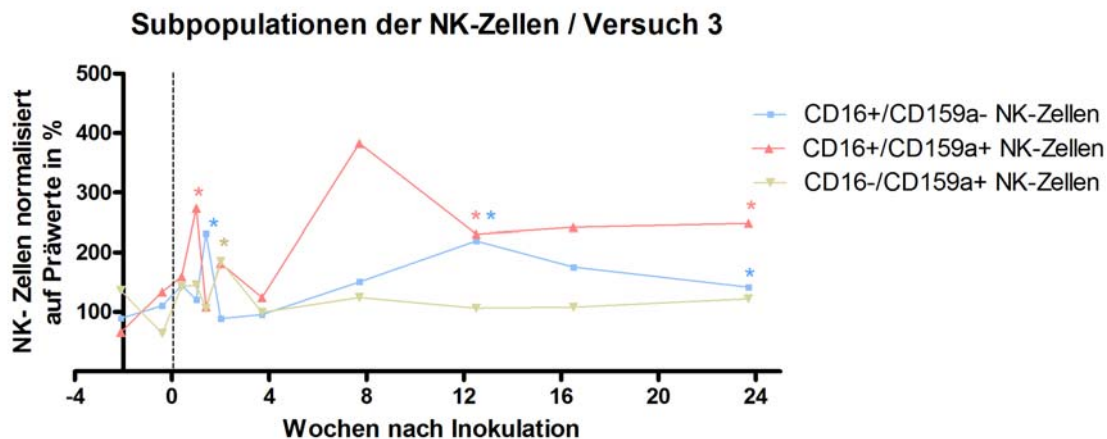


Abb.3. 11 Kinetik der CD16/CD159a-doppeltpositiven, sowie CD16- und CD159a-einzelpositiven NK-Zellen in Versuch 3. Die Subpopulationen wurden jeweils farbig als Mittelwert dargestellt. Die Farbe der Sterne bezieht sich auf die jeweilige Population. Signifikante Unterschiede gegenüber den Präinfektionswerten konnten in Woche eins*, 1,4*, zwei*, 12** und 24* erfasst werden (Wilcoxon Test mit $p = 0,03$).

3.6.4 Korrelation des NK-Zellanteils mit der Virusbeladung im Zeitverlauf

Die Gegenüberstellung der Viruslast mit dem prozentualen Anteil der NK-Zellen und der Subpopulationen der drei Versuche führte zu keiner signifikanten Korrelation. Es bestand somit kein Zusammenhang zwischen der Viruslast und den NK-Zellen.

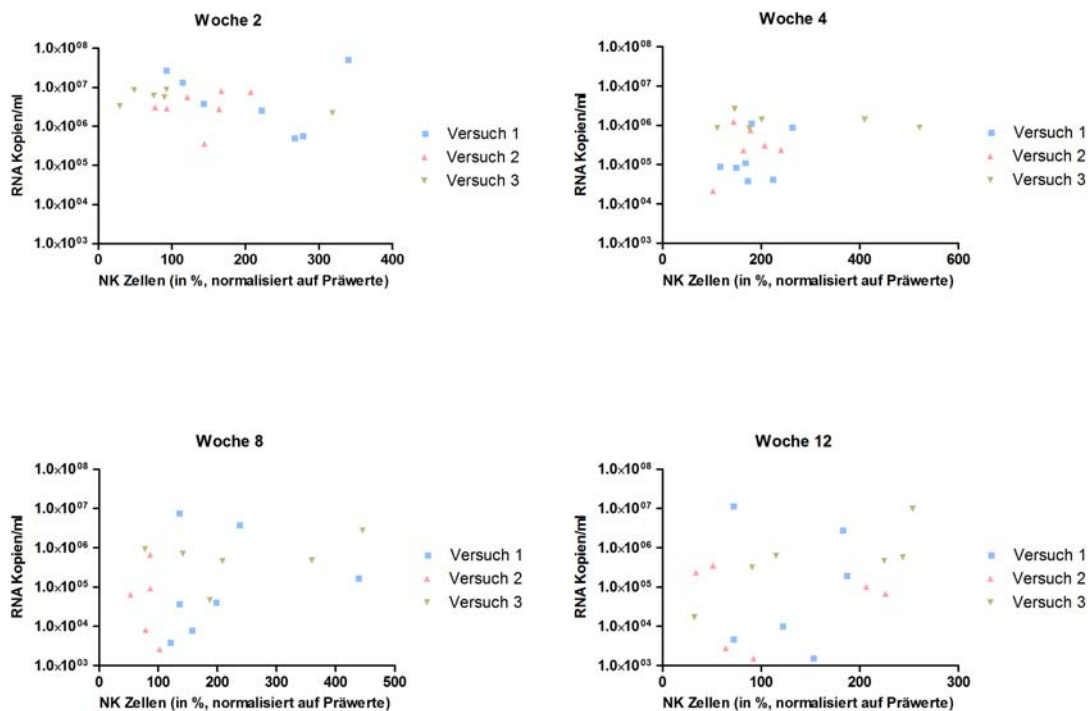


Abb.3. 12 Korrelation der Viruslast mit den prozentualen Anteilen der NK-Zellen (normalisiert auf Präwerte). Die Versuche sind farblich voneinander getrennt. Mit dem Spearman-Test konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden. Untersucht wurden dabei folgende Zeitpunkte: 2, 4, 8 und 12 Wochen nach Infektion.

3.7 Kinetik der $\gamma\delta$ -T-Zellen / Versuch 3

3.7.1 $\gamma\delta$ -T-Zellen vor der Infektion

An Tag 15 und 3 vor Inokulation wurden Präwerte erhoben, um den Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen an den T-Zellen von Tieren im Normalzustand zu definieren (Abb. 3.13). Am ersten Messtag waren durchschnittlich 4,7%, am zweiten Messtag 5,1% der T-Zellen $\gamma\delta$ -TCR positiv. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant. Die Messwerte lagen zwischen 1,6% und 8%. Tier 13262 wies mit durchschnittlich 7,4% den

höchsten Anteil auf. Der geringste Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde mit durchschnittlich 1,6% bei Tier 2233 gemessen.

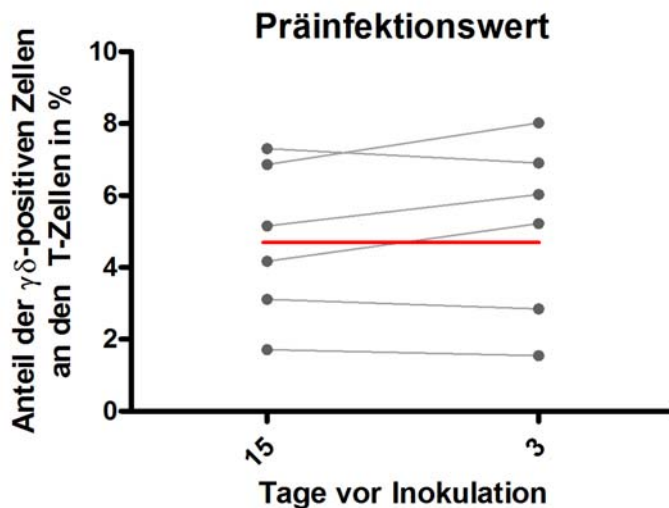


Abb.3. 13 Präinfektionswerte der $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dargestellt sind die Präinfektionswerte an zwei unterschiedlichen Messzeitpunkten. Die grauen Punkte stehen jeweils für einen Messwert eines Tieres. Die graue Linie verbindet jeweils die beiden Messzeitpunkte miteinander. Die rote Linie gibt den Mittelwert aller Messungen wieder.

3.7.2 $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen nach der Infektion

Drei Tage nach SIV-Infektion erhöhte sich der mittlere Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen signifikant um ca. 20% (Wilcoxon-Test, $p = 0,03$) und erreichte in Woche 1 nach Infektion bereits wieder das Präinfektionsniveau (Abb. 3.14). Ab Tag neun stieg die Konzentration dieser Zellen erneut an und war in Woche vier mit 157% signifikant erhöht (Wilcoxon-Test, $p = 0,03$). Im weiteren Beobachtungszeitraum blieben die Werte im Mittel auf diesem Niveau.

Zwei Tiere hatten im gesamten Zeitverlauf einen überdurchschnittlich hohen Anstieg an $\gamma\delta$ -T-Zellen. Neben Tier 13262, das den schnellsten Krankheitsverlauf und die höchste Virusbeladung in Versuch 3 hatte auch ein LTNP (Tier 2233). Die beiden anderen LTNPs (Tiere 12538 und 13257) hatten genetisch vorteilhafte MHC-Varianten und der $\gamma\delta$ -T-Zellanteil war ab Woche 12 wieder auf dem Vorinfektionsniveau. Aber auch Tier 13260, das nach zwei Jahren an AIDS erkrankte und die niedrigste Virusbeladung im Versuch hatte, zeigte im Zeitverlauf nur sehr geringe Veränderungen der $\gamma\delta$ -T-Zellen.

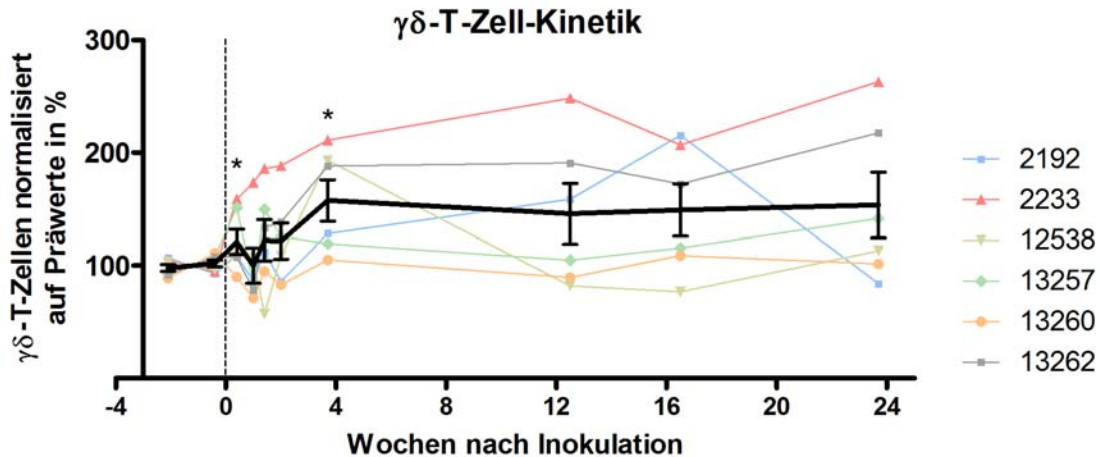


Abb.3. 14 Zeitverlauf der $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dargestellt sind die Zeitverläufe der Tiere. Dabei sind die Tiere farblich voneinander getrennt. Der gemeinsame Mittelwert und die Standardabweichung sind als schwarze Linie dargestellt. Ein signifikanter Unterschied des Mittelwertes gegenüber den Präinfektionswerten wurde drei Tage und vier Wochen nach Infektion erfasst (* Wilcoxon Test mit $p=0,03$).

3.7.3 CD8-, CD69- und CD159a-positive $\gamma\delta$ -T-Zellen

Da die allgemeine Kinetik der $\gamma\delta$ -T-Zellen nach SIV-Infektion nicht eindeutig in Bezug zum Krankheitsverlauf der Tiere war, wurde die Expression funktionell interessanter Oberflächenantigene (CD8, CD69, CD159a) untersucht. Dafür wurde ihr Anteil an den $\gamma\delta$ -T-Zellen bestimmt (Abb. 3.16., exemplarisch für Tier 2192 zum Präinfektionszeitpunkt).

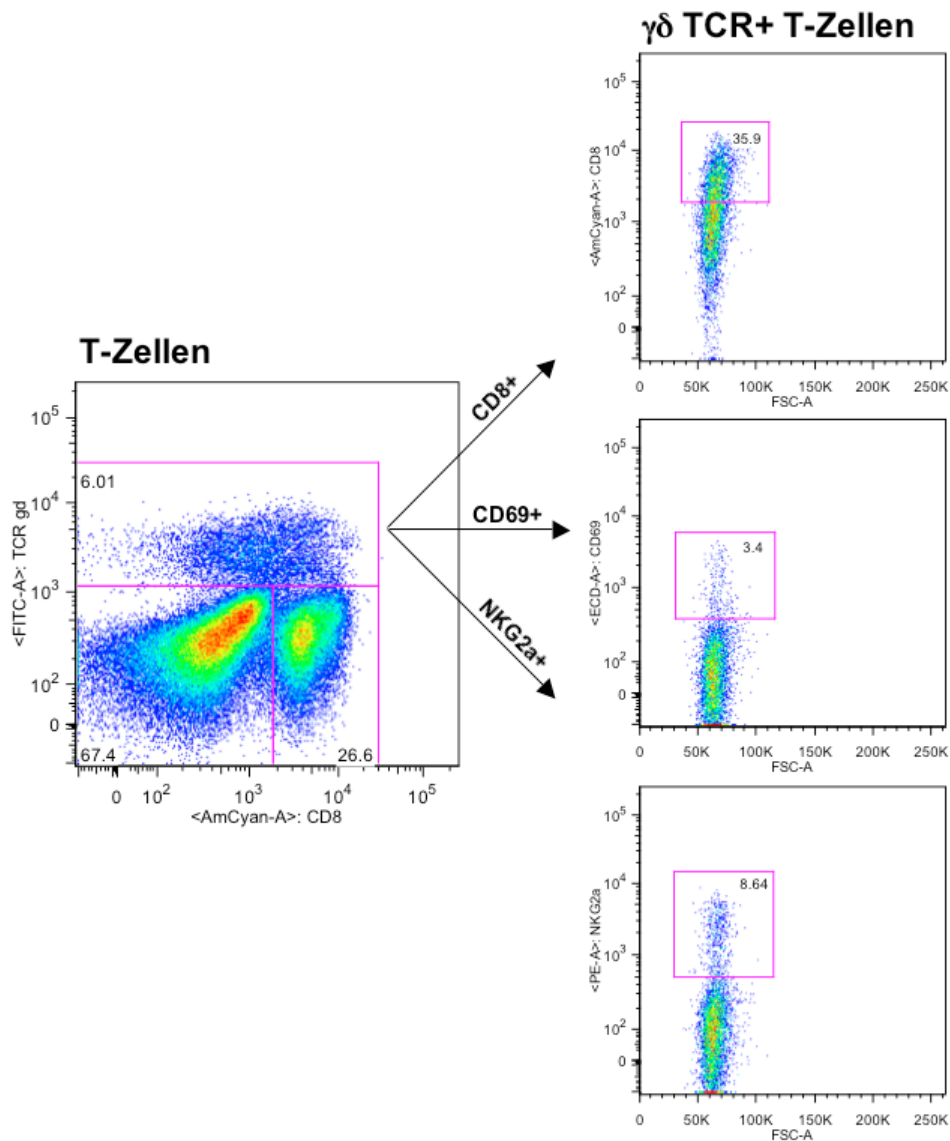


Abb.3. 15 Auswertungsschema der durchflusszytometrischen Messung für die $\gamma\delta$ -TCR-positiven T-Zellen. Mit der Definition der $\gamma\delta$ -T-Zellen beginnend, zeigen die Pfeile die Auswertungswege zur Einteilung der CD8-, CD69- sowie CD159a (NKG2a)-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen.

3.7.3.1 CD8-, CD69- und CD159a-positive $\gamma\delta$ -T-Zellen vor der Infektion

Die beiden Präinfektionsmessungen für CD8-positive $\gamma\delta$ -T-Zellen lagen im Mittel bei 62%. Ihr Anteil an den $\gamma\delta$ -T-Zellen machte 36,2% bis 89,7% aus.

Die Population der CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen lag bei 23%, mit Anteilen zwischen 15% und 42%. Der Anteil der CD159a-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen lag an den beiden Vorinfektionszeitpunkten bei ca. 22%. Minimal wurden 14,2%, maximal 34,5%

gemessen. Zwischen den beiden Vorinfektionsmessungen bestanden in den drei Subpopulationen keine signifikanten Unterschiede.

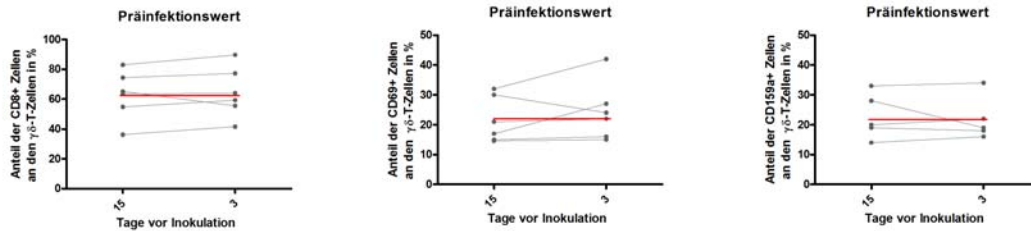


Abb.3. 16 Präinfektionswerte für die CD8-, CD69- und CD159a-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dargestellt sind zwei Messzeitpunkte vor Infektion der Tiere. Diese sind jeweils für ein Tier mit einer grauen Linie verbunden. In rot ist der Mittelwert aller Messungen eingetragen.

3.7.3.2 CD8-, CD69- und CD159a-positiv $\gamma\delta$ -T-Zellen nach der Infektion

Die Expression des MHC-I-Korezeptors CD8 auf den $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde bis auf eine leichte Schwankung in der akuten Phase durch die SIV-Infektion nicht signifikant beeinflusst. Der Anteil dieser Zellen entsprach den Vorinfektionswerten. Die individuellen Werte der Tiere waren untereinander sehr einheitlich.

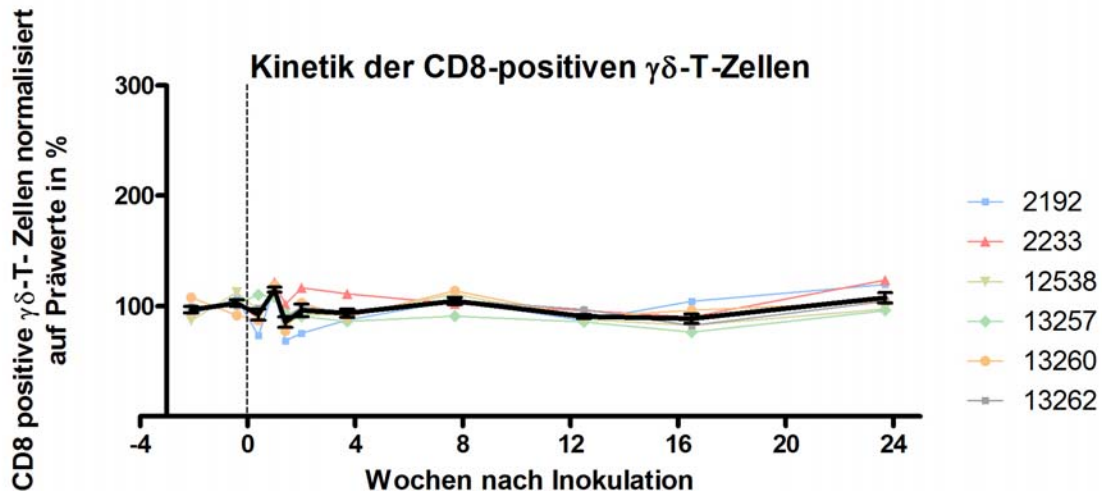


Abb.3. 17 Zeitverlauf der CD8-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dargestellt sind die Zeitverläufe der einzelnen Tiere. Dabei sind die Tiere farblich voneinander getrennt. Der gemeinsame Mittelwert mit Standardabweichung ist als schwarze Linie dargestellt.

CD69 gilt als früher Aktivierungsmarker. Der Anteil der CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen stieg unmittelbar nach Infektion an und war am Tag zehn und zwei Wochen nach

Infektion signifikant, mit maximal 182%, erhöht (Wilcoxon Test, $p < 0,03$). Bis Woche acht reduzierte sich der Mittelwert auf 120% und stieg anschließend erneut kontinuierlich an und war in Woche 24 erneut signifikant erhöht (Wilcoxon Test, $p < 0,03$). Die individuelle Varianz unter den Tieren war dabei sehr groß.

Von den beiden Tieren mit überdurchschnittlich hohem $\gamma\delta$ -T-Zellanteil wies der LTNP (Tier 2223) eine deutlich frühere und stärkere Aktivierung als das Tier 13262 mit schnellem Krankheitsverlauf auf. Tier 13275 (LTNP, Mamu B*17-positiv) und Tier 13260 (AIDS) mit wenigen $\gamma\delta$ -T-Zellen (Abb. 3.14) und geringer Virusbeladung (Abb. 3.1) zeigten auch eine sehr niedrige CD69-Aktivierung.

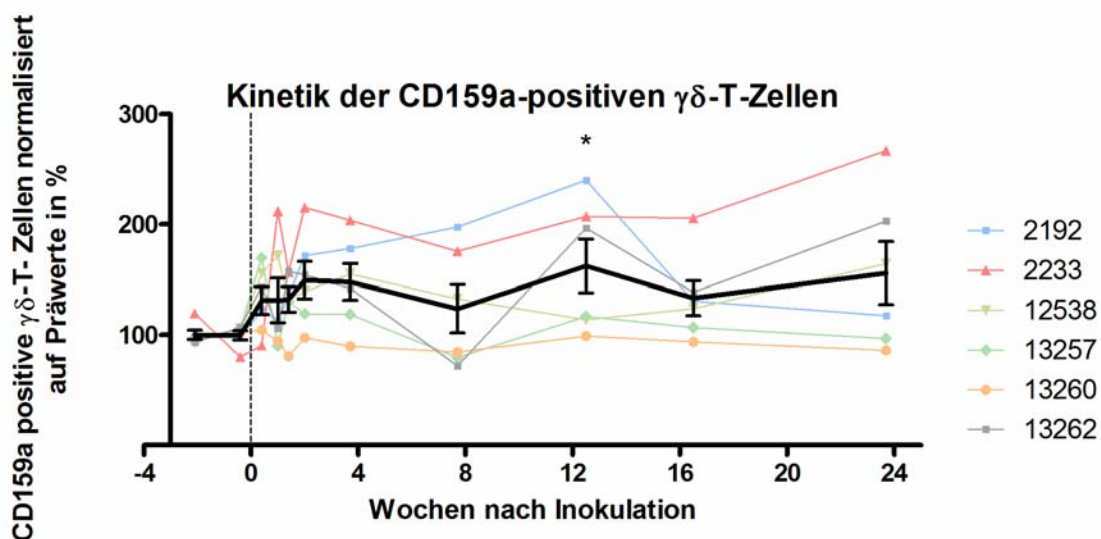


Abb.3. 18 Zeitverlauf der CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dargestellt sind die Zeitverläufe der einzelnen Tiere. Dabei sind die Tiere farblich voneinander getrennt. Der gemeinsame Mittelwert mit Standardabweichung ist als schwarze Linie dargestellt. Signifikante Unterschiede des Mittelwertes gegenüber den Präinfektionswerten wurden an Tag 10 (*) sowie in Woche zwei (*) und 24 (*) erreicht (* Wilcoxon Test mit $p < 0,03$).

Als Teil eines inhibierenden Rezeptorkomplexes ist CD159a an der Erkennung von nicht klassischen MHC-Molekülen (HLA-E) beteiligt. Bereits drei Tage nach Infektion erhöhte sich der Mittelwert der CD159a-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen und erreichte in Woche zwei mit 150% den vorläufigen Spitzenwert. Im weiteren Beobachtungsbereich blieben die Werte auf diesem Niveau. In Woche 12 konnte eine signifikante Steigerung auf 162% registriert werden (Wilcoxon Test, $p < 0,03$). Die individuelle Varianz der Tiere war jedoch sehr groß.

Erneut hatte Tier 2223 den höchsten Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen, die stärkste Aktivierung und einen überdurchschnittlich hohen Anteil CD159a-exprimierender $\gamma\delta$ -T-Zellen.

Tier 13262 (AIDS) mit vergleichbar hoher $\gamma\delta$ -T-Zellzahl hatte deutlich weniger CD159a-positive Zellen. Die Tiere 13257 (LTNP) und 13260 (AIDS) zeigten, wie für die allgemeine Kinetik der $\gamma\delta$ -T-Zellen und die CD69-Expression, auch im Bezug auf CD159a nur minimale Veränderungen nach Infektion.

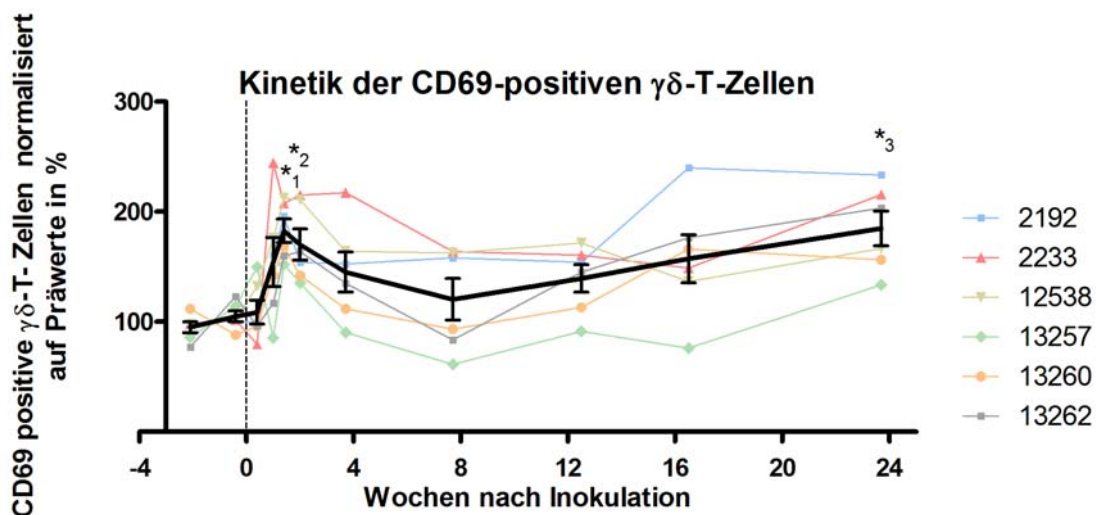


Abb.3. 19 Zeitverlauf der CD159a-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dargestellt sind die Zeitverläufe der Tiere. Dabei sind die Tiere farblich voneinander getrennt. Der gemeinsame Mittelwert mit Standardabweichung ist als schwarze Linie abgebildet. In Woche 12 konnte ein signifikanter Anstieg des Mittelwertes erfasst werden (* Wilcoxon Test mit $p < 0,03$).

3.7.4 Kinetik der einfach- und doppelpositiven $\gamma\delta$ -T-Zellen

Nach Infektion zeigten sich die deutlichsten Veränderungen in der signifikant erhöhten Expression von CD69 auf den $\gamma\delta$ -T-Zellen. Deshalb konzentrierte man sich bei der Analyse der Mehrfachexpression der drei untersuchten Oberflächenantigene auf diese Subpopulation.

Um die Expression der beiden anderen Oberflächenantigene auf den CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen zu untersuchen, wurde die Fluoreszenzintensität von CD8 (Abb. 3.20A) bzw. CD159a (Abb. 3.20B) gegen die von CD69 für alle $\gamma\delta$ -T-Zellen aufgetragen. Für Tier 2192, das in Abbildung 3.20 exemplarisch zum Präinfektionszeitpunkt dargestellt ist, sind mit 10,14% bzw. 10,13% die Anteile der CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen in

beiden Auswertungen gleich. Von diesen CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen sind 82% doppelpositiv für CD8 und 35% doppelpositiv für CD159a. Die Prozentsätze beinhalten aber noch die $\gamma\delta$ -T-Zellen die alle drei Oberflächenantigene exprimieren.

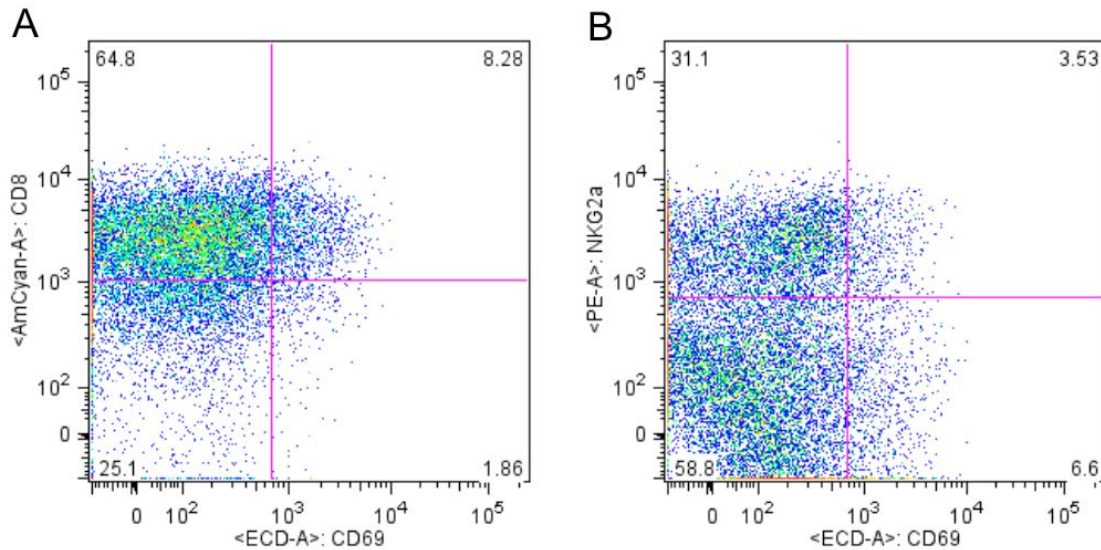


Abb.3. 20 Auswertungsschema der durchflusszytometrischen Messung für doppelpositive $\gamma\delta$ -T-Zellen. Exemplarisch ist das Auswerteschema für ein Tier zu einem Präinfektionszeitpunkt dargestellt.

Die Auswertung von einfach- und doppelpositiven $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde in Kombination für CD8, CD69 und CD159a analysiert. Die Resultate sind in Abbildung 3.21 als Mittelwert aller Tiere vor Infektion dargestellt.

Im Durchschnitt der sechs Tiere waren 16% der CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen einzelpositiv, weitere 73% CD69/CD8-doppelpositiv und 11% CD69/CD159a-doppelpositiv.

Zusätzlich wurden die Verteilungen für die CD8- bzw. CD159a-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen vor Infektion dargestellt (Abb.3.21). Von den CD8-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen waren 60% einzelpositiv. Weitere 21% waren CD8/CD69- und 19% CD8/CD159a-doppelpositiv. Die CD159a-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen gliedern sich in: 19% einzelpositiv, 12% CD159a/CD69-doppel-positiv und 69% CD159a/CD8-doppel-positiv.

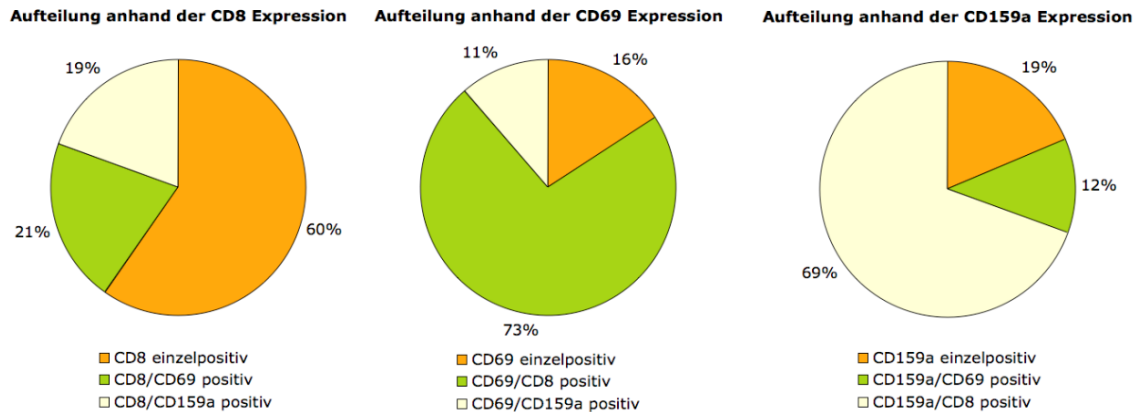


Abb.3. 21 Schematische Darstellung der einfach und mehrfach Expression von CD8, CD69 und CD159a auf $\gamma\delta$ -T-Zellen. Es sind die prozentualen Anteile der einzelnpositiven und doppelpositiven Subpopulationen an den CD8-, CD69- bzw. CD159a-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vorinfektionszeitraum dargestellt.

Für die CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde abschließend untersucht welche der drei Subpopulationen für die gesteigerte Expression nach Infektion verantwortlich war (Abb. 3.22).

Die CD69/CD159a-doppelpositiven $\gamma\delta$ -T-Zellen, als kleinste Subpopulation, zeigten die größte Steigerung gegenüber den Vorinfektionswerten. Zwei Wochen nach Infektion wurde der Spitzenwert mit 280% erreicht. Bis Woche vier reduzierte sich der Anteil, blieb im weiteren Beobachtungszeitraum aber bei ca. 200% erhöht.

Die Population der CD69-einzelnpositiven $\gamma\delta$ -T-Zellen, zeigte einen ersten starken Anstieg an Tag 10, auf über 200%. Zu Woche zwei reduzierte sich der Anteil dieser Subpopulation deutlich, um dann erneut anzusteigen und in Woche 16 mit 222% den Höchstwert zu erreichen.

Die CD69/CD8-doppelpositiven $\gamma\delta$ -T-Zellen hatten im Vergleich ein deutlich niedrigeres Steigerungspotential. Als größte Subpopulation vor Infektion, zeigten sie im Beobachtungszeitraum die gleiche Kinetik wie die Gesamtheit aller CD69-positiven Zellen, mit Spitzenwerten in Woche zwei und 24.

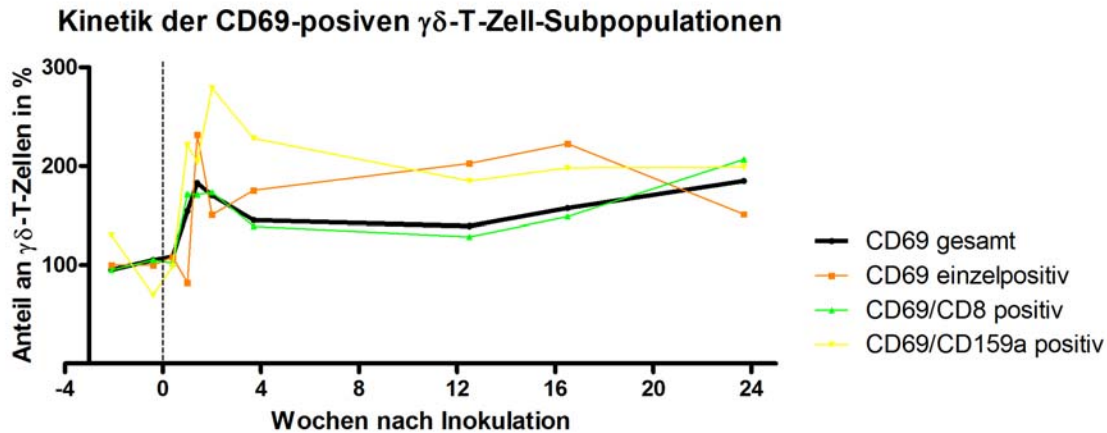


Abb.3. 22 Zeitverlauf der CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen und der Subpopulationen. Dabei sind die Subpopulationen farblich voneinander getrennt und als Mittelwert aller Tiere dargestellt. Die CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen sind als schwarze Linie abgebildet.

3.7.4.1 Korrelation des $\gamma\delta$ -T-Zellanteils mit der Virusbeladung im Zeitverlauf

Für Woche 2, 4, 8 und 12 wurde die Virusbeladung den auf die Präwerte normalisierten $\gamma\delta$ -T-Zellwerten gegenübergestellt. Die Virusbeladung in Woche zwei wies eine signifikante negative Korrelation zum Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen an den T-Zellen auf (Abb. 3.23, $r=-0,94$, $p=0,016$). Für die Subpopulationen wurde die Gegenüberstellung mit der Virusbeladung ebenfalls durchgeführt, erbrachte aber keine signifikante Korrelation.

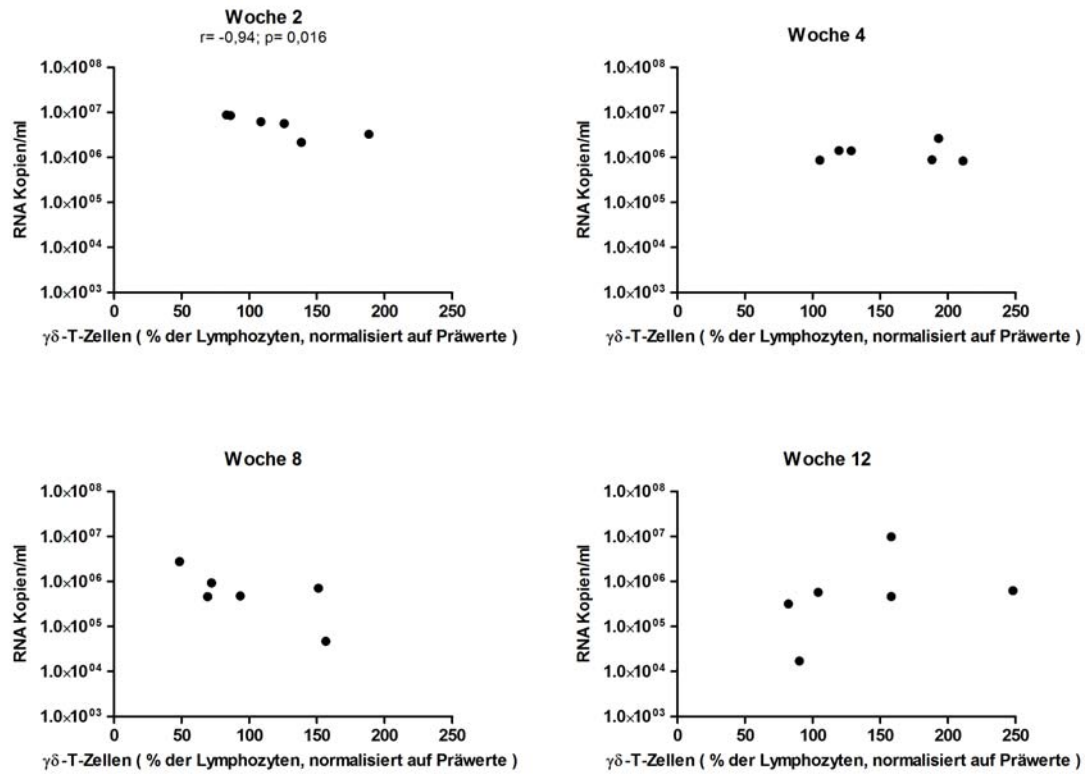


Abb.3. 23 Korrelation der Viruslast mit den normalisierten $\gamma\delta$ -T-Zellen. In Woche zwei konnte eine signifikante Korrelation festgestellt werden ($r = -0,94$, $p = 0,016$). Untersucht wurden dabei folgende Zeitpunkte: 2, 4, 8 und 12 Wochen nach Infektion.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer Infektion mit Immundefizienzviren auf die Zusammensetzung der Leukozytenpopulation im peripheren Blut untersucht, um die zeitlichen Veränderungen dieser Zellen zu erfassen. Dafür wurden in drei unabhängigen Versuchen regelmäßig Blutproben von SIV-infizierten Rhesusaffen, ab dem Zeitpunkt der Inokulation bis 28 Wochen nach Infektion entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Die zeitlichen Veränderungen der einzelnen Lymphozytensubpopulationen wurden für jedes Tier auf Vorinfektionswerte normalisiert und statistisch ausgewertet.

Der Schwerpunkt lag auf den Untersuchungen der NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen. Beide Zellpopulationen werden dem angeborenen Immunsystem zugeordnet (Azzoni et al., 2002; Poccia et al., 1998). Damit nehmen sie entscheidenden Einfluss auf die frühe Phase einer Virusinfektion. Darüber hinaus spielen sie eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Modlin and Sieling, 2005).

Vorraussetzung für die Untersuchungen war eine exakte Definition beider Populationen. Die Leukozyten wurden als CD11a-positiv definiert. Anhand der Granularität und CD14-Expression wurden Makrophagen und Lymphozyten definiert. Zusätzlich wurde für die CD14-negativen Lymphozyten die Expression der Zellmarker CD3 (T-Zellen) und CD20 (B-Zellen) untersucht. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimierten nur CD3, die NK-Zellen waren für beide Marker negativ. Durch diese negative Selektion wurden die zwei Zellpopulationen von den übrigen Leukozyten getrennt. Es erfolgte auch eine positiv Selektion. $\gamma\delta$ -T-Zellen trugen auf ihrer Oberfläche neben CD3 den $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor, NK-Zellen die Antigene CD16 und/oder CD159a.

Im Folgenden werden zuerst die Auswirkungen der SIV-Infektion auf die NK-Zellen betrachtet und darauf folgend auf die $\gamma\delta$ -T-Zellen.

Beim Menschen wird zur Definition und funktionellen Unterscheidung der NK-Zellsubpopulationen neben CD16 auch CD56 herangezogen (Wilk et al., 2008). Der humane monoklonale Antikörper gegen CD56 konnte zur durchflusszytometrischen Analyse der Rhesusaffen-Proben jedoch nicht verwendet werden, da er nicht NK-Zellen, sondern Makrophagen spezifisch bindet (Sopper et al., 1997; Webster and

Johnson, 2005). Bisher wurde bei Rhesusaffen noch kein Homolog für das humane NK-Zell-Subset CD56 identifiziert (Cooper et al., 2001). Neuere Untersuchungen zeigten, dass eine Kombination von Antikörpern gegen CD16 und CD159a sich zur Identifikation von NK-Zellen bei Rhesusaffen eignen (Mavilio et al., 2005). Eine alternative Charakterisierung von NK-Zellen beschreibt sie als CD3-negativ und CD8-positiv (Webster and Johnson, 2005). 90% dieser NK-Zellen waren auch CD16-positiv (Webster and Johnson, 2005). Zudem waren sowohl die CD16-positiven als auch die CD16-negativen NK-Zellen CD159a-positiv.

In der vorliegenden Arbeit wurden die verschiedenen Definitionen kombiniert. Nach einer negativ Selektion (CD3-/CD14-/CD20-negativ) wurden die verbleibenden Zellen anhand der CD16- und CD159a-Expression positiv selektiert. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass nur rund 90% der NK-Zellen CD8-positiv waren (Daten nicht gezeigt) und eine CD8-negative NK Zell-Population vorhanden war. Somit charakterisiert die verwendete Methode die NK-Zellen von Rhesusaffen derzeit am genauesten.

Vor der Infektion waren 8% der Lymphozyten NK-Zellen. Zwischen den beiden Präinfektionsabnahmen der Tiere bestanden teilweise signifikante Unterschiede. Die Mittelwerte der drei Versuche waren jedoch vergleichbar. Bisherige durchflusszytometrische Untersuchungen konnten einen Anstieg der NK-Zellen in der frühen Phase nach SIV-Infektion registrieren (Giavedoni et al., 2000). In der chronischen Phase ist ein Verlust von NK-Zellen an den Lymphozyten im humanen peripheren Blut bekannt (Fu et al., 2009). Diese NK-Zell-Reduktion korreliert mit dem Fortschreiten der Erkrankung (Tarazona et al., 2002).

In den drei Versuchsreihen konnte in den ersten zwei bis vier Wochen nach Infektion (akute Phase bis postakute Phase) eine Steigerung des NK-Zellanteils an den Lymphozyten gemessen werden, mit einem Maximum vier Wochen nach Infektion. Der Anstieg auf zum Teil mehr als das Doppelte der Vorinfektionswerte (max. 260%, Versuch 3) war in allen drei Versuchen zur Woche vier signifikant. Für einzelne Tiere dieser 3 Versuche variierten die Werte im Infektionsverlauf jedoch stark. Frühere Studien zeigten auch, dass nach Erreichen der Spitzenwerte, der Anteil an NK-Zellen im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf der Tiere variierte (Giavedoni et al., 2000). Der größte Wert wurde dabei in Woche zwei erreicht, zum Zeitpunkt der Spitzenvirämie.

In allen drei Versuchen wurde die Spitzenvirämie mit rund 1×10^7 RNA Kopien/ml Blutplasma an Tag 14 gemessen und fiel danach bis zum Beginn der chronischen Phase, in Woche 6 ab. Wenn man bedenkt, dass die CD4-positiven T-Zellen zu den Zielzellen des SI-Virus gehören und in der akuten Phase der Infektion verloren gehen (Wang et al., 2007), kommt es parallel zu einer relativen Zunahme der anderen Subpopulationen an den Lymphozyten. Interessant ist, dass auch nach dem Zeitpunkt der Serokonversion, also der Aktivierung des adaptiven Immunsystems, der Stabilisierung der CD4-positiven T-Zellzahlen und der Kontrolle der Virusreplikation, der Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten weiterhin deutlich erhöht war. Damit könnte die relative Erhöhung der NK-Zellen, besonders in der postakuten Phase, durch den Verlust der CD4-positiven T-Zellen begründet sein. Aber eine tatsächliche Zunahme der NK-Zellen wäre genauso möglich. Die Einbeziehung von Absolutzellzahlen oder detaillierte Expressionsanalysen, z.B. von Aktivierungsmarkern wie CD69, wären interessant gewesen. Giavedoni und Kollegen konnten bei infizierten Rhesusaffen eine Tendenz zum Anstieg der NK-Absolutzellzahl im peripheren Blut nachweisen (Giavedoni et al., 2000). Aber es wurden nur wenige Tiere untersucht und sie wiesen auf die starke individuelle Varianz hin. Es gibt mehrere humane Studien die einen Verlust der absoluten NK-Zellzahlen beschreiben, früh nach Infektion. Diesen Verlust führen sie auf verschiedene Subpopulationen zurück (Douglas et al., 2001; Hu et al., 1995; Mansour et al., 1990; Ullum et al., 1995). Von Studien anderer Krankheitsbilder, wie der lymphozytären Choriomeningitis, ist auch eine signifikante Reduktion von NK-Zellen frühzeitig nach Infektion bekannt (Rodas et al., 2009).

In der chronischen Phase kam es in den Versuchen 1 und 2 zu einer relativen Abnahme der NK-Zellen, im Versuch 3 blieben sie jedoch weiterhin erhöht. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchen bestanden dennoch nicht. Tendenziell war in Versuch 3 die Abnahme der Virusbeladung nach Erreichen der Spitzenvirämie geringer und in der postakuten Phase die Viruslast höher als in den beiden anderen Versuchen. In diesem Versuch wurde ein anderes SIV-Isolat (SIV_{mac251}) verwendet, der intravenös verabreicht wurde (Versuch 1 und 2 SIV_{mac239}, tonsillär). Informationen über eine veränderte Aktivierung des angeborenen Immunsystems, speziell der NK-Zellen durch unterschiedliche SIV-Isolate oder Applikationen liegen bisher nicht vor. Die Befunde in den drei beschriebenen Versuchen sprechen demnach gegen die Vermutung von Choi und

Kollegen (Choi et al., 2008), dass die Inokulation über die Schleimhaut (Versuche 1 und 2) zu einer stärkeren Antwort des angeborenen Immunsystems führt. Eine Gegenüberstellung von NK-Zellen und der Virusbeladung wurde ebenfalls durchgeführt, es konnten aber keine signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden. Jason und Kollegen konnten hingegen eine signifikante positive Korrelation zwischen Plasma HIV-RNA Level und NK-Zellen feststellen (Jason et al., 2000).

Die Tiere wurden auch nach ihrem Krankheitsverlauf zusammengefasst analysiert. Tendenziell zeigten LTNPs und Tiere mit einem schnellen Krankheitsverlauf (RPs) einen geringeren NK-Zellanteil an den Lymphozyten als Tiere mit AIDS oder einem asymptomatischem Krankheitsverlauf. Diese Ergebnisse sind nicht signifikant, da die Anzahl der Tiere sehr gering war und die individuellen Unterschiede sehr stark ausgeprägt waren. Giavedoni und Kollegen zeigten hingegen, dass RPs einen Anstieg der NK-Zellen in der postakuten und chronischen Phase aufwiesen (Giavedoni et al., 2000). Es ist zudem aus humanen Studien bekannt, dass die NK-Zellaktivität bei LTNPs erhöht ist (Mendila et al., 1999; O'Connor et al., 2007).

Zusätzlich wurde die Kinetik von drei NK-Zell Subpopulationen für alle Versuche untersucht. Vor der Infektion war der Anteil der CD16/CD159a-doppeltpositiven an den Lymphozyten mit durchschnittlich 4% am höchsten, gefolgt von der Subpopulation der CD16-einzelpositiven mit 2% und den CD159a-einzelpositiven mit <2%. Nach Inokulation der Tiere kam es in den drei Versuchen zu einem signifikanten Anstieg der CD16/CD159a-doppeltpositiven NK-Zellen in der akuten und postakuten Phase. In Versuch 1 und 2 erreichten die Werte am Ende des Beobachtungszeitraums wieder das Vorinfektionsniveau, in Versuch 3 blieben sie weiterhin erhöht. Die Kinetik der CD159a-einzelpositiven NK-Zellen war in Versuch 3 ebenso unterschiedlich. In Versuch 1 und 2 wurde in Woche vier eine signifikante Zunahme mit anschließender Rückkehr auf Vorinfektionsniveau registriert. In Versuch 3 veränderten sich die Zellen kaum. Dem entgegen konnte in diesem Versuch für die CD16-einzelpositiven NK-Zellen am Ende des Beobachtungszeitraums ein signifikanter Anstieg gemessen werden, während in Versuch 1 und 2 diese Zellen zwischen Woche 2 und 8 leicht erhöht waren. Diese unterschiedliche Kinetik könnte erneut durch das andere Virus oder die abweichende Applikationsroute erklärt werden.

Nach HIV-Infektion ist eine Reduktion von CD159a auf NK-Zellen bekannt (Fauci et al., 2005; Iannello et al., 2008). Über die CD16-Expression gibt es widersprüchliche Berichte. So stellten Fauci und Kollegen keine Auswirkungen der Infektion auf diese Subpopulation (Fauci et al., 2005) fest, während Iannello und Kollegen eine Verminderung beschrieben (Iannello et al., 2008). Meine Daten zeigen hingegen eine leichte Erhöhung der CD16-einzelpositiven NK-Zellen und einen deutlichen Anstieg der CD159a-Expression, besonders auf den doppelpositiven NK-Zellen.

Der Anstieg der doppelpositiven NK-Zellen bzw. die allgemeinen Veränderungen der einzelpositiven Populationen stellen ein verändertes Expressionsprofil dar, was auf eine unterschiedliche Funktion dieser Zellen hindeutet. So konnten Choi und Kollegen (Choi et al., 2008) durch Depletion der CD16-positiven NK-Zellen in der frühen Phase nach Infektion zeigen, dass diese nicht an der Kontrolle der Virusreplikation beteiligt waren. Der experimentelle Verlust der NK-Zellen von bis zu 90% im Blut der Affen führte zu keiner signifikant höheren Viruslast, jedoch wurde der Spitzenwert früher erreicht. Andererseits wurde gezeigt, dass die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen mit zunehmender Aktivierung (CD69-Expression) der CD16-positiven NK-Zellen positiv korreliert (Giavedoni et al., 2000). Die CD16-negative NK-Zellpopulation, die einen Großteil der humanen NK-Zellen in den Lymphknoten ausmacht, ist wiederum in der Lage die Virusreplikation durch Chemokinsekretion zu kontrollieren (Fehniger et al., 1998; Oliva et al., 1998). In meiner Arbeit konnte anhand von Korrelationsanalysen (nicht parametrische Spearman-Korrelation mit einem Konfidenzintervall von 95%, Daten nicht gezeigt) aufgezeigt werden, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil der drei Subpopulationen und der Virusreplikation bestand. Von Untersuchungen im humanen System ist bekannt, dass CD16-positive NK-Zellen zytotoxisch sind, CD16-negative NK-Zellen Zytokine freisetzen. Webster und Johnson (Webster and Johnson, 2005) konnten die zytotoxische Funktion auch bei CD16-positiven NK Zellen von Rhesusaffen nachweisen. Diese Zellen tragen eine große Zahl von Immunoglobulin (IG) ähnlichen NK-Rezeptoren. Zudem haben sie etwa zehnmal mehr Perforine und Granzym A als CD16-negative NK-Zellen. Die CD16-negativen NK-Zellen enthalten jedoch viel Interferon γ und TNF α . Sezerniert können diese Interleukine antiviral wirken oder das erworbene Immunsystem beeinflussen (Raulet, 2004). Zur Definition der CD16-negativen NK-Zellen im Rhesusaffen wurde CD159a verwendet. Wenn die so

charakterisierte Population den CD16-negativen NK-Zellen im humanen System gleich ist, müssten die CD159a-einzelpositiven Zellen ebenfalls Zytokine sezernieren. Mavilio, Benjamin und Kollegen (Mavilio et al., 2005) konnten im Rhesusaffentiermodell nachweisen, dass CD159a-positive NK-Zellen von Rhesusaffen nicht zytotoxisch sind und sich so von CD16-einfachpositiven NK-Zellen unterscheiden. Aus den funktionellen Befunden in Bezug auf die Rhesusaffen, lassen sich die CD16/CD159a-doppeltpositiven NK-Zellen keiner eindeutig lytischen oder sekretorischen Funktion zuordnen. In früheren Studien wurde jedoch gezeigt, dass die Expression von CD159a auf CD16 positiven-NK-Zellen die zytotoxische Funktion inhibiert (Mavilio et al., 2005). Somit lässt der stärkste Anstieg nach Infektion in der Subpopulation der doppeltpositiven NK-Zellen eine Inhibition der zytotoxischen NK-Zellfunktion vermuten. Der gleichzeitige Anstieg der CD159a-einzelpositiven, sekretorischen NK-Zellen spricht ebenfalls für einen Funktionswechsel im Infektionsverlauf. Das sich auch der Anteil der CD16-einzelpositiven NK-Zellen geringfügig erhöht, ist auf die allgemeine Aktivierung nach Infektion zurückzuführen.

Im Versuch 3 wurde neben den NK-Zellen auch die Population der $\gamma\delta$ -T-Zellen untersucht. Vor der Infektion exprimierten im Mittel 5% der T-Zellen den $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor. Es konnten weder zwischen den zwei Vorinfektions-Messzeitpunkten der Tiere noch unter den Tieren signifikante Unterschiede festgestellt werden. Interessant ist jedoch, dass das Tier mit dem höchsten Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen (7,4%) den schnellsten Krankheitsverlauf und die höchste Virusbeladung zeigte. Das Tier mit dem niedrigsten Anteil (1,6%) hatte auch zwei Jahre nach Infektion keine AIDS-Symptome. Es konnte aber kein allgemeiner Zusammenhang zwischen dem Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen und der Überlebensdauer nach Infektion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Nach Infektion wurde bei allen Tieren ein Anstieg der $\gamma\delta$ -T-Zellen registriert. Der Spitzenwert wurde erst in der postakuten Phase (Woche 4) mit einer signifikanten Steigerung von 57% erreicht. Im weiteren Beobachtungszeitraum blieben die Werte im Mittel auf diesem Niveau. Die Ergebnisse werden durch andere Studien im Rhesusaffentiermodell bestätigt, welche einen signifikanten Anstieg zwei bis drei Wochen nach Infektion beschrieben (Gan et al., 1995). Widersprüchlich ist nur, dass sie einen signifikanten Verlust bis auf Präinfektionsniveau sechs Wochen nach Infektion feststellten, sowohl prozentual als auch in den Absolutzellzahlen.

Bei HIV-infizierten Patienten wurde in der akuten Phase ein Anstieg der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut beobachtet, prozentual aber auch in der Absolutzellzahl (Poles et al., 2003). Weiterhin blieb dieser Anstieg in der chronischen Phase bestehen. Es wurde aber nachgewiesen, dass diese Erhöhung der $\gamma\delta$ -T-Zellen auf eine selektive Expansion bestimmter Subpopulationen zurückzuführen war (Boullier et al., 1995; Poles et al., 2003). Zusätzlich konnten Jason und Kollegen (Jason et al., 2000) eine positive Korrelation zwischen Plasma HIV-RNA Level und $\gamma\delta$ -T-Zellanteil nachweisen. Im Vergleich zu der NK-Zellstudie stimmen meine Ergebnisse bezüglich der $\gamma\delta$ -T-Zellen mit den publizierten von Jason überein. Die Korrelation der Viruslast mit dem Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen war für die sechs untersuchten Tiere in Woche zwei signifikant.

In dieser Arbeit wurde zusätzlich die Expression von CD8, CD69 und CD159a auf den $\gamma\delta$ -T-Zellen erfasst, um Informationen zu deren individueller Kinetik zu erhalten.

Der Korezeptor CD8 ist in die Interaktion des TCR mit dem MH-I-Komplex involviert. CD8 charakterisiert die $\alpha\beta$ -TCR positiven T-Zellen als zytotoxische T-Lymphozyten (Cole and Gao, 2004). Er wird auch auf einem Teil der $\gamma\delta$ -TCR positiven T-Zellen exprimiert. Im Menschen soll nur eine kleine Subpopulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen CD8 exprimieren (Gottlieb AB et al., 1991). Die vorliegende Arbeit am Rhesusaffen kann das nicht bestätigen. Es ist aus früheren Studien bekannt, dass im Rhesusaffen die Mehrheit der $\gamma\delta$ -T-Zellen CD8-positiv ist und eine SIV-Infektion darauf keinen Einfluss hat (Gan et al., 1995). Im Mittel waren 62% der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei den uninfizierten Tieren CD8-positiv. Nach Infektion konnten keine eindeutigen Veränderungen der CD8-Expression auf $\gamma\delta$ -T-Zellen gefunden werden. Während die Immunantwort der CD8-positiven $\alpha\beta$ -T-Zellen intensiv untersucht wurde, ist die Funktion der CD8-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen noch nicht geklärt. CD8-negative $\gamma\delta$ -T-Zellen scheinen beim Menschen eine regulatorische Funktion auf das Immunsystem auszuüben (Bhagat et al., 2008).

Der frühe Aktivierungsmarker CD69 wurde vor der SIV-Infektion auf der Oberfläche von etwa 24% der $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert. Direkt nach der Infektion stieg die CD69-Expression an und erreichte zehn Tage nach Infektion mit einer Steigerung von 82% den signifikanten Spitzenwert. Im weiteren Zeitverlauf nahm der Anteil der CD69-positiven ab, blieb jedoch deutlich über dem Vorinfektionsniveau. Ab Woche 12 kam es zu einem erneuten Anstieg der CD69-Expression, als Zeichen einer chronischen Aktivierung. Die andauernde erhöhte CD69-Expression ist von verschiedenen

Zellpopulationen bei Mensch und Rhesusaffen bekannt (Barboza et al., 2002; Giavedoni et al., 2000). Auch in anderen Studien wurde der signifikante Anstieg von CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen auf eine vorherige Aktivierung zurückgeführt (Gan et al., 1995).

Es ist bekannt, dass durch Stimulation verschiedener Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) CD69 verstärkt auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird (Funderburg et al., 2008). Mit TLR3 (Wesch et al., 2006) wurde auch ein spezifischer Rezeptor zur Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen nachgewiesen. Obgleich für CD69 noch kein physiologischer Ligand identifiziert wurde, deuten Experimente mit monoklonalen Antikörpern an, dass dieser Rezeptor ein Signal-Transmitter ist (Lopez-Cabrera et al., 1995). Nach Bindung des Liganden an diesen Rezeptor sinkt die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration, es folgt eine vermehrte Zytokin Synthese und Zellproliferation (Cebrian et al., 1988; Nakamura et al., 1989; Santis et al., 1992). Die HIV-Infektion induziert in vitro die Expression von CD69 und damit die Proliferation von T-Zellen (Cambiaggi et al., 1992). Durch Zytokin Sekretion können aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen das adaptive Immunsystem stimulieren und bilden somit eine Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem.

Das dritte untersuchte Oberflächenantigen CD159a ist Teil eines inhibierenden Rezeptors, der auf NK- und T-Zellen entdeckt wurde (Gunturi et al., 2004). Vor der Infektion waren etwa 22% der $\gamma\delta$ -T-Zellen CD159a-positiv. Nach Infektion erhöhte sich dieser Anteil kontinuierlich und erreichte in der chronischen Phase, Woche 12, den signifikanten Spitzenwert mit einer Erhöhung von 62%. Dieser hohe Anteil an CD159a-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen blieb über den weiteren Beobachtungszeitraum erhalten. Vermutlich handelt es sich um sekretorische Zellen, die Zytokine produzieren. Es ist bekannt, dass in Folge einer *Plasmodium falciparum* Infektion die Expression von CD159a auf $\gamma\delta$ -T-Zellen gesteigert war (D'Ombra et al., 2007). $\gamma\delta$ -T-Zellen, die durch einen Erreger aktiviert wurden sezernierten $\text{IFN } \gamma$. Bei ihnen war der hemmende NK-Zell Rezeptor CD159a vermehrt, während die nicht aktivierten Zellen vermehrt den aktivierenden Rezeptor CD158a (KIR2DL1) trugen und kein $\text{IFN } \gamma$ sezernierten.

Die deutlichsten Veränderungen nach Infektion konnten bei den CD69-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen registriert werden. Deshalb erfolgte zusätzlich eine Untersuchung der Mehrfachexpression der anderen Marker auf diesen Zellen. Vor der Infektion waren 16% CD69-einzelpositiv, 73% CD8/CD69-doppeltpositiv und 11% CD69/CD159a-

doppeltpositiv. Die Definition von dreifachpositiven Zellen über computergestützte boolesche Verknüpfungen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Nach Infektion kam es im Vergleich zur allgemeinen Kinetik der $\gamma\delta$ -T-Zellen zu einem überdurchschnittlichen Anstieg der CD69/CD159a-doppelpositiven auf das dreifache der Präinfektionswerte. Auch die CD69-einzelpositiven zeigten einen stärkeren prozentualen Anstieg im Zeitverlauf als die Gesamtheit der $\gamma\delta$ -T-Zellen.

Es ist bekannt, dass CD69 die zytotoxische Aktivität von $\gamma\delta$ -T-Zellen steigert (Moretta et al., 1991). CD159a hingegen ist ein inhibierender Rezeptor, der die Proliferation von $\gamma\delta$ -T-Zellen hemmt (Wesch and Kabelitz, 2003). Es konnte eine vermehrte Expression nach einer HIV-Infektion registriert werden (Wesch and Kabelitz, 2003).

Die Analyse der Präwerte basierend auf der CD8- bzw. CD159a-Expression anstelle von CD69 ergab, dass die Mehrheit der CD8-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen einzelpositiv und die Mehrheit der CD159a-positiven Zellen auch doppeltpositiv für CD8 war. Diese vorrangige Expression von CD8 in allen Subpopulationen könnte auf eine höhere Relevanz der MHC-I-Erkennung auf rhesus $\gamma\delta$ -T-Zellen im Gegensatz zum Menschen hindeuten. CD8-positive $\gamma\delta$ -T-Zellen scheinen zudem in die Interferon γ Sekretion involviert zu sein. Dies wurde bisher nur im Zusammenhang mit allergischem Asthma beschrieben (Isogai et al., 2007).

Die Tiere der drei Versuche hatten einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund. Ihr MHC-Typ wurde durch die Arbeitsgruppe von Dr. Sauermann am Deutschen Primatenzentrum bestimmt. MHC-Klasse-I-Allele spielen eine Schlüsselrolle in der Immunantwort auf intrazelluläre Pathogene (Ouyang et al., 2009/a; Ouyang et al., 2009/b). Sechs Tiere waren MamuA*01- bzw. B*17-positiv. Fünf von ihnen zeigten auch über zwei Jahre nach Infektion keine Anzeichen von AIDS. Damit trugen über 70% der in dieser Arbeit untersuchten Langzeitüberlebenden eine vorteilhafte MHC-Variante. Mühl und Kollegen (Muhl et al., 2002) zeigten, dass MamuA*01-positiv Tiere weniger Virus produzierten und länger überlebten. Die langzeitüberlebenden MamuA*01-positiven Tiere entwickeln eine starke Immunantwort gegen Gag181-189 Epitop (Miller et al., 1991), das von Mamu A*01 präsentiert wird.

Bei drei der sechs Tiere (2139, 2155, 2191) die MamuA*01- bzw. B*17-MHC-positiv waren, sank die Virusbeladung nach Infektion im Blutplasma schneller ab. Ebenso war die Spitzenvirämie bei den Tieren 2139 und 2155 im Vergleich zu den übrigen

Tieren deutlich reduziert. Fünf der sechs Tiere erkrankten im Beobachtungszeitraum von zwei Jahren nicht an AIDS. Im Verlauf der Infektion unterschieden sich bei diesen Tieren die NK- und $\gamma\delta$ -T-Zell-Populationen nicht signifikant von denen der übrigen Tiere.

Bei Tier 12529 des Versuchs 2 wurde nur einmal Virus im Blutplasma detektiert, 225 RNA Kopien pro ml (Woche zwei). Möglicherweise war dieses Tier nicht tonsillär infiziert worden. Dagegen spricht jedoch die sehr starke Erhöhung der NK-Zellen nach der Infektion. In Woche vier wurde der Spitzenwert von 462% erreicht. Dieser Anstieg war auf die Subpopulation der CD16/CD159a-doppeltpositiven NK-Zellen zurückzuführen. Wahrscheinlich führte eine nicht nachweisbare Virusvermehrung zu einer signifikanten Immunreaktion. Eine von der SIV-Infektion unabhängige Aktivierung kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine detaillierte Kinetik von NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen in der frühen Phase nach SIV-Infektion erstellt und mit der Virusbeladung und dem genetischem Hintergrund der Tiere verglichen. Diese Zellen sind besonders interessant weil sie zwischen angeborener und adaptiverer Immunantwort vermitteln. In der akuten Infektionsphase waren die $\gamma\delta$ -T-Zellen signifikant erhöht und aktiviert. Bei diesen wurde eine verstärkte Expression von CD159a gemessen. CD159a ist Teil eines inhibierenden Rezeptors, der wahrscheinlich die zytotoxische Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen beeinflusst. Im Gegensatz zu $\gamma\delta$ -T-Zellen von Menschen tragen die von Rhesusaffen sehr häufig das Oberflächenmolekül CD8. Dieses deutet darauf hin, dass sich die Abwehrmechanismen von Menschen und Rhesusaffen unterscheiden. In der postakuten Phase, ab Woche vier, waren die NK-Zellen signifikant vermehrt. Bei diesen konnte erstmalig nach einer SIV-Infektion eine Zunahme sekretorischer bei gleichzeitiger Abnahme zytotoxischer Zellen beobachtet werden. Die beobachteten Veränderungen der Zellpopulationen und -funktionen sind offensichtlich Ausdruck der Rekrutierung der spezifischen Immunabwehr durch die angeborene. Um die Rolle der NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen für die Immunabwehr für Immundefizienz-Virusinfektion genauer zu beschreiben, wären weitere Funktionsanalysen notwendig. In dieser Arbeit wurden NK- und $\gamma\delta$ -T-Zellen ausschließlich aus peripherem Blut gewonnen. Daher wäre es von Interesse ihr Vorkommen und ihren Aktivierungsgrad in anderen lymphoiden Organen, wie Lymphknoten und dem Schleimhaut-assoziierten-lymphoiden Gewebe zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die HIV-Infektion und AIDS entwickelten sich in den letzten 25 Jahren zur Pandemie. 2006 waren rund 39 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Das aussagekräftigste Modell für die Erkrankung des Menschen ist die experimentelle Infektion von Rhesusaffen mit dem Affen-Immundefizienz-Virus, SIV. In dieser Arbeit wurde zum Studium des Infektionsverlaufs die Kinetik von Lymphozytenpopulationen im Tiermodell untersucht. Dabei konzentrierte man sich auf die Populationen der NK-Zellen und der $\gamma\delta$ -T-Zellen. Beide sind an der zellulären Abwehr früh nach der HIV/SIV-Infektion als Vertreter der angeborenen Immunantwort und als Bindeglied zur erworbenen Immunantwort durch Zytokinsekretion beteiligt.

NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden zusammen mit anderen Leukozytenpopulationen aus peripherem Blut isoliert. Mit Hilfe von monoklonalen Fluoreszenz-markierten Antikörpern erfolgte die Detektion von bis zu zehn Oberflächenmolekülen, welche anschließend mit den Größe- und Granularitäts-Charakteristika im Durchflusszytometer erfasst wurden.

Bei den NK-Zellen wurde die Veränderung der Populationsgröße, aber auch des Differenzierungsgrads einzelner Zellen, durch die Bestimmung der Expression von CD16 und CD159a gemessen. Früh nach Infektion vergrößerte sich die NK-Zellpopulation in Relation zu den Vorinfektionswerten. Der Spitzenwert wurde dabei am Anfang der postakuten Phase erreicht und fiel in den folgenden Wochen teilweise bis unter die Vorinfektionswerte ab. In den untersuchten Subpopulationen zeigten sich die deutlichsten Veränderungen in der CD159a-Expression. Dieses Oberflächenantigen ist als Teil eines Rezeptors an der Inhibition der zytotoxischen NK-Zellaktivität beteiligt.

Die Anzahl der $\gamma\delta$ -TCR-positiven Zellen an den T-Zellen nahm früh nach der Infektion signifikant zu und erreichte ebenfalls zu Beginn der postakuten Phase ein Maximum. Im Beobachtungszeitraum von 24 Wochen blieben die $\gamma\delta$ -T-Zellen in Relation zu den Vorinfektionswerten deutlich erhöht. Die zwei Subpopulationen der CD69- und CD159a-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen zeigten einen überdurchschnittlichen Anstieg, der in der chronischen Phase erhalten blieb.

Die beobachteten Veränderungen dieser Zellpopulationen und -funktionen sind offensichtlich Ausdruck der Rekrutierung der spezifischen Immunabwehr durch die angeborene Immunabwehr in der frühen Phase einer SIV-Infektion.

6 Literaturverzeichnis

- Alter G, Altfeld M (2009): NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection. *J Intern Med* 265: 29-42
- Altfeld M, Rosenberg ES, Shankarappa R, Mukherjee JS, Hecht FM, Eldridge RL, Addo MM, Poon SH, Phillips MN, Robbins GK, Sax PE, Boswell S, Kahn JO, Brander C, Goulder PJ, Levy JA, Mullins JI, Walker BD (2001): Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med* 193: 169-180
- Andoniou CE, Andrews DM, Degli-Esposti MA (2006): Natural killer cells in viral infection: more than just killers. *Immunol Rev* 214: 239-250
- Azzoni L, Pappasavas E, Chehimi J, Kostman JR, Mounzer K, Ondercin J, Perussia B, Montaner LJ (2002): Sustained impairment of IFN-gamma secretion in suppressed HIV-infected patients despite mature NK cell recovery: evidence for a defective reconstitution of innate immunity. *J Immunol* 168: 5764-5770
- Barboza JM, Salmen S, Cova JA, Albarran B, Goncalves L, Borges L, Hernandez M, Berrueta L (2002): Uncoupling activation-induced modulation of CD16 and CD69 in CD56+ cells during AIDS. *Apmis* 110: 415-422
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T (1999): Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727-729
- Becker JC, Vetter CS, Schrama D, Brocker EB, Straten P (2000): Differential expression of CD28 and CD94/NKG2 on T cells with identical TCR beta variable regions in primary melanoma and sentinel lymph node. *Eur J Immunol* 30: 3699-3706
- Bhagat G, Naiyer AJ, Shah JG, Harper J, Jabri B, Wang TC, Green PH, Manavalan JS (2008): Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest* 118: 281-293
- Biron CA, Brossay L (2001): NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol* 13: 458-464
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP (1999): Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17: 189-220

- Borst J, van de Griend RJ, van Oostveen JW, Ang SL, Melief CJ, Seidman JG, Bolhuis RL (1987): A T-cell receptor gamma/CD3 complex found on cloned functional lymphocytes. *Nature* 325: 683-688
- Boullier S, Cochet M, Poccia F, Gougeon ML (1995): CDR3-independent gamma delta V delta 1+ T cell expansion in the peripheral blood of HIV-infected persons. *J Immunol* 154: 1418-1431
- Brandes M, Willimann K, Bioley G, Levy N, Eberl M, Luo M, Tampe R, Levy F, Romero P, Moser B (2009): Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2307-2312
- Burudi EM, Fox HS (2001): Simian immunodeficiency virus model of HIV-induced central nervous system dysfunction. *Adv Virus Res* 56: 435-468
- Cambiaggi C, Scupoli MT, Cestari T, Gerosa F, Carra G, Tridente G, Accolla RS (1992): Constitutive expression of CD69 in interspecies T-cell hybrids and locus assignment to human chromosome 12. *Immunogenetics* 36: 117-120
- Carding SR, Egan PJ (2002): Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2: 336-345
- Cebrian M, Yague E, Rincon M, Lopez-Botet M, de Landazuri MO, Sanchez-Madrid F (1988): Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* 168: 1621-1637
- Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R (2002): Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14338-14343
- Choi EI, Reimann KA, Letvin NL (2008): In vivo natural killer cell depletion during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J Virol* 82: 6758-6761
- Clark DR, de Boer RJ, Wolthers KC, Miedema F (1999): T cell dynamics in HIV-1 infection. *Adv Immunol* 73: 301-327
- Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M (1986): Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324: 691-695
- 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

- Cohen EA, Dehni G, Sodroski JG, Haseltine WA (1990): Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J Virol* 64: 3097-3099
- Cole DK, Gao GF (2004): CD8: adhesion molecule, co-receptor and immunomodulator. *Cell Mol Immunol* 1: 81-88
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001): The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22: 633-640
- Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ (2001): ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14: 123-133
- Crowe SM, Carlin JB, Stewart KI, Lucas CR, Hoy JF (1991): Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr* 4: 770-776
- D'Ombra MC, Hansen DS, Simpson KM, Schofield L (2007): gammadelta-T cells expressing NK receptors predominate over NK cells and conventional T cells in the innate IFN-gamma response to Plasmodium falciparum malaria. *Eur J Immunol* 37: 1864-1873
- 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
- Douglas SD, Durako SJ, Tustin NB, Houser J, Muenz L, Starr SE, Wilson C (2001): Natural killer cell enumeration and function in HIV-infected and high-risk uninfected adolescents. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: 543-552
- Fauci AS, Mavilio D, Kottlil S (2005): NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nat Rev Immunol* 5: 835-843
- Fehniger TA, Herbein G, Yu H, Para MI, Bernstein ZP, O'Brien WA, Caligiuri MA (1998): Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection. *J Immunol* 161: 6433-6438
- Forslund T, Welin MG, Laasonen L, Weber TH, Edgren J (1985): Peripheral blood lymphocyte subsets in radiologists exposed to ionizing radiation. *Acta Radiol Oncol* 24: 415-417
- Fu GF, Hao S, Zhao JL, Xu XQ, Guo HX, Hu HY, Yang HT, Li L, Xu JS, Qiu T, Huan XP, Hou YY (2009): Changes in NK cell counts and receptor

- expressions and emergence of CD3(dim)/CD56+ cells in HIV-1 infected patients in China. *Viral Immunol* 22: 105-116
- Funderburg N, Luciano AA, Jiang W, Rodriguez B, Sieg SF, Lederman MM (2008): Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS One* 3: e1915
- Gan YH, Pauza CD, Malkovsky M (1995): Gamma delta T cells in rhesus monkeys and their response to simian immunodeficiency virus (SIV) infection. *Clin Exp Immunol* 102: 251-255
- Gelderblom H (1991): Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *Aids* 5: 617-637
- Gelderblom H, Reupke H, Winkel T, Kunze R, Pauli G (1987): MHC-antigens: constituents of the envelopes of human and simian immunodeficiency viruses. *Z Naturforsch C* 42: 1328-1334
- Ghafouri M, Amini S, Khalili K, Sawaya BE (2006): HIV-1 associated dementia: symptoms and causes. *Retrovirology* 3: 28
- Giavedoni LD, Velasquillo MC, Parodi LM, Hubbard GB, Hodara VL (2000): Cytokine expression, natural killer cell activation, and phenotypic changes in lymphoid cells from rhesus macaques during acute infection with pathogenic simian immunodeficiency virus. *J Virol* 74: 1648-1657
- Girardi M, Lewis J, Glusac E, Filler RB, Geng L, Hayday AC, Tigelaar RE (2002): Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation. *J Exp Med* 195: 855-867
- Gonzalez S, Lopez-Soto A, Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Lopez-Larrea C (2008): NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol* 29: 397-403
- Gottlieb AB, Krueger JG, Khandke L, Grossman RM, Krane J, Carter DM (1991): Role of T cell activation in the pathogenesis of psoriasis. *Ann N Y Acad Sci* 636: 377-379
- 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
- Goulder PJ, Watkins DI (2004): HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 4: 630-640

- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T (2001): Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2: 255-260
- Gunturi A, Berg RE, Forman J (2004): The role of CD94/NKG2 in innate and adaptive immunity. *Immunol Res* 30: 29-34
- Haas W, Pereira P, Tonegawa S (1993): Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* 11: 637-685
- Haase AT (1986): Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature* 322: 130-136
- Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM (2000): AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287: 607-614
- Hayday AC (2000): [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 18: 975-1026
- Ho AD, Ma DD, Price G, Hunstein W, Hoffbrand AV (1983): Biochemical and immunological differentiation of human thymocytes induced by thymic hormones. *Immunology* 50: 471-476
- Hu PF, Hultin LE, Hultin P, Hausner MA, Hirji K, Jewett A, Bonavida B, Detels R, Giorgi JV (1995): Natural killer cell immunodeficiency in HIV disease is manifest by profoundly decreased numbers of CD16⁺CD56⁺ cells and expansion of a population of CD16^{dim}CD56⁻ cells with low lytic activity. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 10: 331-340
- Iannello A, Debbeche O, Samarani S, Ahmad A (2008): Antiviral NK cell responses in HIV infection: II. viral strategies for evasion and lessons for immunotherapy and vaccination. *J Leukoc Biol* 84: 27-49
- Imami N, Gotch F (2002): Mechanisms of loss of HIV-1-specific T-cell responses. *J HIV Ther* 7: 30-34
- Isogai S, Athviraham A, Fraser RS, Taha R, Hamid Q, Martin JG (2007): Interferon-gamma-dependent inhibition of late allergic airway responses and eosinophilia by CD8⁺ gammadelta T cells. *Immunology* 122: 230-238
- Jahng AW, Maricic I, Pedersen B, Burdin N, Naidenko O, Kronenberg M, Koezuka Y, Kumar V (2001): Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 194: 1789-1799
- Jameson J, Ugarte K, Chen N, Yachi P, Fuchs E, Boismenu R, Havran WL (2002): A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 296: 747-749

- Jameson J, Witherden D, Havran WL (2003): T-cell effector mechanisms: gammadelta and CD1d-restricted subsets. *Curr Opin Immunol* 15: 349-353
- Janis EM, Kaufmann SH, Schwartz RH, Pardoll DM (1989): Activation of gamma delta T cells in the primary immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Science* 244: 713-716
- Jason J, Buchanan I, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Bell M, Green TA, Eick A, Han A, Razsi D, Kazembe PN, Dobbie H, Midathada M, Jarvis WR (2000): Natural T, gammadelta, and NK cells in mycobacterial, Salmonella, and human immunodeficiency virus infections. *J Infect Dis* 182: 474-481
- Joag SV, Adany I, Li Z, Foresman L, Pinson DM, Wang C, Stephens EB, Raghavan R, Narayan O (1997): Animal model of mucosally transmitted human immunodeficiency virus type 1 disease: intravaginal and oral deposition of simian/human immunodeficiency virus in macaques results in systemic infection, elimination of CD4+ T cells, and AIDS. *J Virol* 71: 4016-4023
- Johnson WE, Desrosiers RC (2002): Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu Rev Med* 53: 499-518
- Kaul M, Garden GA, Lipton SA (2001): Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* 410: 988-994
- 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
- Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H (1975/a): "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 5: 117-121
- Kiessling R, Klein E, Wigzell H (1975/b): "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 5: 112-117
- Kosub DA, Durudas A, Lehrman G, Milush JM, Cano CA, Jain MK, Sodora DL (2008/a): Gamma/Delta T cell mRNA levels decrease at mucosal sites and increase at lymphoid sites following an oral SIV infection of macaques. *Curr HIV Res* 6: 520-530
- 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/b): Gamma/Delta T-cell functional responses differ after pathogenic human

immunodeficiency virus and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections. *J Virol* 82: 1155-1165

Kroger CJ, Amoah S, Alexander-Miller MA (2008): Cutting edge: Dendritic cells prime a high avidity CTL response independent of the level of presented antigen. *J Immunol* 180: 5784-5788

Kuwata T, Nishimura Y, Whitted S, Ourmanov I, Brown CR, Dang Q, Buckler-White A, Iyengar R, Brenchley JM, Hirsch VM (2009): Association of progressive CD4(+) T cell decline in SIV infection with the induction of autoreactive antibodies. *PLoS Pathog* 5: e1000372

Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfler S, Ursini F, Ruggeri L, Capanni M, Umansky V, Paschen A, Sucker A, Pende D, Groh V, Biassoni R, Hoglund P, Kato M, Shibuya K, Schadendorf D, Anichini A, Ferrone S, Velardi A, Karre K, Shibuya A, Carbone E, Colucci F (2009): NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 119: 1251-1263

Lanier LL (2003): Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 15: 308-314

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

Legrand F, Driss V, Woerly G, Loiseau S, Hermann E, Fournie JJ, Heliot L, Mattot V, Soncin F, Gougeon ML, Dombrowicz D, Capron M (2009): A functional gammadeltaTCR/CD3 complex distinct from gammadeltaT cells is expressed by human eosinophils. *PLoS One* 4: e5926

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

Letvin NL, Daniel MD, Sehgal PK, Desrosiers RC, Hunt RD, Waldron LM, MacKey JJ, Schmidt DK, Chalifoux LV, King NW (1985): Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science* 230: 71-73

Levero M, Balsano C, Natoli G, Avantaggiati ML, Elfassi E (1990): Hepatitis B virus X protein transactivates the long terminal repeats of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J Virol* 64: 3082-3086

- Ling B, Apetrei C, Pandrea I, Veazey RS, Lackner AA, Gormus B, Marx PA (2004): Classic AIDS in a sooty mangabey after an 18-year natural infection. *J Virol* 78: 8902-8908
- Liu H, Wu X, Newman M, Shaw GM, Hahn BH, Kappes JC (1995): The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J Virol* 69: 7630-7638
- Long EO (1999): Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 17: 875-904
- Lopez-Cabrera M, Munoz E, Blazquez MV, Ursa MA, Santis AG, Sanchez-Madrid F (1995): Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leukocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor-alpha-responsive elements. *J Biol Chem* 270: 21545-21551
- Mansour I, Doinel C, Rouger P (1990): CD16+ NK cells decrease in all stages of HIV infection through a selective depletion of the CD16+CD8+CD3-subset. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6: 1451-1457
- Margolick JB, Donnenberg AD (1997): T-cell homeostasis in HIV-1 infection. *Semin Immunol* 9: 381-388
- Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, Traore I, Hsieh CC, Dia MC, Gueye EH, et al. (1994): Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 265: 1587-1590
- Martini F, Poccia F, Goletti D, Carrara S, Vincenti D, D'Offizi G, Agrati C, Ippolito G, Colizzi V, Pucillo LP, Montesano C (2002): Acute human immunodeficiency virus replication causes a rapid and persistent impairment of Vgamma9Vdelta2 T cells in chronically infected patients undergoing structured treatment interruption. *J Infect Dis* 186: 847-850
- Martini L, Lorenzini RN, Cinotti S, Fini M, Giavaresi G, Giardino R (2000): Evaluation of pain and stress levels of animals used in experimental research. *J Surg Res* 88: 114-119
- 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
- Mavilio D, Benjamin J, Kim D, Lombardo G, Daucher M, Kinter A, Nies-Kraske E, Marcenaro E, Moretta A, Fauci AS (2005): Identification of NKG2A and NKp80 as specific natural killer cell markers in rhesus and pigtailed monkeys. *Blood* 106: 1718-1725

- Meier UC, Owen RE, Taylor E, Worth A, Naoumov N, Willberg C, Tang K, Newton P, Pellegrino P, Williams I, Klenerman P, Borrow P (2005): Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *J Virol* 79: 12365-12374
- Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR, Jr. (1997): Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 126: 946-954
- Mendila M, Heiken H, Becker S, Stoll M, Kemper A, Jacobs R, Schmidt RE (1999): Immunologic and virologic studies in long-term nonprogressors with HIV-1 infection. *Eur J Med Res* 4: 417-424
- Miller MD, Yamamoto H, Hughes AL, Watkins DI, Letvin NL (1991): Definition of an epitope and MHC class I molecule recognized by gag-specific cytotoxic T lymphocytes in SIVmac-infected rhesus monkeys. *J Immunol* 147: 320-329
- Milush JM, Reeves JD, Gordon SN, Zhou D, Muthukumar A, Kosub DA, Chacko E, Giavedoni LD, Ibegbu CC, Cole KS, Miamidian JL, Paiardini M, Barry AP, Staprans SI, Silvestri G, Sodora DL (2007): Virally induced CD4+ T cell depletion is not sufficient to induce AIDS in a natural host. *J Immunol* 179: 3047-3056
- Modlin RL, Sieling PA (2005): Immunology. Now presenting: gammadelta T cells. *Science* 309: 252-253
- Moretta A, Poggi A, Pende D, Tripodi G, Orengo AM, Pella N, Augugliaro R, Bottino C, Ciccone E, Moretta L (1991): CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med* 174: 1393-1398
- Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Cantoni C, Pende D, Mingari MC, Moretta A (2002/a): Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect* 4: 1539-1544
- Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A (2002/b): Surface receptors that regulate the NK cell function: beyond the NK cell scope. *Curr Top Microbiol Immunol* 266: 11-22
- Muhl T, Krawczak M, Ten Haaf P, Hunsmann G, Sauermann U (2002): MHC class I alleles influence set-point viral load and survival time in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Immunol* 169: 3438-3446

- Muller MC, Barre-Sinoussi F (2003): SIVagm: genetic and biological features associated with replication. *Front Biosci* **8**: d1170-1185
- Muller MC, Saksena NK, Nerrienet E, Chappey C, Herve VM, Durand JP, Legal-Campodonico P, Lang MC, Digoutte JP, Georges AJ, et al. (1993): Simian immunodeficiency viruses from central and western Africa: evidence for a new species-specific lentivirus in tantalus monkeys. *J Virol* **67**: 1227-1235
- Murphy FA KD Virus taxonomy, Vol second edition. Springer Verlag, Vienna & New York, 1995
- Nakamura S, Sung SS, Bjorndahl JM, Fu SM (1989): Human T cell activation. IV. T cell activation and proliferation via the early activation antigen EA 1. *J Exp Med* **169**: 677-689
- O'Connor GM, Holmes A, Mulcahy F, Gardiner CM (2007): Natural Killer cells from long-term non-progressor HIV patients are characterized by altered phenotype and function. *Clin Immunol* **124**: 277-283
- Oliva A, Kinter AL, Vaccarezza M, Rubbert A, Catanzaro A, Moir S, Monaco J, Ehler L, Mizell S, Jackson R, Li Y, Romano JW, Fauci AS (1998): Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *J Clin Invest* **102**: 223-231
- Ouyang D, Wang X, He X, Xu L, Shi H, Gao Q, Guo H (2009/a): Construction of soluble Mamu-b*1703, a class I major histocompatibility complex of Chinese rhesus macaques, monomer and tetramer loaded with a simian immunodeficiency virus peptide. *Cell Mol Immunol* **6**: 117-122
- Ouyang D, Xu LH, Shi HJ, Zheng YT, He XH (2009/b): Eight novel MHC class I alleles identified in Chinese-origin rhesus macaques. *Tissue Antigens* **73**: 285-287
- Pereira LE, Johnson RP, Ansari AA (2008): Sooty mangabeys and rhesus macaques exhibit significant divergent natural killer cell responses during both acute and chronic phases of SIV infection. *Cell Immunol* **254**: 10-19
- 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
- Poccia F, Boullier S, Lecoecur H, Cochet M, Poquet Y, Colizzi V, Fournie JJ, Gougeon ML (1996): Peripheral V gamma 9/V delta 2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons. *J Immunol* **157**: 449-461

- Poccia F, Gougeon ML, Bonneville M, Lopez-Botet M, Moretta A, Battistini L, Wallace M, Colizzi V, Malkovsky M (1998): Innate T-cell immunity to nonpeptidic antigens. *Immunol Today* 19: 253-256
- Poles MA, Barsoum S, Yu W, Yu J, Sun P, Daly J, He T, Mehandru S, Talal A, Markowitz M, Hurley A, Ho D, Zhang L (2003): Human immunodeficiency virus type 1 induces persistent changes in mucosal and blood gammadelta T cells despite suppressive therapy. *J Virol* 77: 10456-10467
- Quaranta A, Siniscalchi M, Vallortigara G (2007): Asymmetric tail-wagging responses by dogs to different emotive stimuli. *Curr Biol* 17: R199-201
- Raulet DH (2004): Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 5: 996-1002
- Rodas JD, Cairo C, Djavani M, Zapata JC, Ruckwardt T, Bryant J, Pauza CD, Lukashevich IS, Salvato MS (2009): Circulating natural killer and gammadelta T cells decrease soon after infection of rhesus macaques with lymphocytic choriomeningitis virus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 583-591
- Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD (1997): Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278: 1447-1450
- Santiago ML, Rodenburg CM, Kamenya S, Bibollet-Ruche F, Gao F, Bailes E, Meleth S, Soong SJ, Kilby JM, Moldoveanu Z, Fahey B, Muller MN, Ayoub A, Nerrienet E, McClure HM, Heeney JL, Pusey AE, Collins DA, Boesch C, Wrangham RW, Goodall J, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH (2002): SIVcpz in wild chimpanzees. *Science* 295: 465
- Santis AG, Campanero MR, Alonso JL, Tugores A, Alonso MA, Yague E, Pivel JP, Sanchez-Madrid F (1992): Tumor necrosis factor-alpha production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *Eur J Immunol* 22: 1253-1259
- Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM (1996): Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 2: 338-342
- Sciammas R, Bluestone JA (1999): TCRgammadelta cells and viruses. *Microbes Infect* 1: 203-212
- Shearer GM (1998): HIV-induced immunopathogenesis. *Immunity* 9: 587-593
- Shen R, Kaplan MH (2002): The homeostasis but not the differentiation of T cells is regulated by p27(Kip1). *J Immunol* 169: 714-721

- 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
- Smith SM, Christian D, de Lame V, Shah U, Austin L, Gautam R, Gautam A, Apetrei C, Marx PA (2008): Isolation of a new HIV-2 group in the US. *Retrovirology* 5: 103
- 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
- Tarazona R, Casado JG, Delarosa O, Torre-Cisneros J, Villanueva JL, Sanchez B, Galiani MD, Gonzalez R, Solana R, Pena J (2002): Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naive HIV-1-seropositive individuals. *J Clin Immunol* 22: 176-183
- Taupin JL, Halary F, Dechanet J, Peyrat MA, Ragnaud JM, Bonneville M, Moreau JF (1999): An enlarged subpopulation of T lymphocytes bearing two distinct gammadelta TCR in an HIV-positive patient. *Int Immunol* 11: 545-552
- Temin HM, Mizutani S (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226: 1211-1213
- Thomassen EA, Dekking EH, Thompson A, Franken KL, Sanal O, Abrahams JP, van Tol MJ, Koning F (2006): The impact of single amino acid substitutions in CD3gamma on the CD3epsilon-gamma interaction and T-cell receptor-CD3 complex formation. *Hum Immunol* 67: 579-588
- Trinchieri G (1989): Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47: 187-376
- Tsoukas CM, Bernard NF (1994): Markers predicting progression of human immunodeficiency virus-related disease. *Clin Microbiol Rev* 7: 14-28
- Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL, Parham P (1997): Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7: 753-763
- Ullum H, Gotzsche PC, Victor J, Dickmeiss E, Skinhoj P, Pedersen BK (1995): Defective natural immunity: an early manifestation of human immunodeficiency virus infection. *J Exp Med* 182: 789-799
- UNAIDS/WHO (2006): UNAIDS/WHO AIDS Epidemic Update: December 2006. (www.unaids.org)

- VandeWoude S, Apetrei C (2006): Going wild: lessons from naturally occurring T-lymphotropic lentiviruses. *Clin Microbiol Rev* 19: 728-762
- Wang X, Rasmussen T, Pahar B, Poonia B, Alvarez X, Lackner AA, Veazey RS (2007): Massive infection and loss of CD4+ T cells occurs in the intestinal tract of neonatal rhesus macaques in acute SIV infection. *Blood* 109: 1174-1181
- Weber K, Meyer D, Grosse V, Stoll M, Schmidt RE, Heiken H (2000): Reconstitution of NK cell activity in HIV-1 infected individuals receiving antiretroviral therapy. *Immunobiology* 202: 172-178
- Webster RL, Johnson RP (2005): Delineation of multiple subpopulations of natural killer cells in rhesus macaques. *Immunology* 115: 206-214
- Wertheim JO, Worobey M (2009): Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. *PLoS Comput Biol* 5: e1000377
- Wesch D, Kabelitz D (2003): Differential expression of natural killer receptors on Vdelta1 gammadelta T cells in HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33: 420-425
- Wesch D, Beetz S, Oberg HH, Marget M, Krengel K, Kabelitz D (2006): Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* 176: 1348-1354
- Whetsell M, Mosley RL, Whetsell L, Schaefer FV, Miller KS, Klein JR (1991): Rearrangement and junctional-site sequence analyses of T-cell receptor gamma genes in intestinal intraepithelial lymphocytes from murine athymic chimeras. *Mol Cell Biol* 11: 5902-5909
- 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

Danksagung

Herrn PD Dr. Sieghart Sopper danke ich für die Vergabe des Themas, die gute Betreuung, sein exzellentes Fachwissen und seine Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Hunsmann danke ich für die guten Arbeitsmöglichkeiten in der Abteilung Virologie am Deutschen Primatenzentrum.

Bei Frau Dr. Tanja Bischoff möchte ich mich für die fachkundlichen Hinweise und Anregungen bedanken.

Frau Nicola Schwedhelm danke ich für die Arbeitshinweise im Labor.

Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. Christiane Stahl-Hennig für die Unterstützung am Rhesusaffenmodell.