# Charakterisierung mukosaler Immunantworten im SIV-Makaken-Modell für AIDS

### Dissertation

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

vorgelegt von

Tina Ruth Schultheiß

aus Erlangen

Göttingen, den 26.05.2009

D7

Referent: Prof. Dr. G. Hunsmann Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Fritz

Tag der mündlichen Prüfung: 29./30.06.2009

| Inhalt | sverzeichnis  | 1    |
|--------|---|------|
| 1.     | Einleitung  | 8    |
| 1.1    | Das Humane Immundefizienzvirus (HIV) und das erworbene  |      |
|        | Immunschwächesyndrom (AIDS)   | 8    |
| 1.2    | Das Simiane Immundefizienzvirus (SIV)   | . 10 |
| 1.2.1  | Die Struktur des Simianen Immundefizienzvirus   | . 10 |
| 1.2.2  | Struktur und Aufbau von HIV/SIV   | . 11 |
| 1.2.3  | Genomstruktur   | . 12 |
| 1.2.4  | Verwandtschaft zwischen humanem und simianen Immundefizienzvirus                              | . 12 |
| 1.2.5  | Herkunft von HIV  | . 13 |
| 1.3    | HIV/SIV-Replikationszyklus  | . 13 |
| 1.4    | Pathogenese der HIV/SIV-Infektion   | . 15 |
| 1.5    | Das SIV-Tiermodell zur Erforschung der HIV-Infektion beim Menschen                            | . 18 |
| 1.5.1  | Das SIV-Tiermodell  | . 18 |
| 1.5.2  | Die Bedeutung des SIV-Tiermodells für die Erforschung von HIV                                 | . 19 |
| 1.5.3  | Die Bedeutung des Tiermodells für die Entwicklung eines Mikrobizids                           | . 19 |
| 1.6    | Die Immunantwort gegen HIV/SIV  | . 19 |
| 1.6.1  | Die angeborene Immunantwort   | . 19 |
| 1.6.2  | Die adaptive Immunantwort   | . 20 |
| 1.6.3  | Die Bedeutung von Zytokinen bei der adaptiven Immunantwort                                    | . 21 |
| 1.7    | Die Rolle der mukosalen Gewebe bei der HIV-Infektion  | . 22 |
| 1.7.1  | Mukosale Übertragung von HIV  | . 22 |
| 1.7.2. | Verlust der CD4+ T-Zellen in mukosalen Geweben in der akuten Phase der Infektion              | . 24 |
| 1.7.3  | Schädigung der mukosalen Gewebe durch die HIV/SIV-Infektion und opportunistischer Infektionen | . 24 |
| 1.7.4  | Mukosale Immunantwort   | . 25 |
| 1.8    | Ziele dieser Arbeit   | . 27 |
| 2.     | Material  | . 28 |
| 2.1    | Chemikalien und Reagenzien  | . 28 |
| 2.2    | Enzyme und andere Zusätze für Medien und Inkubationslösungen                                  | . 28 |
| 2.3    | Medien, Inkubationslösungen, Puffer und Dichtegradienten                                      | . 29 |
| 2.4    | Kommerzielle RNA-Isolations- und PCR-Kits   | . 29 |
| 2.5    | Oligonukleotide   | . 30 |

| 2.6    | Fluoreszenzfarbstoffe  | 30 |
|--------|--|----|
| 2.7    | Antikörper (murin/rat anti-human)  | 31 |
| 2.8    | Gag-Tetramere  | 31 |
| 2.9    | Peptide und inaktivierte Viruspartikel   | 32 |
| 2.9.1  | Inaktivierte SIV Viruspartikel (SIV-AT2)   | 32 |
| 2.9.2  | SIV Gag-Protein  | 33 |
| 2.9.3  | Peptide des Hepatitis-C-Virus  | 33 |
| 2.10   | Zellkultur- und andere Verbrauchsmaterialien   | 33 |
| 2.11   | Geräte   | 34 |
| 2.12   | Datenanalyse und Software  | 35 |
| 2.13   | Medikamente und Narkotika  | 35 |
| 2.14   | Verwendetes Material für das Mikrobizid-Experiment (SHIVA)   | 35 |
| 2.14.1 | MC1220   | 35 |
| 2.14.2 | "Einfaches Gel" und "Komplexes Gel"  | 36 |
| 2.14.3 | Humanes Seminalplasma  | 36 |
| 2.15   | Virus-Stämme   | 36 |
| 2.15.1 | SIVmac239 und SIVmac251  | 36 |
| 2.15.2 | RT-SHIV  | 37 |
| 2.16   | Versuchstiere  | 37 |
| 3.     | Methoden   | 43 |
| 3.1    | Narkotisierung der Versuchstiere   | 43 |
| 3.2    | Mikrobizid-Experiment  | 43 |
| 3.3    | Belastungsinfektion der Tiere mit SIV  | 44 |
| 3.4    | Entnahme von Blut und Gewebeproben bei den Versuchstieren  | 44 |
| 3.4.1  | Blutentnahme   | 44 |
| 3.4.2  | Entnahme von Colon- und Duodenumbiopsien   | 44 |
| 3.4.3  | Gewinnung der Bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BAL)   | 45 |
| 3.5    | Erstellung eines Differentialblutbildes  | 45 |
| 3.6    | Euthanasie der Rhesusaffen.  | 45 |
| 3.6.1  | Durchführung und Organentnahme   | 45 |
| 3.6.2  | Entnahme des Nasen-assoziierten lymphatischen Gewebes  | 46 |
| 3.7    | Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut,<br>bronchoalveolärer Lavage und verschiedenen Organen | 46 |
| 3.7.1  | Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut   | 46 |
| 3.7.2  | Isolierung mononukleärer Zellen aus Lymphknoten und Milz   | 46 |
| 3.7.3  | Isolierung von mononukleären Zellen aus Darmbiopsien   | 47 |

| 3.7.4  | Gewinnung von mononukleären Zellen aus der bronchoalveolären Lavage 47   |    |  |  |  |
|--------|--|----|--|--|--|
| 3.7.5  | Isolierung von mononukleären Zellen aus verschiedenen Darmresektaten   | 47 |  |  |  |
| 3.7.6  | Isolierung von mononukleären Zellen aus Vaginalepithel, Cervix-<br>und Uterusgewebe                                | 48 |  |  |  |
| 3.7.7  | Isolierung von mononukleären Zellen aus dem nasen-assoziierten lymphatischen Gewebe (NALT)                         | 48 |  |  |  |
| 3.8    | Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung   | 49 |  |  |  |
| 3.9    | Die polychromatische Durchflusszytometrie  | 49 |  |  |  |
| 3.9.1  | LSRII von BD   | 49 |  |  |  |
| 3.9.2  | FACScalibur von BD   | 50 |  |  |  |
| 3.10   | Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration   | 50 |  |  |  |
| 3.11   | Markierung von Oberflächenantigenen auf mononukleären Zellen   | 50 |  |  |  |
| 3.11.1 | Markierung von Oberflächenantigenen im Vollblut  | 50 |  |  |  |
| 3.11.2 | Markierung von Oberflächenantigenen von isolierten mononukleären Zellen aus verschiedenen Geweben                  | 51 |  |  |  |
| 3.11.3 | Markierung von Oberflächenantigenen mit Biotin-gekoppelten Antikörpern   | 51 |  |  |  |
| 3.11.4 | Markierung von virusspezifischen T-Zellen mit Hilfe der Tetramer-Technik   | 51 |  |  |  |
| 3.12   | Immunologische Methoden zum Nachweis zellulärer und humoraler<br>Immunantworten                                    | 52 |  |  |  |
| 3.12.1 | Intrazelluläre Zytokin-Färbung   | 52 |  |  |  |
| 3.12.2 | Nachweis von IFNγ-sezernierenden Zellen mit dem ELISPOT  | 53 |  |  |  |
| 3.12.3 | Nachweis humoraler Immunantworten im ELISA   | 54 |  |  |  |
| 3.13   | Isolierung von RNA aus Darmbiopsien  | 54 |  |  |  |
| 3.14   | Isolierung von RNA aus BAL-Zellen  | 54 |  |  |  |
| 3.15   | Isolierung von DNA aus PBMC und BAL-Zellen   | 54 |  |  |  |
| 3.16   | Quantifizierung der SIV-Viruslast in Rhesusaffen   | 55 |  |  |  |
| 3.16.1 | Quantifizierung der viralen RNA-Genomkopien mittels qRT-PCR  | 55 |  |  |  |
| 3.16.2 | Quantitative Bestimmung der zellassoziierten proviralen DNA-Genomen mittels qRT-PCR                                | 56 |  |  |  |
| 3.16.3 | Quantitative Bestimmung von infektiösem zellassoziierten Virus mittels Virusreisolierung                           | 57 |  |  |  |
| 3.17   | Statistische Auswertung  | 58 |  |  |  |
| 3.18   | Schutzmaßnahmen  | 58 |  |  |  |
| 3.19   | Antikörper-Kombinationen und Definition verschiedene<br>Lymphozytenpopulationen mit Hilfe der Durchflusszytometrie | 58 |  |  |  |
| 3.19.1 | Antikörper-Kombinationen zur Charakterisierung der Lymphozyten im Mikrobizid-Experiment (SHIVA-1 und SHIVA-2)      | 58 |  |  |  |

| 3.19.2 | Antikörper-Kombination zur Charakterisierung der Lymphozyten von Biopsie- und Sektionsmaterial SIV-infizierter und uninfizierter Rhesusaffen | 59 |
|--------|--|----|
| 3.19.3 | Definition verschiedener Lymphozytenpopulationen   | 59 |
| 3.19.4 | Antikörper-Kombination zur Charakterisierung der Lymphozyten im polyfunktionalen ICS   | 60 |
| 4.     | Ergebnisse   | 61 |
| 4.1    | Isolierung von mononukleären Zellen aus verschiedenen mukosalen<br>Geweben und erzielte Zellausbeuten  | 61 |
| 4.2    | Untersuchung zur Vergleichbarkeit durchflusszytometrischer Analysen von isolierten mononukleären Zellen aus Darmbiopsien und Darmresektaten  | 62 |
| 4.3    | Charakterisierung der physiologischen Lymphozytenzusammen-<br>setzung in Blut und mukosalen Geweben bei nicht infizierten<br>Rhesusaffen     | 64 |
| 4.3.1  | Analyse der relativen Anteile von T- und B-Lymphozyten und der NK-Zellen an der Gesamtlymphozyten-Population                                 | 64 |
| 4.3.2  | Analyse der prozentualen Anteile von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten an den T-Zellen   | 66 |
| 4.3.3  | Analyse der Expression von CCR5 auf den CD4+ T-Zellen  | 67 |
| 4.3.4  | Anteil der CD45RA negativen Gedächtniszellen der CD4+ und CD8+ T-Zellen in Blut und in den mukosalen Geweben                                 | 68 |
| 4.4    | Mikrobizid-Experiment - Teil 1 (SHIVA-1)   | 70 |
| 4.4.1  | Bestimmung der Viruslast nach Belastungsinfektion  | 71 |
| 4.4.2  | Bestimmung der zellassoziierten Viruslast durch Virusreisolierung und Nachweis INFy sezernierender T-Zellen nach SIV-AT2-Stimulation         | 72 |
| 4.5    | Mikrobizid-Experiment - Teil 2 (SHIVA-2)   | 75 |
| 4.5.1  | Bestimmung der Viruslast nach Belastungsinfektion  | 75 |
| 4.5.2  | Bestimmung der zellassoziierten Viruslast durch Virusreisolierung  | 76 |
| 4.6    | Charakterisierung der RT-SHIV-Infektion in Rhesusaffen chinesischer<br>Herkunft unter besonderer Berücksichtigung mukosaler Kompartimente    | 78 |
| 4.6.1  | Durchflusszytometrische Analyse der zirkulierenden CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten während der Infektion   | 78 |
| 4.6.2  | Bestimmung des prozentualen Anteils der CD4+ und der CD8+ T-Lymphozyten in verschiedenen mukosalen Geweben zum Zeitpunkt der Sektion         | 80 |
| 4.7    | Durchflusszytometrische Charakterisierung von systemischen und mukosalen Lymphozytenpopulationen bei LTNPs                                   | 83 |
| 4.7.1  | Unterteilung der Tiergruppen in LTNPs und Progressoren aufgrund der Viruslast nach Belastungsinfektion                                       | 84 |

| 4.7.2  | Bestimmung der CD4+ T-Zellen in Blut und mukosalen Geweben von LTNPs und Progressoren  | 86  |
|--------|--|-----|
| 4.7.3  | Korrelation der prozentualen Anteile der CD4+ T-Zellen mit der RNA-<br>Viruslast im Plasma   | 87  |
| 4.7.4  | Untersuchung der Expression von CCR5 auf den CD4+ T-Zellen in Blut und mukosalen Geweben von LTNPs und Progressoren  | 87  |
| 4.7.5  | Korrelation der prozentualen Anteile der CCR5 exprimierenden CD4+<br>T-Zellen mit der Viruslast  | 88  |
| 4.7.6  | Untersuchung des Aktivierungsstatus von CD4+ T-Zellen in Blut und mukosalen Geweben von LTNPs und Progressoren   | 89  |
| 4.7.7  | Untersuchung des Aktivierungsstatus von CD8+ T-Zellen in Blut und mukosalen Geweben von LTNPs und Progressoren   | 90  |
| 4.7.8  | Korrelation der Viruslast mit der HLA-DR Expression auf T-Zellen   | 91  |
| 4.7.9  | Bestimmung von SIV-spezifischen zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten in Blut und mukosalen Geweben von LTNPs und Progressoren  | 91  |
| 4.7.10 | Zusammenfassung von Ergebnisteil 4.7   | 92  |
| 4.8    | Langzeitanalyse der LTNPs  | 93  |
| 4.8.1  | Mukosale und systemischen Veränderungen der CD4+ T-Zellen und SIV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen  | 93  |
| 4.8.2  | Vergleich von RNA-Viruslast im Plasma und der Anzahl an infektiösen Zellen bei den Tieren 12536 und 2191   | 96  |
| 4.9    | Nachweis von virusspezfischen humoralen und zellulären<br>Immunantworten im Blut von LTNPs und Progressoren  | 97  |
| 4.10   | Nachweis von Zytokin produzierenden T-Lymphozyten mit Hilfe der polyfunktionalen intrazellulären Zytokin-Färbung   | 99  |
| 4.10.1 | Bestimmung von Zytokin produzierenden CD4+ und CD8+ Gedächtniszellen in Blut und BAL von nicht infizierten Tieren nach polyklonaler (unspezifischer) Stimulation | 99  |
| 4.10.2 | Bestimmung von Zytokin produzierenden CD4+ und CD8+ Gedächtniszellen in Blut und BAL von LTNPs und Progressoren nach polyklonaler (unspezifischer) Stimulation   | 100 |
| 4.10.3 | Bestimmung von Zytokin produzierenden CD4+ und CD8+ Gedächtnis T-Lymphozyten in Blut und BAL von LTNPs und Progressoren nach SIV-spezifischer Gag-Stimulation    | 103 |
| 4.10.4 | Vergleich der Zytokin produzierenden CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten in Blut und BAL von LTNPs nach spezifischer Gag-Stimulation                                     | 105 |
| 4.10.5 | Zusammenfassung von Ergebnisteil 4.10  |     |
| 4.11   | Bestimmung der viralen RNA Kopien in Darmbiopsien und BAL-Zellen .   | 107 |
| 4.11.1 | Bestimmung der viralen RNA Kopien in Darmbiopsien und BAL-Zellen   | 107 |
| 4.11.2 | Korrelation der viralen RNA-Kopien im Plasma mit der mukosalen RNA-Viruslast in infizierten Tieren   | 110 |

| 4.11.3  | Berechnung der viralen RNA-Kopien pro Gramm Gewebe bzw.<br>pro 1x10 <sup>6</sup> BAL-Zellen  | . 110                                  |
|---|--|--|
| 4.12  | Bestimmung der zellassoziierten proviralen SIV-Genomkopien in PBMC und BAL-Zellen  | . 111                                  |
| 4.12.1  | Bestimmung der zellassoziierten proviralen SIV-Kopien mittels qRT-PCR  | . 111                                  |
| 4.12.2  | Korrelation der proviralen Viruslast in PBMC und BAL-Zellen mit der Anzahl an viralen RNA-Kopien im Plasma   | 113                                    |
| 4.12.3  | Vergleich der zellassoziierten infektiösen Zellen und der Anzahl proviraler SIV-Genomkopien  | 113                                    |
| 4.13  | Charakterisierung des CD4-Verlustes und der virusspezifischen CTL-Antwort in unterschiedlichen mukosalen Geweben von SIV-infizierten Tieren  | . 115                                  |
| 4.13.1  | Charakterisierung des CD4-Verlustes in verschiedenen mukosalen<br>Geweben von infizierten Tieren im Endstadium der Krankheit und teils<br>AIDS ähnlichen Symptomen   | 115                                    |
| 4.13.2  | Bestimmung der relativen Anteile an virusspezifischen zytotoxischen CD8+ T-Zellen in den verschienen mukosalen Geweben mit Hilfe der Tetramer-Technik  | 118                                    |
| 4.13.3  | Analyse des Zusammenhangs zwischen dem CD4-Verlust und den relativen Anteilen an virusspezifischen zytotoxischen CD8+ T-Zellen   | 119                                    |
| <b>5.</b>   | Diskussion   | . 122                                  |
|   |  |  |
| 5.1   | Starke Unterschiede hinsichtlich der erzielten Zellausbeuten aus verschiedenen Geweben   | . 123                                  |
| <ul><li>5.1</li><li>5.2</li></ul>                           |  |  |
|   | verschiedenen Geweben  | . 124                                  |
| 5.2   | verschiedenen Geweben  Bedingte Vergleichbarkeit durchflusszytometrischer Analysen von Biopsie- und Resektatproben  Physiologische Unterschiede der verschiedenen mukosalen Gewebe   | 124                                    |
| 5.2<br>5.3  | verschiedenen Geweben  Bedingte Vergleichbarkeit durchflusszytometrischer Analysen von Biopsie- und Resektatproben  Physiologische Unterschiede der verschiedenen mukosalen Gewebe hinsichtlich mehrerer Lymphozytenpopulationen  Unterschiedlich ausgeprägter prozentualer Verlust an CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in  | 124<br>125<br>127                      |
| <ul><li>5.2</li><li>5.3</li><li>5.4</li></ul>               | Verschiedenen Geweben  Bedingte Vergleichbarkeit durchflusszytometrischer Analysen von Biopsie- und Resektatproben  Physiologische Unterschiede der verschiedenen mukosalen Gewebe hinsichtlich mehrerer Lymphozytenpopulationen  Unterschiedlich ausgeprägter prozentualer Verlust an CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen mukosalen Geweben  Höchste Reduktion an CD4+ T-Zellen im Jejunum von SIV-infizierten   | 124<br>125<br>127                      |
| <ul><li>5.2</li><li>5.3</li><li>5.4</li><li>5.4.1</li></ul> | Physiologische Unterschiede der verschiedenen mukosalen Gewebe hinsichtlich mehrerer Lymphozytenpopulationen  Unterschiedlich ausgeprägter prozentualer Verlust an CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen mukosalen Geweben  Höchste Reduktion an CD4+ T-Zellen im Jejunum von SIV-infizierten Tieren im Endstadium der Krankheit  Korrelation zwischen dem prozentualen Verlust an CD4+ T-Zellen und der  | 124<br>125<br>127<br>127               |
| <b>5.2 5.3 5.4</b> 5.4.1 5.4.2                              | Bedingte Vergleichbarkeit durchflusszytometrischer Analysen von Biopsie- und Resektatproben  Physiologische Unterschiede der verschiedenen mukosalen Gewebe hinsichtlich mehrerer Lymphozytenpopulationen  Unterschiedlich ausgeprägter prozentualer Verlust an CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen mukosalen Geweben  Höchste Reduktion an CD4+ T-Zellen im Jejunum von SIV-infizierten Tieren im Endstadium der Krankheit  Korrelation zwischen dem prozentualen Verlust an CD4+ T-Zellen und der Menge an CTLs in den vier Darmabschnitten  Starke Depletion an CD4+ T-Zellen im weiblichen Genitaltrakt trotz hoher   | 124<br>125<br>127<br>127<br>128        |
| <b>5.2 5.3 5.4</b> 5.4.1 5.4.2 5.4.3                        | Bedingte Vergleichbarkeit durchflusszytometrischer Analysen von Biopsie- und Resektatproben  Physiologische Unterschiede der verschiedenen mukosalen Gewebe hinsichtlich mehrerer Lymphozytenpopulationen  Unterschiedlich ausgeprägter prozentualer Verlust an CD4+ T-Zellen in verschiedenen mukosalen Geweben  Höchste Reduktion an CD4+ T-Zellen im Jejunum von SIV-infizierten Tieren im Endstadium der Krankheit  Korrelation zwischen dem prozentualen Verlust an CD4+ T-Zellen und der Menge an CTLs in den vier Darmabschnitten  Starke Depletion an CD4+ T-Zellen im weiblichen Genitaltrakt trotz hoher Anteile an CTLs   | 124<br>125<br>127<br>127<br>128<br>129 |
| <b>5.2 5.3 5.4</b> 5.4.1 5.4.2 5.4.3 5.4.4                  | Bedingte Vergleichbarkeit durchflusszytometrischer Analysen von Biopsie- und Resektatproben  Physiologische Unterschiede der verschiedenen mukosalen Gewebe hinsichtlich mehrerer Lymphozytenpopulationen  Unterschiedlich ausgeprägter prozentualer Verlust an CD4+ T-Zellen in verschiedenen mukosalen Geweben  Höchste Reduktion an CD4+ T-Zellen im Jejunum von SIV-infizierten Tieren im Endstadium der Krankheit  Korrelation zwischen dem prozentualen Verlust an CD4+ T-Zellen und der Menge an CTLs in den vier Darmabschnitten  Starke Depletion an CD4+ T-Zellen im weiblichen Genitaltrakt trotz hoher Anteile an CTLs.  Hohe Prozentsätze an CTLs in drei potentiellen Viruseintrittspforten. | 124<br>125<br>127<br>128<br>129<br>130 |

| 5.6.2   | Virusspezifische Immunantwort in den iliakalen Lymphknoten bei geschützten Tieren   | 134 |  |  |  |  |
|---------|---|-----|--|--|--|--|
| 5.6.3   | Apathogen verlaufende RT-SHIV Infektion in Rhesusaffen chinesischer Herkunft mit starker Depletion der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Jejunum                         | 135 |  |  |  |  |
| 5.7     | Virusspezifische T-Zellen und physiologische Anteile an CD4+<br>T-Zellen in mukosalen Geweben von LTNPs   | 138 |  |  |  |  |
| 5.7.1   | Physiologische Anteile der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen, hohe Anteile der virusspezifischen T-Zellen und geringer Immunaktivierung in mukosalen Geweben von LTNPs      | 139 |  |  |  |  |
| 5.7.2   | Niedrigere CCR5 Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Darm von LTNPs  | 141 |  |  |  |  |
| 5.7.3   |   |     |  |  |  |  |
| 5.7.4   | 5.7.4 Langfristige Kontrolle der RNA-Viruslast im Plasma und konstante Anteile an CD4+ T-Zellen in Blut und den mukosalen Organen bei LTNPs                         |     |  |  |  |  |
| 5.7.5   | Generalisierter Verlust an CTLs und der Anstieg der infektiösen Zellen als Charakteristikum für den Verlust des LTNP-Status   | 144 |  |  |  |  |
| 5.8     | Ausgeglichene zelluläre und humorale Gag-spezifische Immunantwort im Blut von LTNPs   | 145 |  |  |  |  |
| 5.9     | Hohes Potential zur Polyfunktionalität bei BAL-Zellen   | 147 |  |  |  |  |
| 5.9.1   | Höhere Anteile polyfunktionaler T-Zellen nach polyklonaler Stimulation im BAL im Vergleich zum Blut von uninfizierten Rhesusaffen                                   | 147 |  |  |  |  |
| 5.9.2   | Höhere Anteile an polyfunktionalen Zytokin sezernierenden T-Zellen im BAL von LTNPs nach polyklonaler und virusspezifische Stimulation im Vergleich zu Progressoren | 147 |  |  |  |  |
| 5.10    | Effektive Kontrolle der mukosalen Viruslast in den LTNPs  | 149 |  |  |  |  |
| 5.11    | Weniger provirale DNA-Genomkopien in PBMC von LTNPs als bei Progressoren  | 151 |  |  |  |  |
| 5.12    | Keine generelle Assoziation zwischen einer hohen RNA- bzw. DNA-Viruslast und der Anzahl an infektiösen Zellen im Blut   | 152 |  |  |  |  |
| 5.13    | Abschließende Bewertung und Ausblick  | 156 |  |  |  |  |
| 6.      | Zusammenfassung   | 157 |  |  |  |  |
| 7.      | Literaturverzeichnis  | 158 |  |  |  |  |
| 8.      | Anhang  | 174 |  |  |  |  |
| Abbild  | ungsverzeichnis   | 174 |  |  |  |  |
| Tabelle | enverzeichnis   | 177 |  |  |  |  |
| Abkürz  | zungsverzeichnis  | 179 |  |  |  |  |
| Danksa  | ngung   | 182 |  |  |  |  |
| Lebens  | lauf  | 183 |  |  |  |  |

## 1. Einleitung

# 1.1 Das Humane Immundefizienzvirus (HIV) und das erworbene Immunschwächesyndrom (AIDS)

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) ist ein komplexes Retrovirus und gehört zur Gattung der Lentiviridiae (Murphy et al., 1990). Lentiviren zeichnen sich durch eine lange Latenzzeit vor dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome aus (lat. *lentus*; Narayan et al., 1989). Sie erhalten ihre Persistenz aufrecht, indem sie ihr virales Genom in die zelluläre DNA des Wirtes integrieren. Außerdem erschweren sie den Aufbau einer wirksamen Immunantwort des Wirtes durch ihre hohe Mutationsrate und Variabilität.

HIV vermehrt sich in humanen T-Zellen (Barré-Sinoussi et al., 1983) und ist für die Entstehung schwerer Immunschwächen beim Menschen bekannt. Die ersten Fälle wurden bei homosexuellen Männern im Jahr 1981 in den USA beschrieben (Gottlieb et al., 1981). Ein Jahr später wurde dieses Krankheitsbild vom "Center of Disease Control" unter dem Namen "Erworbenes Immunschwächesyndrom" (AIDS, engl. acquired immunodeficiency syndrome) bezeichnet. Im Jahr 1983 wurde ein bis dahin unbekanntes Retrovirus in diesem Zusammenhang isoliert und beschrieben (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983). Wenig später wurde dieses Virus als die Ursache für die Entstehung von AIDS erkannt und als humanes Immundefizienzvirus bezeichnet. Für die Entdeckung von HIV erhielten Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi im Jahr 2008 den Nobelpreis.

#### HIV Typ 1 und Typ 2 (HIV-1/2)

Heute sind zwei Stämme von HIV-Isolaten bekannt, die sich in ihrer Genomsequenz deutlich unterscheiden. Die Sequenzhomologie von HIV-1 und 2 beträgt ca. 40% (Alizon, 1987). HIV-1, zu dem auch das erste Isolat von 1983 gehört, ist ein sehr virulentes Virus und für die meisten dokumentierten AIDS-bedingten Todesfälle verantwortlich. HIV-2 wurde erstmals 1986 in West-Afrika isoliert (Clavel et al., 1986) und induziert einen schwächeren Krankheitsverlauf als HIV-1 (Ancelle et al. 1987).

#### Übertragung von HIV

HIV wird hauptsächlich sexuell durch infektiöse Viruspartikel in Samen- und Vaginalflüssigkeit übertragen (Turner, 1989). Des Weiteren kann das Virus vor und während der Geburt (Fowler et al., 1996) oder beim Stillen (Dunn et al., 1992; Van de Perre et al., 1991) von infizierten Frauen auf ihre Kinder übertragen werden (Colebunders et al., 1988). Ein weiterer großer Risikofaktor ist kontaminiertes Blut oder Blutprodukte

(Schreiber et al., 1996), sowie der gemeinsame Gebrauch von Injektionsspritzen bei Drogenabhängigen (Des Jarlais et al., 1985; Moss et al., 1994).

#### Weltweite Verbreitung von HIV

Nach UNAIDS/WHO-Angaben waren 2007 ca. 33 Millionen Menschen HIV infiziert, wobei 67% davon in Ländern Afrikas südlich der Sahara leben. Die geschätzte Zahl der Neuinfektionen lag 2007 bei 2,7 Millionen. Mit zwei Millionen Todesfällen im Jahr 2007 gehört AIDS zu einer der häufigsten Todesursachen weltweit.

#### **Impfstoffentwicklung**

Die Entwicklung eines sicheren und wirksamen Impfstoffes, der vor einer HIV-Infektion schützt, ist seit mehr als 20 Jahren das Hauptziel bei der Bekämpfung der AIDS-Epidemie. Einige charakteristische Eigenschaften von HIV erschweren dies durch die hohe genetische Variabilität, die explosionsartige Vermehrungsrate und massive Infektion des gesamten Organismus. Die damit verbundene Zerstörung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und die daraus resultierende fehlende T-Zellhilfe für B-Zellen und zytotoxische T-Zellen, sowie die Integration des Virus-Genoms in die chromosomale DNA der Wirtszellen macht eine vollständige Eliminierung des Virus durch das Immunsystem des Wirtes nicht möglich. Bis heute ist kein wirksamer Impfstoff gegen HIV in Sicht.

#### **HAART-Therapie**

Seit einigen Jahren steht eine medikamentöse hochwirksame antivirale Therapie (engl. highly active antiretroviral therapy, HAART) zur Verfügung, die an verschiedenen Vorgängen des Replikationszyklus gezielt eingreift und die Virusvermehrung hemmt. Diese Behandlung führt zwar zu einer gesteigerten Lebenserwartung bei HIV-Infizierten (Palella et al., 1998), jedoch ist sie mit einer Reihe von schweren Nebenwirkungen verbunden und eine Heilung der Viruserkrankung ist damit nicht möglich. Da die HAART zudem sehr kostenintensiv ist, steht sie fast ausschließlich HIV-infizierten Menschen in den Industrieländern zur Verfügung.

#### Mikrobizide

Da noch kein wirksamer Impfstoff gegen HIV vorhanden oder in Aussicht ist, wurde der Fokus der Forschung in den letzten Jahren zusätzlich verstärkt auf der Entwicklung von alternativen Präventivmaßnahmen gelegt, die eine sexuelle Übertragung von HIV verhindern können. Die Entwicklung eines potenten Vaginal-Gels mit antiviraler Wirkung (Mikrobizid) stellt gegenwärtig eine der erfolgversprechendsten Strategien dar, um vor allem die Zahl der heterosexuellen HIV-Übertragungen zu reduzieren (Wilson et al. 2008). Derzeit bieten während des Geschlechtsverkehrs nur Kondome einen effektiven Schutz vor einer HIV-Übertragung (Weller et al., 2002). Diese sind jedoch in den Entwicklungsländern nicht sehr weit verbreitet, und die Entscheidung über die Verwendung eines Kondoms liegt vor allem bei dem männlichen Geschlechtspartner. Daher ist es dringend notwendig, Frauen eine Möglichkeit zu bieten, sich unabhängig vom Einverständnis des Partners sowie von sozialen oder kulturellen Zwängen, vor einer HIV-Infektion zu schützen (Moscicki et al., 2008; Brouwers et al., 2008). Weiterhin können auch Prostituierte in Entwicklungs- oder Schwellenländern nicht immer auf die Benutzung von Kondomen bestehen. Für diese wäre ein Mikrobizid ebenfalls eine hilfreiche Alternative, sich unabhängig von der Kenntnis des Sexualpartners gegen HIV zu schützen.

#### 1.2 Das Simiane Immundefizienzvirus (SIV)

#### 1.2.1 Die Struktur des Simianen Immundefizienzvirus

Das simiane Immundefizienzvirus gehört, wie auch HIV, zur Familie der Retroviren und ist aufgrund seiner Morphologie und Genomstruktur den Lentiviren zugeordnet (Daniel et al., 1985; Letvin et al., 1985). Das erste SIV-Isolat stammte aus Rhesus-affen (*Macaca mulatta*), die am New England Primate Research Center (NEPRC) in Gefangenschaft gehalten wurden. Dieses Virus wurde als SIVmac (engl. *simian immuno-deficiency virus of macaques*) bezeichnet (Coffin et al., 1986). Diese Nomenklatur wurde auch für alle weiteren SIV-Varianten der verschiedenen Affenspezies, die in den darauf folgenden Jahren beschrieben wurden, beibehalten. So wurden beispielsweise das SIVagm für die Afrikanische Grüne Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*; engl. *Afrikan Green Monkey*, Kanki et al., 1986), das SIVsmm für Rußmangaben (*Cercocebus atys*; engl. *Sooty Mangabey*, Fultz et al., 1986), das SIVmnd für Mandrills (*Papio sphinx*; engl. *Mandrill*, Tsujimoto et al., 1989) und das SIVcpz für Schimpansen (*Pan troglodytes*; engl. *Chimpanze*, Peeters et al., 1989) beschrieben.

Bis heute wurden etwa 40 afrikanische Primatenspezies identifiziert, die natürliche Wirte von verschiedenen SIV-Stämmen sind (Van de Woude et al., 2006) und trotz hoher Viruslasten im Blut keinerlei Krankheitssymptome entwickeln (Santiago et al., 2002; Hahn et al., 2000). Es wird vermutet, dass sich dieser apathogene Infektionsverlauf durch

Koevolution in den verschieden Spezies über einen sehr langen Zeitraum hinweg entwickelt hat (Chakrabarti et al., 2004, Müller et al., 2003).

Es wurde sehr früh beobachtet, dass eine Übertragung von Lentiviren auf nicht natürliche Wirte eine Erkrankung dieser Primatenspezies auslösen kann. Bei asiatischen Makaken kommt keine natürliche SIV-Infektion vor. Durch eine experimentelle Infektion mit verschiedenen SIV-Stämmen wurde bei diesen Tieren die Entstehung einer AIDS-ähnlichen Erkrankung beschrieben (Letvin et al., 1985).

#### 1.2.2 Struktur und Aufbau von HIV/SIV

SIV/HIV-Partikel haben einen Durchmesser von 100 bis 130 nm und sind von einer Lipidproteinhülle umgeben, in der etwa 10 nm große virale Glykoproteinkomplexe eingebettet sind. Diese bestehen aus einem Transmembranprotein (gp41) und einem externen Anteil (gp130). Da die Viruspartikel durch Knospung an der Zellwand aus der infizierten Zelle gelangen, befinden sich auf der Virushülle auch Proteine der Wirtszelle. Dazu gehören z.B. Haupthistokompatibilitätsantigene der Klasse I und II, β-2-Mikroglobulin, sowie Aktin und Ubiquitin (Gelderblom et al., 1987). Das p17-Matrixprotein kleidet die Innenseite der Virushülle aus und ist über eine N-terminale Myristilierung mit dieser verankert (Göttlinger, et al., 1989). Im Inneren befindet sich ein zylindrisches Kapsid, das aus phosphorylierten p24-Kapsidproteinen besteht und zwei virale RNA-Genome enthält. Diese sind mit den Nukleokapsidproteinen p7 und p9 komplexiert (Sakaguchi et al., 1993). Außerdem befinden sich die viralen Enzyme Integrase, Reverse Transkriptase und Protease im Kapsid.

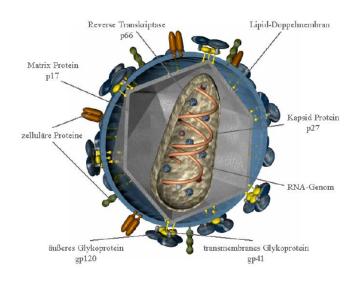


Abb. 1.1 Schematische Darstellung eines HIV-Partikels (von Dr. S. Norley, RKI)

#### 1.2.3 Genomstruktur

Das virale Genom von SIV besteht aus zwei linearen plus-Strang RNA-Molekülen, die jeweils aus ca. 9 kb (=Kilobasenpaaren) bestehen. Die provirale DNA-Form des Genoms wird an beiden Enden von langen terminalen Wiederholungen (LTRs, engl. *long-terminal repeats*) flankiert. Diese haben etwa eine Länge von jeweils 1 kb und werden für die Integration der Virus-DNA ins Wirtsgenom der Zelle benötigt (Leavitt et al., 1992).

Wie bei allen Retroviren enthält das Genom drei große offene Leserahmen: gag, pol und env. Das gag-Gen (engl. group-specific antigen) kodiert für die Strukturproteine des Nukleokapsids, das pol-Gen (engl. polymerase) für die Enzyme der Virusreplikation und Virusintegration und das env-Gen (engl. envelope) kodiert die Proteine der Virushülle. Die Lentiviren besitzen unter den Retroviren eine weitaus komplexere Genomstruktur als Spuma- und Oncoviren (Greene et al., 1991), da sie mit sechs weiteren Genen ausgestattet sind. Diese übernehmen vor allem regulatorische Funktionen in der Frühphase der Infektion und nehmen Einfluss auf die Morphogenese der Viren. Die Gene tat (engl. transactivator of transcription), rev (engl. regulator of expression of virion proteins) und nef (engl. negative effective factor) entstehen durch alternatives Spleißen von verschiedenen Exons (Karn et al., 1991) und haben ihre Aufgabe in der Regulation der Virusreplikation. Für die Morphogenese und den Knospungsprozess werden die Gene vif (engl. virion ineffectivity factor) und vpr, sowie vpu oder vpx (engl. viral protein u/r/x) benötigt.

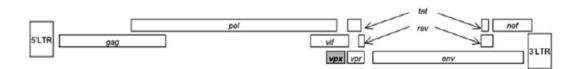


Abb. 1.2 Aufbau des SIVmac-Genoms (nach VandeWoude et al., 2006)

#### 1.2.4 Verwandtschaft zwischen humanem und simianen Immundefizienzvirus

Die humanen Immundefizienzviren (HIV-1 und HIV-2) haben sich durch Zoonose aus verschiedenen simianen Immundefizienzviren entwickelt. Sequenzanalysen zeigen eine nahe Verwandtschaft von HIV-1 mit dem SIV der Schimpansen (SIVcpz) und HIV-2 zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu dem SIV der Rußmangabe (SIVsmm) (siehe Abb.1.3) (Gao et al., 1999; Hahn et al., 2000; Hirsch et al., 1989; Huet et al., 1990).

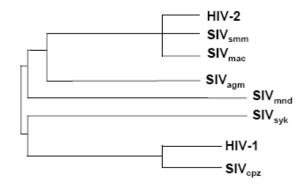


Abb. 1.3 Die Phylogenie der Lentiviren (modifiziert nach Flint SJ, Enquist et al., Principles of Virology)

#### 1.2.5 Herkunft von HIV

Nach vorherrschender Meinung lässt sich die Entstehung von HIV durch die Übertragung simianer Immundefizienzviren auf den Menschen erklären (Gao et al., 1999). Die Jagd auf nicht-humane Primaten und der Verzehr von Fleisch verschiedener Affenspezies ist in Afrika gängige Praxis. Dadurch haben die Menschen häufigen Kontakt (kutan und mukosal) mit infektiösem Tierblut, was somit eine plausible Transmissionsroute darstellt (Gao et al., 1999; Hahn et al., 2000). Das Vorkommen von HIV-2 in der westafrikanischen Bevölkerung deckt sich geographisch mit dem Vorkommen an natürlich SIV-infizierten Rußmangaben, womit sich der Ursprung von HIV-2 klar nachvollziehen lässt (Sharp et al., 1999). Die Herkunft von HIV-1 hingegen ist weitaus schwieriger zu erklären. Es wurden nur wenige SIV-infizierte Schimpansen identifiziert (Peeters et al., 1992) und ihr geographisches Vorkommen stimmt nicht mit den ersten AIDS-Fällen von HIV-1-infizierten Menschen überein (Hrdy et al., 1987). Die direkte Herkunft ist zwar noch nicht vollständig geklärt, eine Transspezies-Transmission durch den direkten Kontakt von Menschen mit verschiedenen SIV infizierten Affenspezies ist jedoch unumstritten (Gao et al., 1999; Hahn et al., 2000).

### 1.3 HIV/SIV-Replikationszyklus

Wie auch HIV repliziert SIV vor allem in CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Montagnier et al., 1984; Letvin et al., 1990). Die Adsorption der Viruspartikel wird hauptsächlich über ihr Oberflächenprotein gp120/130 an das zelluläre CD4-Protein der Zielzelle vermittelt. An diesem Infektionsprozess sind aber auch eine Reihe von Korezeptoren wie z.B. der Chemokinrezeptor CCR5 (CD195) beteiligt (Björndal et al., 1997). Nach der Adsorption kommt es

zu einer Konformationsänderung des viralen Glykoproteinkomplexes, wodurch die Membranfusionsaktivität des aminoterminalen Endes des Transmembranproteins gp41 aktiviert wird. Es lagert sich in die Zellmembran ein und induziert so deren Fusion mit der Virushülle (Freed et al., 1992). Das Viruskapsid gelangt auf diese Weise in das Innere der Zell, e und kurz darauf wird die reverse Transkription eingeleitet. Bei diesem Vorgang wird die einzelsträngige virale RNA durch die viruseigene RNA-anhängige DNA-Polymerase revers transkribiert und ein DNA-RNA-Hybrid entsteht als Zwischenprodukt. Durch die RNaseH-Aktivität der Reversen Transkriptase wird der RNA-Strang abgebaut und an der DNA-Matrize ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert (Davies et al., 1991). Die virale Integrase vermittelt anschließend die Integration der Virus-DNA in die chromosomale DNA der Wirtszelle. Das so genannte Provirus kann in dieser Form mehrere Jahre latent vorliegen (Wang et al., 2000). Die Replikationsaktivität hängt neben der Expression viraler Gene (Laspia et al., 1989) auch von zellulären Transkriptionsfaktoren (Gatignol et al., 1989) und vom Aktivierungszustand der Wirtszelle ab. In der Regel findet nur in einer von zehn Zellen eine aktive Virusvermehrung statt (Greene et al., 1991). Bei der viralen Replikation kommt es als erstes zur Expression der frühen regulatorischen Proteine (tat, ref, nef). Diese Proteine kontrollieren die Synthese der Strukturgene und Enzyme (Jack et al., 1988; Kim et al., 1989). Die Proteine werden in das Zytoplasma transportiert, und das Env-Vorläuferprotein wird durch die zelluläre Furin-Protease in das externe Glykoprotein gp130 und das Transmembranglykoprotein gp41 gespalten und in die Zellmembran eingelagert (Stein et al., 1990). Bei der Abschnürung der neuen Virionen lagern sich zuerst die Gag-Vorläuferproteine an der inneren Zellmembran an und es kommt zur Bildung unreifer ringförmiger Partikel (Gelderblom et al., 1991). Nach Einschluss von zwei viralen RNA-Genomen beginnt der Knospungsvorgang (Gelderblom et al., 1987). Nach Prozessierung der eingeschlossenen Vorläuferproteine und Kondensierung des Kapsids zur konischen Form reifen die Viren zu infektiösen Partikeln heran (Cann et al., 1989).

Eine hohe Mutationsrate und eine extrem hohe Virusproduktion von mehr als 10<sup>9</sup> neuen Viruspartikeln pro Tag verursachen die Entstehung der zahlreichen Virusvarianten (Ho et al., 1995). Die Ursache für die Mutationen ist das Fehlen eines Korrekturleseelements der Reversen Transkriptase, so dass bei der Transkription des RNA-Genoms in DNA hohe Fehlerraten festgestellt wurden (Bebenek et al., 1993).

In Abbildung 1.4. ist der hier beschriebene virale Replikationszyklus schematisch dargestellt.

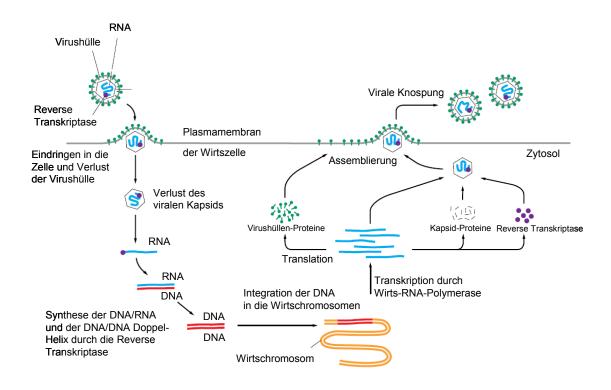


Abb. 1.4 Schematische Darstellung des HIV-Replikationszyklus (modifiziert nach Alberts et al., 1998)

#### 1.4 Pathogenese der HIV/SIV-Infektion

Es werden aus virologischer und immunologischer Sicht drei Hauptphasen der HIV-Infektion unterschieden (Pantaleo et al., 1996); die akute und die chronische Phase, sowie schließlich das AIDS-Stadium.

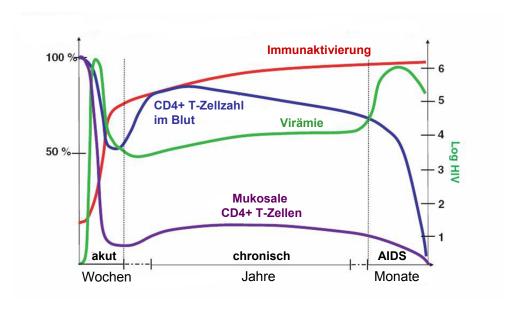


Abb. 1.5 Veränderungen der T-Zellpopulationen, der Virämie und der Immunaktivierung nach SIV-Infektion (modifiziert nach Grossmann et al., 2006)

#### Akute Phase der Infektion

In der akuten Phase der Infektion kommt es durch die massive Virusreplikation zu einer extrem hohen Viruslast von bis zu 10<sup>7</sup> viralen RNA Kopien pro Milliliter Plasma. Diese Phase wird auch als Spitzenvirämie (engl. *peak viremia*) bezeichnet (Pantaleo et al., 1996). Dabei ist ein hoher Prozentsatz an systemischen Zellen Provirus-positiv und im Blut können hohe Mengen an viralem Antigen (p24) nachgewiesen werden (Graziosi et al., 1993). Die Hauptlokalisationen der frühen Infektion sind lymphatische und mukosale Organe (Kilby et al., 2001). Bereits drei Tage nach Infektion kann das Virus in Lymphknoten nachgewiesen werden, da es dort zu einer explosionsartigen Vermehrung kommt. Wenig später findet man das Virus in allen lymphatischen Organen und etwa zwei Wochen nach der Infektion ist auch im Gehirn. Die Höhe der initialen Plasmavirämie hat weder bei der HIV- noch bei der SIV-Infektion einen Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf (Henrard et al., 1995, Watson et al., 1997). In der akuten Phase der HIV-Infektion leiden die meisten Menschen unter Fieber (Barré-Sinoussi et al., 1983), bei über 75% der Patienten findet man eine generalisierte Lymphadenopathie, Schwellung der Tonsillen und eine Splenomegalie (Cooper et al., 1985).

In der akuten Phase kommt es zu einer Umkehrung des CD4/CD8-Verhältnisses im Blut (Cooper et al., 1988; Levy 1985). Dies ist durch die starke Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und das Absterben von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bedingt. Da die hochgradige Virusvermehrung hauptsächlich in aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen stattfindet (Zhang et al., 1999), führt dies zu einem täglich Absterben von 1x10<sup>7</sup> bis 1x10<sup>8</sup> dieser Zielzellen (Carvard et al., 1997).

#### Chronische Phase der Infektion

Nach der akuten Phase wird die systemische Viruslast durch die einsetzende zelluläre und humorale Immunantwort reduziert. Früher wurde dieses Stadium als Latenzphase bezeichnet. Heute ist jedoch klar, dass aus virologischer und immunologischer Sicht nicht von Latenz gesprochen werden kann, da auch in diesem Zeitraum zu jeder Zeit eine aktive Virusreplikation stattfindet. Die Phase der Infektion verläuft klinisch unauffällig und wird daher als chronische Phase bezeichnet. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen Virusneubildung und Viruseliminierung durch das Immunsystem (Coffin, 1996). Die Anteile der CD8<sup>+</sup> T-Zellen gehen in der chronischen Phase auf Vorinfektionswerte zurück oder bleiben leicht erhöht. Die Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen steigen bedingt durch die einsetzende Immunantwort und Reduktion der Virusvermehrung wieder an. Die CD4<sup>+</sup> T-

Zellen erreichen jedoch selten ihre Ausgangswerte (Tindall et al., 1988). Ebenso kann ein hochgradiger Umsatz an systemischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden (Ho et al., 1995). Zu jedem Zeitpunkt der Infektion kann eine Virusvermehrung in den lymphatischen Organen des Körpers nachgewiesen werden (Pantaleo et al., 1993). Die chronische Phase dauert beim Menschen zwischen 8-12 Jahren und bei SIV-infizierten Rhesusaffen 6-24 Monate.

Anhand der Anzahl an zirkulierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen lässt sich etwa 3-5 Jahre nach der Infektion eine Prognose über den weiteren Krankheitsverlauf beim Menschen stellen. Die systemische Viruslast der Patienten ist jedoch schon ein Jahr nach Serokonversion von prognostischer Bedeutung für den weiteren Krankheitsverlauf (Henrard et al., 1995). Bei SIV-infizierten Rhesusaffen kann diese Aussage bereits einige Wochen nach der Infektion getroffen werden (Watson et al., 1997).

#### AIDS-Stadium

Das erworbene Immunschwächesyndrom AIDS ist das letzte Stadium der HIV-Infektion und ist definiert durch das Auftreten von opportunistischen Infektionen und/oder malignen Tumoren (Chaisson et al., 1998). Die häufigsten Sekundärinfektionen beim Menschen sind verschiedene Pneumonien (v.a. *Pneumocystis jiroveci*), Candida Ösophagitis, Kaposi-Sarkom und cerebraler Toxoplasmose, welche die Hauptursachen der Morbidität und Mortalität HIV-infizierten Patienten darstellen (Stein et al., 1992). Der Zusammenbruch des Immunsystems ist durch die massive infektionsbedingte Depletion der CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen zu erklären.

Als klinische Symptome der SIV-Infektion im Endstadium treten bei Rhesusaffen Lymphadenopathien, Splenomegalien, Diarrhoe, Inappetenz, Gewichtsverlust, opportunistische Infektionen, Fieber, Lymphome und neurologische Ausfallerscheinungen auf.

#### Unterschiede im Infektionsverlauf

Beim Infektionsverlauf von HIV-infizierten Menschen konnten bereits wesentliche Unterschiede festgestellt werden. So zeigte die Publikation von Buchbinder et al. im Jahr 1994, dass etwa 70% der HIV-infizierten Patienten der untersuchten Kohorte innerhalb von 14 Jahren nach Serokonversion AIDS-Symptome entwickelten. Eine kleinere Gruppe von Patienten (8%) zeigte im Vergleich dazu einen langsameren Verlust der systemischen

CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit weniger ausgeprägten Veränderungen der immunologischen, hämatologischen und klinischen Parameter.

Der Krankheitsverlauf bei SIV-infizierten Rhesusaffen verläuft im Vergleich deutlich schneller. Auch hier entwickeln etwa 70% der Tiere innerhalb des ersten Jahres nach Infektion AIDS-ähnliche Symptome (Kestler et al., 1990).

SIV-infizierte Tiere bzw. HIV-infizierte Patienten mit schnellerem Krankheitsverlauf werden als Progressoren bezeichnet. Individuen, die teilweise mehrere Jahre darüber hinaus in der Lage sind symptomfrei zu bleiben, werden meist als LTNPs (engl. *long-term non-progressors*) bezeichnet.

# 1.5 Das SIV-Tiermodell zur Erforschung der HIV-Infektion beim Menschen

#### 1.5.1 Das SIV-Tiermodell

Für die Erforschung der Pathogenese und der Impfstoffentwicklung gegen die tödliche HIV-Erkrankung ist ein geeignetes Tiermodell unumgänglich. Eine Übertragung von HIV auf Kleinsäugetiere wie Ratten, Mäuse oder Kaninchen war bisher experimentell nicht möglich (Kulaga et al., 1989). Das humane Immundefizienzvirus lässt sich nur auf Schimpansen (Alter et al., 1984; Nara et al., 1987) und Gibbons (Lusso et al., 1988) übertragen. Beide Tierarten zeigen nach Infektion eine Lymphadenopathie, entwickeln jedoch keine AIDS-ähnlichen Symptome, die für die HIV-Infektion beim Menschen charakteristisch sind (Johnson et al., 1993). Tierexperimentelle Untersuchungen mit diesen Primatenspezies wären sehr aufwendig und teuer. Außerdem ist durch die nahe Verwandtschaft zum Menschen und deren Artenschutz in freier Wildbahn ihre Verwendung in Tierexperimenten ethisch schwer vertretbar.

Sehr bald nach der Isolation des SIVmac aus Rhesusaffen erbrachte der Sequenzvergleich eine hohe Homologie zu HIV (Daniel et al., 1985). Eine experimentelle Infektion von Makaken asiatischer Herkunft induzierte bei diesen Tieren einen Krankheitsverlauf und schließlich AIDS-ähnliche Krankheitssymptome, die der HIV-Infektion beim Menschen sehr nahe kommen (Daniel et al., 1985). Daher ist die SIV-Infektion bei Rhesusaffen das wichtigste Tiermodell für die Untersuchung der AIDS-Erkrankung und die Entwicklung von Impfstoffen gegen HIV (Baroncelli et al., 2008; Fultz, 1993). Ein weiterer Vorteil ist, dass die chronische Phase bei SIV-infizierten Rhesusaffen wesentlich kürzer ist als beim Menschen. So erkranken die Tiere in der Regel innerhalb eines Zeitraumes von zwei Jahren an den Folgen des Immundefizienzsyndroms (Letvin et al., 1990).

#### 1.5.2 Die Bedeutung des SIV-Tiermodells für die Erforschung von HIV

Trotz einer großen Bereitschaft von HIV-infizierten Patienten, sich an grundlagenwissenschaftlichen und klinischen Studien zu beteiligen, ist das Tiermodell für die Forschung essentiell. Es bietet die Möglichkeit, den Zeitpunkt, das Virusisolat und die Infektionsdosis zu bestimmen, sowie insbesondere die frühe Phase der Virusvermehrung und Immunreaktion zu untersuchen. Ein kontrolliertes Eingreifen zu verschiedenen Zeitpunkten der experimentellen Infektion ist für die Analyse verschiedener Theorien unumgänglich. Außerdem besteht im Tiermodell die Möglichkeit, eine Analyse schwer zugänglicher Organe zu jedem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs durchzuführen.

#### 1.5.3 Die Bedeutung des Tiermodells für die Entwicklung eines Mikrobizides

Das Tiermodell bietet auch für die erste präklinische Prüfung eines potentiellen Mikrobizides hinsichtlich des Schutzeffekts vor einer HIV-Infektion viele Vorteile, obwohl eine Imitation der natürlichen sexuellen HIV-Übertragung nur begrenzt möglich ist. Nach der Gelapplikation kann jedoch die Belastungsinfektion mit einer definierten Menge an Viruspartikeln erfolgen. Die nachfolgende Bestimmung der systemischen Viruslast liefert dann bereits essentielle Informationen über die Wirksamkeit des Mikrobizides. In einer klinischen Studie ist eine direkte Überwachung der regelmäßigen Verwendung des Gels nicht möglich. Im Falle einer Infektion ist nicht auszuschließen, dass die Übertragung des Virus über andere Sexualpraktiken erfolgte.

#### 1.6 Die Immunantwort gegen HIV/SIV

#### 1.6.1 Die angeborene Immunantwort

In der frühen Phase der Infektion reagiert das angeborene Immunsystem auf das Eindringen eines Erregers und bietet einen ersten Schutz vor dem Virus durch Erkennung von Strukturmerkmalen (PRR, engl. *pattern recognition receptors*; Ahmed et al., 2005). Die zelluläre Immunantwort bilden dendritische Zellen, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und γδ-T-Zellen. Dendritische Zellen und Makrophagen sezernieren eine Reihe von Zytokinen und präsentieren, in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen, Proteinfragmente des Virus den Zellen des adaptiven Immunsystems. NK-Zellen töten infizierte Zellen durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC, engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity*; Tyler et al., 1990) und bilden, wie auch γδ-T-Zellen, nach Aktivierung

eine Vielzahl von antiviral wirkenden Zytokinen wie z.B. Interferone oder  $\beta$ -Chemokine (Fehniger et al., 1998).

#### 1.6.2 Die adaptive Immunantwort

Das adaptive Immunsystem ist im Gegensatz zur angeborenen Immunität spezifisch gegen Pathogene gerichtet und durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gekennzeichnet. Durch klonale Selektion von Lymphozyten und deren Fähigkeit zur Proliferation kommt es zur Entwicklung von virusspezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und der Sekretion von spezifischen Antikörpern durch B-Zellen.

#### Die zelluläre Immunantwort

Virusspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen proliferieren nach der Infektion und können dadurch einen Anteil von bis zu 50% aller CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten im peripheren Blut bilden. Diese zytotoxischen T-Zellen können virusinfizierte Zellen über ihren T-Zellrezeptor erkennen und über Zell-Zell-Kontakte lysieren (Yang et al., 1997). Durch Depletionsexperimente im Rhesusaffenmodell wurde die Bedeutung dieser Zellpopulation untersucht. Tiere mit depletierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren nicht in der Lage, die Viruslast zu reduzieren und zeigten einen schnellen Krankheitsverlauf (Jin et al., 1999; Schmitz et al., 1999).

Auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen proliferieren nach der Infektion und unterstützen die Bildung von virusspezifischen CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen (Sun et al., 2004). Trotz der Virusreplikation in CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten kommt es kurz nach der Infektion auch zur Bildung virusspezifischer T-Helferzellen (Pitcher et al., 1999).

#### Humorale Immunantwort

Die ersten virusspezifischen Antikörper können etwa zwei bis acht Wochen nach Infektion nachgewiesen werden. Diese sind vor allem gegen die Strukturproteine p24 und p17 sowie das Gag-Vorläuferprotein gerichtet, und erst anschließend werden neutralisierende Antikörper gegen die Hüllproteine gebildet (Reiman et al., 1994; Milush et al., 2007). Jedoch reicht auch die humorale Immunantwort zur vollständigen Eliminierung des Virus nicht aus (Moore et al., 1995; Richman et al., 2003). Außerdem schränken die hohe Variabilität und die starken Glykosylierungen der Virushülle die Effektivität der Antikörper-vermittelten Immunantwort erheblich ein. Studien deuten darauf hin, dass vor allem die Antikörperantwort gegen p24 ein prognostischer Marker für die Krankheitsentstehung ist, wobei die direkte Schutzfunktion unklar ist (Mofenson et al., 1999).

#### 1.6.3 Die Bedeutung von Zytokinen bei der adaptiven Immunantwort

Neben der direkten zytotoxischen Funktion bilden T-Lymphozyten verschiedene Chemokine und Zytokine als Reaktion auf Pathogene. Die wichtigsten Chemokine sind MIP-1α, MIP-1β und RANTES, die sich in zellulären Speicherversikeln befinden und nach Aktivierung der Zellen freigesetzt werden. Die Hauptfunktion dieser Chemokine liegt in der Aktivierung und Anlockung weiterer immunologisch relevanter Zellen zum Ort der Virusinfektion sowie in einer Blockierung von Oberflächenrezeptoren, die für die Infektion notwendig sind (Catalfamo et al., 2004; Margolis et al., 1998; Wagner et al., 1998).

T-Zellen bilden nach Aktivierung neben den Chemokinen auch eine Vielzahl von Zytokinen. In der vorliegenden Arbeit wurde die T-Zell-abhängige Zytokinsekretion von Interferon- $\gamma$  (INF $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL2) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) untersucht, da diese Zytokine eine wesentliche Bedeutung in der HIV/SIV-Infektion haben. Ihre Funktionen sind im Folgenden näher erläutert.

Die Bildung von **IFN**γ wird in vielen Tests als Merkmal für die antigen-spezifische Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen angesehen und ist für die SIV-spezifische Immunabwehr von zentraler Bedeutung. Die IFNγ Sekretion der T-Zellen ist ein erster Schritt zur Bekämpfung der SIV-Infektion. Durch IFNγ wird die Expression von Transkriptionsfaktoren induziert, die ihrerseits die Expression von antiviralen Proteinen wie z.B. die Proteinkinase R regulieren. Außerdem fördert der IFN-γ-Signalweg die Expression des TNF-α-Rezeptors auf der Oberfläche virusinfizierter Zellen, wodurch die Suszeptibilität der Zellen für Apoptosesignale erhöht wird (Schroder et al., 2004). Zusätzlich aktiviert IFN-γ auf Antigen-präsentierenden Zellen die effiziente Prozessierung und Präsentation von viralen Antigenen, wozu die Aktivierung des Immunproteasoms, des TAP-Transporterproteins und die Synthese des MHC-Klasse-I-Moleküls zählen (Tanaka et al., 1998).

Neben IFNγ ist das Zytokin **IL2** für die Bekämpfung einer viralen Infektion bedeutend. IL-2 fördert die Proliferation und Differenzierung von antigen-spezifischen Zellen und wird u.a. von CD8<sup>+</sup> T-Zellen gebildet. Nach Infektion mit HIV konnte gezeigt werden, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Fähigkeit zur IL2-Sekretion verlieren (Iyasere et al., 2003; Younes et al., 2003). Daher wird die IL-2-Sekretion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch als ein prognostischer Marker für den Verlauf einer HIV-Infektion angesehen.

In seiner biologisch aktiven Form liegt der  $TNF\alpha$  als Homotrimer vor und wird von einer Vielzahl von Immunzellen wie z.B. Granulozyten, Monozyten, T- und B-Lymphozyten gebildet. Die Aktivierung des T-Zellrezeptors führt beispielsweise in T-Zellen zu einer

erhöhten Freisetzung von TNFα, welches wiederum die Bildung von Interleukin-12 und 18 induziert. Diese Zytokine stimulieren die Sekretion von IFNγ. TNFα ist auch in der Lage, Virus-infizierte Zellen direkt zu eliminieren, indem es an den TNF-Rezeptor bindet und dadurch die zellulären Apoptose-Signalwege aktiviert (Pfeffer et al., 2003).

Eine exakte Feststellung der Art und Menge der produzierten Zytokinen während einer Infektion ist oft schwierig und zum Teil nicht aussagekräftig. Daher wurde in den letzten Jahren der Fokus auf die Art und Anzahl an Zytokin-produzierenden Zellen gelegt. Dabei wurde festgestellt, dass die Gruppe der Zytokin-sezernierenden Zellen in verschiedenen Virusinfektionen sehr heterogen ist (Harari et al., 2005). Insbesondere die Polyfunktionalität von T-Zellen, d.h. die Fähigkeit mehrere Zytokine gleichzeitig zu produzieren, scheint für den Verlauf einer Infektion von Bedeutung zu sein. Bei HIV-infizierten Patienten mit langsamem Krankheitsverlauf, wurde im Gegensatz zu Patienten mit schnell fortschreitender Krankheit ein erhöhter Anteil von polyfunktionalen T-Zellen nachgewiesen (Makedonas et al., 2006).

#### 1.7 Die Rolle der mukosalen Gewebe bei der HIV-Infektion

Die Analyse der mukosalen Gewebe rückt in der HIV-Forschung aus zwei wesentlichen Gründen immer stärker in den Vordergrund. Zum einen erfolgt die Übertragung von HIV primär über verschiedene Mukosa-assoziierte Gewebe; und zum anderen kommt es durch die massive Virusreplikation im Gastrointestinaltrakt und der Lunge zu schweren Schädigungen des dortigen mukosalen Immunsystems, was eine wesentliche Ursache für die Krankheitsentwicklung darstellt. Die meisten der HIV-infizierten Patienten leiden an gastrointestinalen und pulmonalen Beschwerden. Die teils chronische Diarrhö geht häufig auch mit Gewichtsverlust und Kachexie (Wasting-Syndrom) einher (Chui et al., 1994; Keusch et al., 1993).

#### 1.7.1 Mukosale Übertragung von HIV

Die Hauptübertragung von HIV erfolgt durch heterosexuellen und homosexuellen Geschlechtsverkehr. Bei der heterosexuellen Übertragung von HIV besteht für die Frau ein fünffach höheres Risiko, sich von einem infizierten Mann anzustecken als in umgekehrter Situation (Padian et al., 1991). Ein höheres Infektionsrisiko für Männer liegt allerdings vor, wenn es zu vaginalen Läsionen kommt oder der Geschlechtsverkehr während der Menstruation stattfindet (Padian et al., 1991). Da HIV beim Mann insbesondere über die Vorhaut in den Körper eintritt, haben beschnittene Männer ein geringeres Infektionsrisiko

(Byakika-Tusiime, 2008; Vardi et al, 2007). Die Wahrscheinlichkeit einer Ansteckung mit HIV bei einem einmaligen Sexualkontakt zwischen heterosexuellen Partnern liegt bei 1:500-1000 und bei homosexuellen Kontakten bei etwa 1:10 (De Vincenzi 1994; Royce et al., 1997). In beiden Fällen spielt jedoch die Höhe der Viruslast des infizierten Partners eine entscheidende Rolle. So geht von Personen, die sich in der chronischen Phase der Infektion befinden, ein 100 bis 1000-fach niedrigeres Ansteckungsrisiko aus als von akut infizierten und prä-AIDS-symptomatischen Menschen (Jacquez et al., 1994; Gray et al., 2001).

Bei einer vaginalen Infektion sind Langerhanszellen im Vaginal- und Cervixepithel die ersten Zielzellen der HIV-Replikation (Soto-Ramirez et al., 1996). Jedoch bieten das Plattenephitel sowie das leicht saure Milieu in der Vagina eine natürliche Schutzbarriere vor dem Eindringen vieler Erreger. Die Einnahme von Progesteron, z.B. durch Schwangerschaftsverhütungsmittel, erhöht das Risiko einer HIV-Infektion, da eine Verdünnung des Epithels induziert wird (Marx et al., 1996).

Die Infektion der rektalen Mukosa kann durch die Entstehung von Mikroläsionen erfolgen, jedoch reicht auch der alleinige Kontakt von HIV-infizierten Zellen bzw. infektösen Partikeln der Samenflüssigkeit mit dem Schleimhautepithel des Rektums aus (Bourinbaiar et al., 1991; Pearce-Pratt 1993; Phillips et al., 1992). Das Virus interagiert hier mit Galaktosylzeramiden (Yahi et al., 1992) oder Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche mukosaler Zellen (Hussain et al., 1995). Weiterhin wurde der Viruseintritt ins Darmepithel durch intestinale M-Zellen oder eine epitheliale Zell-Transzytose (Bomsel et al., 1998; Fotopoulos et al., 2002; Hocini et al., 2001) mit anschließender Verbreitung im gesamten Organismus beschrieben.

Eine oral-genitale Übertragung von HIV ist möglich, wurde aber nicht häufig beobachtet (Del Romero 2002). Die orale Infektion ist durch das Fehlen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Mundund Rachenraum sowie das Vorhandensein zahlreicher antiviraler Faktoren im Speichel erschwert (Hussain et al., 1995; Malamud et al., 1997). Jedoch ist eine experimentelle SIV-Infektion von Rhesusaffen durch direkte Applikation von zellfreiem Virus auf die Tonsillen möglich (Stahl-Hennig et al., 1999).

# 1.7.2 Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in mukosalen Geweben in der akuten Phase der Infektion

Bereits drei Tage nach Infektion konnte mittels *in situ* Hybridisierung provirale DNA in Darmbiopsien nachgewiesen werden. Die Anzahl an Proviren steigt bis Tag 7 nach Infektion konstant an und sinkt dann wieder ab (Sasseville et al., 1996). Bei Rhesusaffen konnte gezeigt werden, dass die Virusreplikation in der mukosalen *Lamina propria* unabhängig von der SIV-Eintrittspforte ist (Kaup et al., 2001).

Die hohen Anteile an CD4<sup>+</sup> Gedächnis-T-Zellen im Darm sind ein primäres Ziel der HIV-Replikation, da die meisten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert sind und den Chemokinrezeptor CCR5 exprimieren (Mattapallil et al., 2005; Meng et al., 2001; Smith et al., 2000). Es kommt während dieser akuten Phase der Infektion zu einer massiven Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Darm, die oft als irreversibel beschrieben wurde (Guadalupe et al., 2003; Mehandru et al., 2004; Smith et al., 2000). Auch durch eine HAART kann bei HIV-Patienten keine oder nur eine schwache Repopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Darm induziert werden (Guadalupe et al., 2006).

Bei HIV-infizierten Patienten sowie auch bei SIV-infizierten Rhesusaffen wurde in der Lunge ebenfalls ein drastischer Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Untersuchung der bronchoalveolären Lavage festgestellt (Croix et al., 2002; Semenzato et al., 1995).

Über die Veränderungen der T-Zellpopulationen im weiblichen Genitaltrakt ist sehr viel weniger bekannt. Zwei bis drei Tage nach vaginaler SIV-Infektion von Rheususaffen findet in den meisten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der cervikalen *Lamina propia* eine aktive Virusreplikation statt (Zhang et al., 1999). Eine massive irreversible Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Vagina konnte ebenfalls in der spät-akuten Phase der Infektion im Rhesusaffenmodell nachgewiesen werden (Stevceva et al., 2001; Veazey et al., 2003).

# 1.7.3 Schädigungen der mukosalen Gewebe durch die HIV/SIV-Infektion und opportunistischer Infektionen

Der Magen-Darm-Trakt als größtes lymphatisches Organ (Mowat et al., 1997) ist von entscheidender Bedeutung in der HIV-Infektion und maßgeblich an der Krankheitsentstehung beteiligt (Cui et al., 1994, Veazey et al., 1998). Gastrointestinale Veränderungen, die nicht mit opportunistischen Erregern assoziiert sind, werden als HIV/SIV-Enteropathie bezeichnet und beinhalten Zottenatrophie, Krypthyperplasien und lymphoplasmazelluläre Infiltrate der *Lamina propia* (Kuhn et al., 1997). Diese Krankheitsphänomene werden vor allem auf den Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zurückgeführt. Auch das

Spektrum der opportunistischen Infektionen im Intestinaltrakt und die dafür verantwortlichen bakteriellen, viralen und parasitären Erreger ist weitreichend. Das "Center for Disease Control and Prevention" hat 1987 einige opportunistischen Infektionen als AIDS-Marker definiert. Hierzu zählen *Candida species*, *Cryprosporidium species*, *Mycobakterium avium*, *Mycobakterium intracellulare* Cytomegaloviren, und Herpessimplex-Virus. SIV-infizierte Makaken sind am meisten von opportunistischen Infektionen betroffen, die durch Protozoen ausgelöst werden (Kaup et al., 1994).

Die Lunge ist ebenfalls ein entscheidendes Organ für zahlreiche infektiöse und nicht infektöse Erkrankungen bei der HIV-Infektion. Diese stellen neben den gastrointesinalen Erkrankungen eine weitere Haupttodesursache im AIDS-Stadium dar (Wallace et al., 2003; McKenzie et al., 1991). Die häufigste opportunistischste pulmonare Infektion ist die Pneumonie verursacht durch *Pneumocystis jiroveci*. Der Erreger wurde früher als *Pneumocystis carinii* bezeichnet, jedoch wird die ursprünglich davon abgeleitete Abkürzung PCP heute noch verwendet.

Opportunistische vaginale Infektionen treten weitaus seltener auf und haben eine geringere Bedeutung bei der Entstehung von AIDS-Symptomen. Die mukosale Candidiasis ist jedoch eine verbreitete Komplikation bei HIV-infizierten Frauen, die eine oropharyngyale und vaginale Erkrankung hervorrufen kann (Dahl et al., 1997). Weiterhin treten häufiger vulvo-vaginale HPV-assoziierte Kondylome auf, wodurch es verstärkt zu cervikalen intraepithelialen Neoplasien kommt (Chiasson et al., 1997).

#### 1.7.4 Mukosale Immunantwort

Die mukosale Immunantwort trägt entscheidend zum Schutz des Körpers gegen eine Fülle von potentiell-pathogenen Erregern bei, mit welchen der Darm und die Lunge täglich konfrontiert werden. Der Darm ist das größte lymphatische Organ des Körpers und gliedert sich anatomisch und funktionell in unterschiedliche Teile. Etwa 60% aller körpereigenen T-Zellen befinden sich im Intestinaltrakt (Guy-Grand et al., 1993; Mowat et al., 1997).

Wie bereits in Kapitel 1.7.2. beschrieben, kommt es während der akuten Phase der Infektion zu einem massiven Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge und im gesamten Intestinaltrakt, der auf die hohe Virusreplikation zurückzuführen ist. Über die mukosale SIV/HIV-spezifische Immunantwort in den verschiedenen Stadien der Infektion ist bisher kein sehr detailliertes Wissen vorhanden, vor allem hinsichtlich der Unter-schiede oder Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen mukosalen Geweben.

Bei HIV-Patienten können kaum virusspezifische IgA-Antikörper festgestellt werden und ein Unterschied in der Gesamtmenge an IgA zu nicht infizierten Menschen wurde nicht nachgewiesen. Die meisten Infizierten bildeten jedoch HIV-spezifische IgG-Antikörper (Wright et al., 2002). HIV-spezifische zytotoxische T-Zellen waren in Duodenum- und Colon-Biopsien von chronisch infizierten Patienten vorhanden (Shacklett et al., 2000). Untersuchungen im Rhesusaffenmodell ergaben eine vergleichbare Höhe an SIV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen im Blut und Darm (Schmitz et al., 2001) von infizierten Tieren.

In der Lunge von Rhesusaffen wurde nach der Infektion mit SIV eine erhöhte Produktion von Chemokinen und Zytokinen festgestellt (Caufour et al., 2000; Chéret et al., 1999).

Eine virusspezifische Immunantwort konnte in der Vagina bzw. Cervix von chronisch SIV-infizierten Rhesusaffen festgestellt werden (Stevceva et al., 2004). Des Weiteren gibt es auch Befunde über HIV-spezifische T-Zellen in der Cervix von HIV-seronegativen Prostituierten. Diese Frauen verfügen über eine spezifische lokale und teils auch systemische Immunantwort, die sie trotz häufiger vaginaler Virus-Exposition offensichtlich vor einer Infektion schützt (Kaul et al., 2000).

#### 1.8 Ziele dieser Arbeit

Eine wesentliche Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, die Gewinnung von mononukleären Zellen *ex vivo* und *post mortem* aus verschiedenen mukosalen Organen von Rhesusaffen zu etablieren. Als erstes sollte eine umfangreiche vergleichende Analyse verschiedener mukosaler Kompartimente von nicht infizierten Rhesusaffen hinsichtlich ihrer Lymphozytenzusammensetzung durchgeführt werden. Diese Daten sollten im weiteren Verlauf der Arbeit als Vergleichswerte zu analogen Proben von SIV-infizierten Tieren dienen, um vor allem Einflüsse der Infektion auf verschiedene mukosale Kompartimente zu analysieren.

Eine präklinische Studie zur Entwicklung eines Mikrobizides sollte mit Hilfe des RT-SHIV-Rhesusaffenmodells im Rahmen des EU-Forschungsprojekts SHIVA mit Hilfe verschiedener virologischer und immunologischer Analysen begleitet werden. Gleichzeitig sollte im Rahmen dieses Experiments erstmals die RT-SHIV-Infektion in Rhesusaffen chinesischer Herkunft, vor allem bezüglich der Veränderungen in verschiedenen mukosalen Geweben, charakterisiert werden.

Ein weiteres zentrales Thema dieser Arbeit die Untersuchung von SIV-infizierten Rhesusaffen, die als so genannte Langzeitüberlebenden (LTNPs, engl. *long-term non-progressors*) bezeichnet werden, da deren Besonderheit in der effektiven Kontrolle der Viruslast liegt. Diese Tiere sollten hinsichtlich ihres immunologischen und viralen Status in verschiedenen mukosalen Organen im Vergleich zu SIV-infizierten Rhesusaffen mit fortschreitender Erkrankung bzw. uninfizierten Tieren charakterisiert werden. Im Mittelpunkt stand dabei die Analyse mukosaler Gewebe hinsichtlich verschiedener Lymphozytenpopulationen und virusspezifischer Immunantworten mit Hilfe der polychromatischen Durchflusszytometrie, sowie die Bestimmung der mukosalen Viruslast.

# 2. Material

# 2.1 Chemikalien und Reagenzien

| 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)-                 |                  |
|--|------------------|
| Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)-Flüssigsubstratsystem | . Sigma          |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT)                                 | . MERCK          |
| ß-Mercapthoethanol                                       | . Roth           |
| BD FACS Lysing Solution                                  | . BD Biosciences |
| Ethanol  | . Sigma          |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                      | . Roth           |
| Formaldehyd 37%  | . Sigma          |
| Lymphoprep Ficoll  | . PAA            |
| Natriumazid  | . Sigma          |
| Percoll  | . GE Healthcare  |
| RNA later (RNA Stabilization Reagent)                    | . Qiagen         |
| Saponin  | . Sigma          |
| Staphylococcus-Enterotoxin B (SEB)                       | . Sigma          |
| Steptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat              | . Mabtech        |
| SybrGreen  | . Bioline        |
| Trypanblau   | . Sigma          |
| Tween-20   | . Sigma          |
|  |                  |
| 2.2 Enzyme und andere Zusätze für Medien und Inku        | bationslösungen  |
| Amphotericin B (250µg/ml)                                | PAN Biotech      |
| Bovines Serumalbumin (BSA)                               | . Sigma          |
| Collagenase III  | . Biochrom       |
| DNase I  | . Roche          |
| Fötales Kälberserum (FCS)                                | . PAN Biotech    |
| Penicillin (10000U/ml)                                   | . PAN Biotech    |
| Streptomycin (10mg/ml)                                   | . PAN Biotech    |
| Trypsininhibitor Type I-S                                | . Sigma          |
| Hepes Buffer Solution 1M                                 | . PAN Biotech    |

# 2.3 Medien, Inkubationslösungen, Puffer und Dichtegradienten

Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Medien, Inkubationslösungen, Puffer und Dichtegradienten

| Bezeichnung                      | Zusammensetzung  |  |  |  |
|----------------------------------|--|--|--|--|
| PBS                              | Phosphatgepufferte Salzlösung  |  |  |  |
| 10xPBS                           | Phosphatgepufferte Salzlösung, 10fach konzentriert                   |  |  |  |
| PBS/0,5% BSA-Puffer              | PBS, supplementiert mit 0,5% [w/v] bovinem                           |  |  |  |
|                                  | Serumalbumin (BSA) und 0,03% [w/v] Natriumazid                       |  |  |  |
| PBS/5% FCS-Puffer                | PBS, suplementiert mit 5% [v/v] hitzeinaktiviertem FCS               |  |  |  |
| PBS/0,05% Tween                  | PBS, suplementiert mit 0,05% [w/v] Tween-20                          |  |  |  |
| PBS/0,1% Tween                   | PBS, suplementiert mit 0,1% [w/v] Tween-20                           |  |  |  |
| Kulturmedium                     | Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (PAN                     |  |  |  |
| (RPMI 1640)                      | Biotech GmbH) mit L-Glutamin, supplementiert mit 10%                 |  |  |  |
|                                  | [v/v] hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin (Pan               |  |  |  |
|                                  | Biotech) und 100 μg/ml Streptomycin (PAN Biotech)                    |  |  |  |
| Collagenase-Medium               | Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (PAN                     |  |  |  |
|                                  | Biotech GmbH) mit L-Glutamin, 25mM Hepes, 2,0 g/l                    |  |  |  |
|                                  | NaHCO <sub>2</sub> , supplementiert mit 10% [v/v] hitzeinaktiviertem |  |  |  |
|                                  | FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin,                 |  |  |  |
|                                  | 1250μg Amphotericin B, 0,1% β-Mercaptoethanol, 0,3                   |  |  |  |
|                                  | mg/ml Collagenase III, 0,1 mg/ml DNase I, 0,1 mg/ml                  |  |  |  |
| + > 5 4                          | Trypsininhibitor 1640 (DA)   |  |  |  |
| Collagenase <sup>+</sup> -Medium | Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (PAN                     |  |  |  |
|                                  | Biotech GmbH) mit L-Glutamin, 25mM Hepes, 2,0 g                      |  |  |  |
|                                  | NaHCO <sub>2</sub> , supplementiert mit 10% [v/v] hitzeinaktiviertem |  |  |  |
|                                  | FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 μg/ml Streptomycin,                 |  |  |  |
|                                  | 1250μg Amphotericin B, 0,1% β-Mercaptoethanol, 0,5                   |  |  |  |
| HDGG                             | mg/ml Collagenase III, 0,1 mg/ml DNase I                             |  |  |  |
| HBSS                             | Hank's Buffered Salt Solution mit 0,35 g/l NaHCO <sub>2</sub>        |  |  |  |
| Saponinpuffer                    | PBS/0,5% [v/v] BSA, supplementiert mit 0,5% [w/v]                    |  |  |  |
| 100 MEDTA I ::                   | Saponin  |  |  |  |
| 100mM EDTA-Lösung                | 100mM EDTA gelöst in 100ml destilliertem Wasser, pH 7                |  |  |  |
| EDTA-                            | PBS, supplementiert mit 5% [v/v] hitzeinaktiviertem FCS,             |  |  |  |
| Inkubationslösung                | 100 U/ml Penicillin und 100 μg/ml Streptomycin, 1250μg               |  |  |  |
|                                  | Amphotericin B, 2,5% [v/v] Hepes, 2% [v/v] 100mM                     |  |  |  |
| Dama all is ato:                 | EDTA-Lösung  Persell symplomentiant mit 100/ [sy/szl 10s/PDS]        |  |  |  |
| Percoll isoton                   | Percoll, supplementiert mit 10% [v/v] 10xPBS                         |  |  |  |
| 70%-Percoll                      | Percoll isoton, supplementiert mit 30% PBS                           |  |  |  |
| 30%-Percoll                      | Percoll isoton, supplementiert mit 70% [v/v] HBSS                    |  |  |  |
| Trypanblaulösung                 | 0,2 g [w/v] in 100 ml destilliertem Wasser                           |  |  |  |

### 2.4 Kommerzielle RNA-Isolations- und PCR-Kits

| MagAttract® Virus Mini M48            | Qiagen  |
|---------------------------------------|---------|
| QuantiTect <sup>TM</sup> Probe RT-PCR | Qiagen  |
| Rneasy Plus Mini Kit                  | Qiagen  |
| OJAamp DNA Mini Kit                   | Ouiagen |

### 2.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide und Taqman-Sonden zur Quantifizierung der viralen RNA Genomkopien im Blutplasma, in Darmbiopsien und BAL-Zellen wurden von den Firmen biomers.net GmbH (BRD) und TIB MOLBIOL GmbH (BRD) bezogen (Tab. 2.8). Die Gag-Primer-Sequenzen stammen aus der Publikation von Negri et al., 2004, die GAPDH-Sequenzen von Rodríguez-Jiménez et al., 2003.

Tab. 2.2 Sequenzen der verwendeten Primer und der Taqman-Sonde

| Primer    | Sequenz (5'→3')                    |  |  |  |
|-----------|------------------------------------|--|--|--|
| Gag-for   | ACCCAGTACAACAAATAGGTGGTAACT        |  |  |  |
| Gag-rev   | TCAATTTTACCCAGGCATTTAATGT          |  |  |  |
| Gag-Sonde | FAM-TGTCCACCTGCCATTAAGCCCGAG-TAMRA |  |  |  |
| GAPDH-for | CCTGCACCACCAACTGCTTA               |  |  |  |
| GAPDH-rev | CATGAGTCCTTCCACGATACCA             |  |  |  |

#### 2.6 Fluoreszenzfarbstoffe

Tab. 2.3 Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, ihre Absorptions- und Emissionsmaxima und die zur Messung im Durchflusszytometer verwendeten Filter und Laser

| Fluoreszenzfarbstoff                                      | Laser<br>[nm] | Langpass-<br>filter <sup>1</sup><br>[nm] | Bandpass-<br>filter <sup>2</sup><br>[nm] | Absorptions-<br>maximum<br>[nm] | Emissions-<br>maximum<br>[nm] |
|---|---------------|--|--|---------------------------------|-------------------------------|
| FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)                          | 488           | 505                                      | 530 / 30                                 | 495                             | 519                           |
| PE<br>(Phycoerythrin)                                     | 488           | 550                                      | 575 / 26                                 | 408/565                         | 578                           |
| ECD<br>(Texas Red – PE)                                   | 488           | 600                                      | 610 / 20                                 | 496                             | 615                           |
| PerCP-Cy5.5<br>(Peridinin-Chlorophyll-<br>Proteinkomplex) | 488           | 635                                      | 695 / 20                                 | 482                             | 695                           |
| PE-Cy7  | 488           | 735                                      | 780 / 60                                 | 480/565                         | 785                           |
| APC (Allophycocyanin)                                     | 635           |  | 660 / 20                                 | 650                             | 660                           |
| Alexa700  | 635           | 685                                      | 725 / 50                                 | 696                             | 720                           |
| APC-Cy7   | 635           | 750                                      | 780 / 60                                 | 651                             | 779                           |
| Alexa 405   | 405           |  | 440 / 40                                 | 401                             | 421                           |
| AmCyan  | 405           | 470                                      | 510 / 40                                 | 460                             | 489                           |
| Pacific Orange  | 405           | 470                                      | 550 / 50                                 | 402                             | 551                           |

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Langpassfilter ermöglichen die Transmission von Licht längerer Wellenlänge als auf dem Filter angegeben

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Bandpassfilter ermöglichen die Transmission von Licht der angegebenen Bandbreite um den Mittelwert

#### 2.7 Antikörper (murin/rat anti-human)

Tab. 2.4 Übersicht über die verwendeten murinen Antikörper gerichtet gegen humane Lymphozytenoberflächenproteine

| mAK-Spezifität | Ig-(Sub)<br>Klasse | Klon      | Farbstoff       | Quelle                    |
|----------------|--------------------|-----------|-----------------|---------------------------|
| CD3            | $IgG_1$            | SP34-2    | Alexa Fluor 700 | BD Biosciences Pharmingen |
| CD3            | $IgG_1$            | SP34-2    | APC             | BD Biosciences Pharmingen |
| CD4            | $IgG_1$            | L200      | PerCP-Cy5.5     | BD Biosciences Pharmingen |
| CD4            | $IgG_1$            | SK3       | PerCP-Cy5.5     | BD Biosciences Pharmingen |
| CD4            | $IgG_1$            | L200      | PasificBlue     | BD Biosciences Pharmingen |
| CD8            | $IgG_1$            | SK1       | PE              | BD Biosciences Pharmingen |
| CD8            | $IgG_1$            | SK1       | APC-Cy7         | BD Biosciences Pharmingen |
| CD8            | $IgG_{2a}$         | 3B5       | Pacific Orange  | BD Biosciences Pharmingen |
| CD8            | $IgG_1$            | SK1       | AmCyan          | BD Biosciences Pharmingen |
| CD11a          | $IgG_1$            | HI 111    | APC             | BD Biosciences Pharmingen |
| CD16           | $IgG_1$            | 3G8       | APC-Cy7         | BD Biosciences Pharmingen |
| CD20           | $IgG_1$            | L27       | PE-Cy7          | BD Biosciences Pharmingen |
| CD28           | $IgG_1$            | CD28.2    | -               | BD Biosciences Pharmingen |
| CD29           | $IgG_1$            | 4B4       | FITC            | Beckmann Coulter          |
| CD45           | $IgG_1$            | MB4-6D6   | FITC            | Miltenyi Biotec           |
| CD45RA         | $IgG_1$            | 2H4       | ECD             | Beckmann Coulter          |
| CD195 (CCR5)   | $IgG_{2a}$         | 3A9       | PE              | BD Biosciences Pharmingen |
| CD195 (CCR5)   | $IgG_{2a}$         | 3A9       | APC             | BD Biosciences Pharmingen |
| HLA-DR         | $IgG_{2a}$         | L243      | APC-Cy7         | BD Biosciences Pharmingen |
| NKG-2a         | $IgG_{2b}$         | Z 199     | ECD             | Beckmann Coulter          |
| IFNγ           | $IgG_1$            | B27       | APC             | BD Biosciences Pharmingen |
| TNFα           | $IgG_1$            | MAb11     | PE              | BD Biosciences Pharmingen |
| IL-2           | $IgG_{2a}$         | MQ1-17H12 | FITC            | BD Biosciences Pharmingen |

#### 2.8 Gag-Tetramere

Die Gag-Tetramere sind rekombinant hergestellte MHC-Klasse-I-Moleküle, die mit Peptiden komplexiert sind. Sie wurden über eine Biotinylierung an Fluoreszenz-markierte Streptavidin-Moleküle gebunden. Durch die vier Bindungsstellen am Streptavidin für Biotin entstehen tetramere Komplexe. Diese simulieren eine Antigen-präsentierende Zelle/infizierte Zelle und können zur Detektion virusspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Rhesusaffen mit dem MHC-Klasse-I-Allel *MamuA\*01* eingesetzt werden. Wenn diese Komplexe direkt an den T-Zell-Rezeptor (TCR, engl. *T-cell receptor*) CD8<sup>+</sup> Zellen mit der entsprechenden Spezifität gebunden haben, markieren sie diese dadurch mit einem Fluorochrom und können so durchflusszytometrisch bestimmt werden.

Die Tetramere, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind mit der CM9-Peptidsequenz (Gag181-189, CTPYDINQM) komplexiert und mit dem Fluorochrom PE versehen. Sie binden nur an die CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die genau dieses Peptid mit ihrem T-Zellrezeptor

erkennen und sind spezifisch für Affen mit dem MHC-Klasse-I-Allel *MamuA\*01*. Die Tetramer-Technik ist derzeit die einzige Methode zum quantitativen Nachweis von virusspezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* während der Infektion oder Immunisierung. Die lytische Aktivität, sowie die Interferon-γ Sekretion nach antigener Stimulation wurde bei diesen zytotoxischen T-Zellen bereits beschrieben (Allen et al., 2000; Letvin et al., 1999).

Die CM9-Tetramere wurden von der Firma Beckman Coulter bezogen.

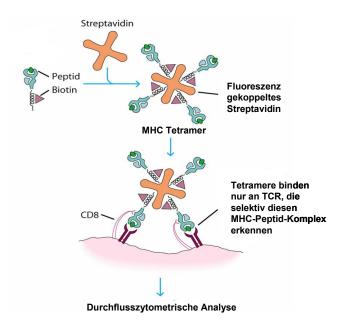


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Tetramer-Technik

#### 2.9 Peptide und inaktivierte Viruspartikel

Zur Detektion virusspezifischer Immunantworten in verschiedenen experimentellen immunologischen Tests wurden virale Peptidsequenzen oder inaktivierte Viruspartikel als Stimulationsantigen verwendet.

#### 2.9.1 Inaktivierte SIV Viruspartikel (SIV-AT2)

Das Stimulationsantigen SIV-AT2 ist ein mit 1 mM Aldrithiol-2 inaktiviertes und über Säulenchromatographie gereinigtes SIVmac239/SUPT-1-CCR5 CL30-Virus (Lifson et al., 2004). SIV-AT2 wurde von Dr. Jeffrey Lifson vom AIDS Vaccine Program, National Cancer Institute (Frederick, USA) bezogen.

#### 2.9.2 SIV Gag-Protein

Der Peptidpool für das SIV Gag-Protein besteht aus einem Set von sechzehn 15mer-Peptiden (Tab. 2.5). Die SIV Gag-Peptide mit einer Reinheit von mehr als 80% wurden vom National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, Großbritannien) bezogen.

Tab. 2.5 Zuordnungsnummer und Peptidsequenzen der 16 Peptide des Gag-Peptidpools

| Zuordnungs-Nr. | Peptidsequenz   | Zuordnungs-Nr. | Peptidsequenz   |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| EVA7066.1      | WAANELDRFGLAESL | EVA7066.9      | LQHPQPAPQQGQLRE |
| EVA7066.2      | CQKILSVLAPLVPTG | EVA7066.10     | DEQIQWMYRQQNPIP |
| EVA7066.3      | LAPLVPTGSENLKSL | EVA7066.11     | YRQQNPIPVGNIYRR |
| EVA7066.4      | GSENLKSLYNTVCVI | EVA7066.12     | PVGNIYRRWIQLGLQ |
| EVA7066.5      | NYPVQQIGGNYVHLP | EVA7066.13     | LQKCVRMYNPTNILD |
| EVA7066.6      | PLSPRTLNAWVKLIE | EVA7066.14     | EPFQSYVDRFYKSLR |
| EVA7066.7      | EVVPGFQALSEGCTP | EVA7066.15     | GPGQKARLMAEALKE |
| EVA7066.8      | ALSEGCTPYDINQML | EVA7066.16     | CPDRQAGFLGLGPWG |

#### 2.9.3 Peptide des Hepatitis-C-Virus

Als Kontrolle wurden Peptide des Hepatitis-C-Virus (HCV) verwendet (Tab. 2.7). Der HCV-Peptidpool gHCV besteht aus einem Gemisch von sechs 20mer-Peptiden, die von der Firma GenScript (USA) bezogen wurden.

Tab. 2.6 Beschreibung des HCV-Peptidpools mit den entsprechenden Peptidsequenzen und dem Reinheitsgrad

| Zuordnungs-Nr. | Peptidsequenz        | Reinheit |
|----------------|----------------------|----------|
| gHCV1138       | VIPVRRRGDSRGSLPCPRPC | 83,5%    |
| gHCV1198       | ESMETTMRSPVFTDNSTPPA | 85,0%    |
| gHCV1208       | VFTDNSTPPAVPQTFQVAHL | 98,4%    |
| gHCV1458       | TQTVDFSLDPTFTIDTTTVP | 77,7%    |
| gHCV1528       | ELTPAETSVRLRAYLNTPGL | 75,9%    |
| gHCV1538       | LRAYLNTPGLPVCQDHLEFW | 71,5%    |

#### 2.10 Zellkultur- und andere Verbrauchsmaterialien

| BD Falcon <sup>TM</sup> 5n | BD Biosciences |                |
|----------------------------|----------------|----------------|
| BD Vacutainer              | EDTA           | BD Biosciences |
|                            | Heparin        | BD Biosciences |
|                            | Zitrat         | BD Biosciences |
| Glasfläschchen             |                | Neolab         |
| Leucosep-Röhrc             | hen            | Greiner        |

| 96-well-Polyvinyldifluorid (PVDF)-Platte  | Millipore                            |  |
|---|--------------------------------------|--|
| 24-well Platte                            | Costar                               |  |
| Objektträger (geschliffen Mattrand)       | Menzel                               |  |
| Reaktionsgefäße 0,5ml und 1,5ml           | Greiner                              |  |
| 50 ml Zentrifugationsröhrchen             | Greiner                              |  |
| 15 ml Zentrifugationsröhrchen             | Greiner                              |  |
| Skalpell                                  | Aesculap                             |  |
| Stainless Steel Beads (5mm)               | Qiagen                               |  |
| Spherotec Beads                           | Spherotec                            |  |
| Zellkultur-Flaschen                       | Sarstedt                             |  |
| Zellsiebe (100μm, 70μm, 40μm)             | BD Falcon                            |  |
|   |                                      |  |
| 2.11 Geräte                               |                                      |  |
| Bioreader 3000                            | Biosys GmbH                          |  |
| Biopsiezange, 2,2mm.                      | Fujinon                              |  |
| Absaugpumpe                               | Eppendorf                            |  |
| Bronchoskop                               | R. Wolf, Flexible Fiberskope 7325.07 |  |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator                | Heraeus                              |  |
| Durchflusszytometer                       | BD LSRII und FACScalibur,            |  |
|   | BD Biosciences                       |  |
| ELISPOT-Reader                            | Bioreader 3000, Biosys GmbH          |  |
| ELISA-Reader                              | Tecan Sunrise                        |  |
| Endoskop                                  | Fujinon EG 250 WR5                   |  |
| Innova 4230 Refrigerated Incubator Shaker | New Brunswick Scienetific            |  |
| Inversmikroskop                           |                                      |  |
| Kühlschrank                               | Comfort LIEBHERR                     |  |
| Laminarbank                               | HeraSafe Heraeus                     |  |
| NanoDrop                                  | ND-1000, PEQLAB Biotechnologie       |  |
| PCR-Geräte                                | 7500 Real-time PCR System,           |  |
|   | Applied Biosystems                   |  |
| pH-Meter                                  | HI110, HANNAinstruments              |  |
| Pipetten                                  | Eppendorf Reference, Eppendorf AG    |  |
| Tissue Lyser                              | Qiagen                               |  |
| Waagen                                    | Sartorius AG                         |  |

| Wasserbad             | GFL (BRD)                          |
|-----------------------|------------------------------------|
| Zählkammer (Neubauer) | neoLAB Migge Laborbedarf           |
| Zentrifugen           | 5415C, 5810, Eppendorf AG          |
|                       | Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments |

### 2.12 Datenanalyse und Software

Zur Analyse und Bearbeitung der Daten wurden neben den Microsoft Office Programmen folgende Programme verwendet:

### 2.13 Medikamente und Narkotika

| Atropin sulfuricum solutum 1%                      | .Eifelfango |
|--|-------------|
| Buscopan (20 mg Butylscopolamin/ml)                | .Boehringer |
| Depo-Clinovir (150 mg Medroxyprogesteronacetat/ml) | .Pfizer     |
| Dulcolax (7,5 mg Natriumpicosulfat-Monohydrat/ml)  | .Boehringer |
| Ketavet (115,34 mg Ketaminhydrochlorid/ml)         | .Pfizer     |
| Narcoren (160 mg Pentobarbital-Natrium/ml)         | .Merial     |
| Rompun (58,3 mg Xylazinhydrochlorid/ml)            | .Bayer      |

GM II (=Göttinger Mischung II): 1ml besteht aus 0,5 ml Ketavet, 0,2 ml Rompun, 0,01ml Atropin sulfuricum solutum (1%ig) und 0,29 ml Aqua ad injectionem

### 2.14 Verwendetes Material für das Mikrobizid-Experiment (SHIVA) 2.14.1 MC1220

MC1220 gehört zu einer neuen Klassen von NNRTIs (engl. *non-nuncleosid reverse transkriptase inhibitor*), den 3,4-Dihydro-2-Alkoxy-6-Benzyl-4-oxopyrimidine (DABOs), die als antivirale Wirkstoffe spezifisch die Reverse Transkriptase von HIV-1 hemmen. Die erste Besonderheit war, dass bei der Verwendung dieser DABOs in hohen Konzentrationen keine Anzeichen von Zytotoxizität *in vitro* festgestellt werden konnte (Pani et al., 2001). Des Weiteren wurde für MC1220 *in vitro* gezeigt, dass dieser Wirkstoff intrazellulär

gespeichert wird und bei einer zeitlich versetzten Infektion mit HIV (und RT-SHIV) von vier Stunden die virale Replikation effektiv gehemmt wird (Pani et al., 2001).

### 2.14.2 "Einfaches Gel" und "Komplexes Gel"

Das "Einfache Gel" besteht aus einer Microemulsion, die entwickelt wurde, um MC1220 darin zu lösen. Hier konnte aber nur eine maximale Wirkstoffendkonzentration von 0,1% erreicht werden konnte. Das "Komplexe Gel" enthält Liposome, die MC1220 in Liposom-Vesikel verpackt und somit eine höhere Wirkstoffendkonzentration im Gel möglich macht. Diese beiden Gelformulierungen wurden mit Carbopol und Hydroxypropyl Cellulose Polymeren gemischt, was als geeignete Grundlage zur Herstellung von Vaginalgelen bekannt ist (Owen et al, 2001).

### 2.14.3 Humanes Seminalplasma

Um der Situation einer natürlichen Virusexposition beim Geschlechtsverkehr möglichst nahe zu kommen, wurden 0,5 ml einer virushaltigen Suspension (8x10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> in Zellkulturmedium) für die Belastungsinfektion mit 0,5 ml Seminalplasma gemischt. Die Gewinnung einer ausreichenden Menge an Seminalflüssigkeit von Rhesusaffen war nicht möglich, weshalb auf humanes Seminalplasma zurückgegriffen wurde. Es handelte sich immer um ein Gemisch von mehreren verschiedenen Ejakulaten, die von Cryostore Deutschland GmbH in Essen und vom Kinderwunschzentrum in Göttingen bezogen wurden.

### 2.15 Virus-Stämme

#### 2.15.1 SIVmac239 und SIVmac251

Die SIV-infizierten Tiere in dieser Arbeit waren entweder mit SIVmac239 oder SIVmac251 infiziert. Der zur Infektion verwendete SIVmac239-Virusstock (Regier et al., 1999) wurde in der Abteilung "Infektionsmodelle" hergestellt, der SIVmac252-Virusstock wurde von Dr. A. Aubertin (Institut Pasteur, Straßburg, Frankreich) zur Verfügung gestellt (Le Grand et al., 1992).

#### 2.15.2 RT-SHIV

Die experimentelle Infektion von Rhesusaffen mit SIV ist ein wichtiges Modell in der HIV Forschung. Dies ist jedoch für Versuche mit NNRTIs, die die Reverse Transkriptase von HIV hemmen, nur eingeschränkt anwendbar (North at al., 2005). Daher wurde durch Rekombination ein SIV/HIV-1 Hybridvirus hergestellt, das auf der Genomsequenz von SIVmac239 basiert, aber RT-Sequenz von HIV-1 enthält (Überla et al, 1995). Dieses Virus stellt derzeit die einzige Möglichkeit dar, die Wirksamkeit von NNRTIs im Rhesusaffen zu prüfen (Balzarini et al., 1995).

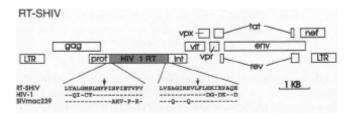


Abb. 2.1 Genomsequenz von RT-SHIV (Überla et al., 1995)

### 2.16 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten subaldulte bis adulte Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) indischer und chinesischer Herkunft im Alter von 3-12 Jahren. Die Tiere wurden von Züchtern aus China und England bezogen oder stammten aus der Zuchtkolonie des Deutschen Primatenzentrums (DPZ). Die hier verwendeten Tiere wurden am DPZ gemäß den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes und am Centre International de Recheres Medicales (CIRMF, Franceville, Gabun) gemäß den Europäischen Richtlinien für Tierschutz (86-609/EEC) in der derzeit geltenden Fassung gehalten.

Alle Tiere wurden von Tierärzten und -pflegern der entsprechenden Institute betreut. Der genetische MHC-Hintergrund der verwendeten Versuchstiere wurde von der Frau Dr. Sauermann, Abteilung Infektionsmodelle, am DPZ mittels PCR-Verfahren bestimmt. Die folgenden Tabellen geben detaillierte Auskünfte über die in dieser Arbeit verwendeten Tiere hinsichtlich Infektionsstatus, Alter, Geschlecht, Herkunft und der durchführten Experimente. Wenn die einzelnen Tiernummern nicht im Ergebnisteil explizit erwähnt werden, ist den Listen zu entnehmen, welche Tiere in dem entsprechenden Experiment verwendet wurden.

Tab. 2.7 Verwendete Tiere in Ergebnisteil 4.3-4.5 (Probenentnahme im Rahmen der Sektion)

|                               | Ī   |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | 1         | 1         | ı         |           |           |           |           |           |           |           |           | 1         |           |
|-------------------------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                               | TAM                                       | n.d.      |
|                               | Uterus                                    | p.u       | p.u       | p.u       | .p.u      | .p.u      | n.d.      | n.d.      | n.d.      | .p.u      | .p.u      | .p.u      | .p.u      | n.d.      | n.d.      | n.d.      | .p.u      | .p.u      | .p.u      | n.d.      |
| ationen                       | Xiv19D                                    | p.u       | p.u       | p.u       | n.d.      |
| Zellisol                      | aniga√                                    | Х         | X         | Х         | X         | X         | Х         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | Х         | Х         | Х         | n.d.      | n.d.      | n.d.      | n.d.      |
| Durchgeführte Zellisolationen | Colon                                     | X         | X         | Х         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | ×         | ×         | ×         | X         | X         | X         | ×         | X         | X         | n.d.      | n.d.      | n.d.      | n.d.      |
| Durchg                        | unə]]                                     | n.d.      |
|                               | munujəl                                   | Х         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | ×         | ×         | ×         | X         | X         | X         | ×         | X         | X         | n.d.      | n.d.      | n.d.      | n.d.      |
|                               | Dnodenum                                  | Х         | X         | Х         | X         | X         | X         | X         | X         | Х         | Х         | X         | X         | ×         | ×         | ×         | X         | X         | X         | ×         | X         | X         | n.d.      | n.d.      | n.d.      | n.d.      |
|                               | gnutlaH                                   | DPZ       |
|                               | Infektions-<br>Status                     | infiziert | geschützt | geschützt | geschützt | geschützt | geschützt | geschützt | infiziert | infiziert | infiziert | infiziert |
|                               | Sektion<br>(Wochen nac<br>Belastungsinfek | 11        | 12        | 10        | 13        | 12        | 11        | 13        | 14        | 15        | 15        | 12        | 11        | 11        | 11        | 13        | 14        | 17        | 15        | 17        | 15        | 17        | 6         | 6         | 6         | 6         |
|                               | Alter in Jahren zu<br>Sektionszeitpur     | 4         | 3         | 5         | 4         | 4         | 5         | 9         | 4         | 4         | 4         | 3         | 4         | 4         | 4         | 4         | 9         | 4         | 4         | 4         | 4         | 7         | 4         | 4         | 4         | 4         |
| 1                             | rəisinummi                                | nein      |
|                               | Infektions-<br>route                      | vaginal   |
|                               | su'i'V                                    | RT-SHIV   |
|                               | Herkunft                                  | Ch        |
| -                             | Ceschlecht                                | W         | W         | W         | W         | W         | W         | W         | W         | W         | W         | W         | W         | W         | W         | W         | W         | W         | W         | М         | W         | W         | W         | <u> </u>  | ×         | W         |
| I.                            | Тієтпитте                                 | 13222     | 13567     | 13327     | 13568     | 13567     | 13328     | 13570     | 13083     | 13089     | 13571     | 13574     | 13090     | 13091     | 13100     | 13575     | 13566     | 13078     | 13082     | 13086     | 13573     | 13572     | 13079     | 13080     | 13085     | 13078     |

|                               |                                       | 1         | 1         |                     |           |               |                     |           |                     |                     |                     |                     |                     |                     |           |
|-------------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|---------------------|-----------|---------------|---------------------|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|
|                               | TAAN                                  | p.u       | n.d.      | n.d.                | n.d.      | n.d.          | n.d.                | n.d.      | n.d.                | n.d.                | n.d.                | n.d.                | n.d.                | n.d.                | n.d.      |
| _                             | Uterus                                | ×         | ×         | X                   | ×         | X             | X                   | ×         | X                   | X                   | X                   | X                   | X                   | X                   | X         |
| ationer                       | Xiv19O                                | p.u       | p.u       | p.u                 | X         | X             | X                   | X         | X                   | X                   | X                   | X                   | X                   | X                   | Х         |
| Zellisol                      | aniga√                                | p.u       | p.u       | p.u                 | ×         | X             | X                   | ×         | X                   | X                   | X                   | X                   | X                   | X                   | Х         |
| führte                        | Colon                                 | X         | ×         | Х                   | ×         | X             | Х                   | ×         | X                   | X                   | X                   | X                   | Х                   | Х                   | n.d.      |
| Durchgeführte Zellisolationen | unəll                                 | n.d.      | n.d.      | n.d.                | n.d.      | n.d.          | n.d.                | n.d.      | n.d.                | n.d.                | n.d.                | n.d.                | n.d.                | n.d.                | n.d.      |
| I                             | munujəl                               | ×         | ×         | X                   | ×         | X             | X                   | ×         | X                   | X                   | X                   | X                   | X                   | X                   | Х         |
|                               | mnuəponQ                              | ×         | ×         | X                   | ×         | X             | X                   | ×         | X                   | X                   | X                   | X                   | X                   | X                   | Х         |
|                               | gnutlsH                               | CIRMF     | CIRMF     | CIRMF               | CIRMF     | CIRMF         | CIRMF               | CIRMF     | CIRMF               | CIRMF               | CIRMF               | CIRMF               | CIRMF               | CIRMF               | CIRMF     |
| _                             | enoithelal<br>Sutate                  | infiziert | infiziert | infiziert           | geschützt | infiziert     | infiziert           | infiziert | geschützt           | geschützt           | infiziert           | geschützt           | infiziert           | geschützt           | infiziert |
|                               | Sektion (Wochen na Belastungsinfek    | 14        | 14        | 14                  | 14        | 14            | 15                  | 15        | 16                  | 16                  | 15                  | 16                  | 15                  | 16                  | 15        |
|                               | Alter (in Jahren zu<br>Sektionszeitpu | 4         | 4         | 4                   | 4         | 4             | 5                   | 4         | 4                   | 4                   | 4                   | 4                   | 4                   | 4                   | 5         |
| 1.                            | ıəisinummi                            | nein      | nein      | nein                | nein      | nein          | nein                | nein      | nein                | nein                | nein                | nein                | nein                | nein                | nein      |
| _                             | Infektions<br>route                   | vaginal   | vaginal   | vaginal             | vaginal   | vaginal       | vaginal             | vaginal   | vaginal             | vaginal             | vaginal             | vaginal             | vaginal             | vaginal             | vaginal   |
|                               | suriV                                 | RT-SHIV   | RT-SHIV   | RT-SHIV             | RT-SHIV   | RT-SHIV       | RT-SHIV             | RT-SHIV   | RT-SHIV             | RT-SHIV             | RT-SHIV             | RT-SHIV             | RT-SHIV             | RT-SHIV             | RT-SHIV   |
|                               | Herkunft                              | Ch        | Ch        | $\operatorname{Ch}$ | Ch        | $\mathrm{Ch}$ | $\operatorname{Ch}$ | Ch        | $\operatorname{Ch}$ | $\operatorname{Ch}$ | $\operatorname{Ch}$ | $\operatorname{Ch}$ | $\operatorname{Ch}$ | $\operatorname{Ch}$ | Ch        |
| ]                             | Geschlech                             | M         | W         | M                   | W         | M             | M                   | W         | M                   | M                   | M                   | M                   | M                   | M                   | W         |
| jt.                           | Tiernummo                             | R01       | R02       | R03                 | R04       | R05           | R06                 | R07       | R08                 | R09                 | R10                 | R11                 | R12                 | R13                 | R14       |

w, weiblich; Ch, Rhesusaffen chinesischer Herkunff; n.d., nicht durchgeführt; x, durchgeführtes Experiment DPZ, Deutsches Primatenzentrum; CIRMF, Centre International de Recheres Medicales

Tab. 2.8 Analysierte Tiere in Ergebnisteil 4.1./ 4.2. / 4.12. (Probenentnahme im Rahmen der Sektion)

|                               | TJAN   | X         | n.d.        | X           | n.d.        | n.d.      | .p.u        | n.d.      | X           | .p.u        | .p.u        | X         |                  | p.u   | X     | p.u  | X    | p.u   | p.u   | Х     | X     | X     | Х     |
|-------------------------------|--|-----------|-------------|-------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-----------|------------------|-------|-------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ı                             | Uterus                                       | X         | ×           | -           | ı           | -         | -           | -         | -           | ı           | ı           | X         |                  |       | p.u   | -    | -    | ı     |       | ×     | ×     | X     | ×     |
| lationei                      | Cervix                                       | X         | ×           | ı           | ı           | 1         | ı           | 1         | ı           | ı           | ı           | Х         |                  |       | p.n   |      | ı    | ı     | ı     | ×     | ×     | X     | ×     |
| Zellisol                      | snigs√                                       | X         | ×           | 1           | 1           | -         | 1           | -         | 1           |             |             | Х         |                  | •     | p.u   | -    |      |       | -     | Х     | ×     | X     | Х     |
| eführte                       | Colon  | X         | ×           | X           | ×           | X         | X           | X         | X           | ×           | ×           | X         |                  | ×     | ×     | X    | X    | ×     | X     | ×     | ×     | X     | Х     |
| Durchgeführte Zellisolationen | unə[[  | X         | ×           | X           | ×           | X         | X           | X         | X           | ×           | ×           | Х         |                  | X     | ×     | X    | X    | ×     | ×     | Х     | ×     | X     | Х     |
| Γ                             | munujət                                      | X         | ×           | X           | ×           | X         | X           | X         | X           | ×           | ×           | X         |                  | X     | ×     | X    | X    | X     | X     | X     | ×     | X     | Х     |
|                               | Duodenum                                     | X         | ×           | X           | ×           | X         | X           | X         | X           | ×           | ×           | X         |                  | Х     | Х     | X    | p.n  | Х     | ×     | Х     | Х     | X     | Х     |
|                               | guntlaH                                      | DPZ       | DPZ         | DPZ         | DPZ         | DPZ       | DPZ         | DPZ       | DPZ         | DPZ         | DPZ         | DPZ       | re               | DPZ   | DPZ   | DPZ  | DPZ  | DPZ   | DPZ   | DPZ   | DPZ   | DPZ   | DPZ   |
|                               | Infektionsstat<br>(zum Zeitpunkt<br>Sektion) | AIDS      | AIDS        | AIDS        | AIDS        | AIDS      | AIDS        | AIDS      | asympt      | asympt      | asympt      | asympt    | infizierte Tiere | 1     | -     |      |      | -     | 1     | -     | -     |       | -     |
|                               | Sektion (Wochen nac                          | 155       | 138         | 537         | 96          | 115       | 30          | 36        | 151         | 28          | 30          | 150       | Nicht in         | 1     | ı     | 1    | 1    |       | 1     |       | ı     | 1     | -     |
|                               | Alter (in Jahren zu<br>Sektionszeitpur       | 9         | 9           | 12          | 5           | 9         | 5           | 4         | 8           | 4           | 10          | 8         |                  | 8     | 10    | 5    | 4    | 4     | 5     | 10    | 5     | 4     | 9     |
| 1.                            | immunisier                                   | nein      | ja          | nein        | Ja          | ja        | Ja          | ja        | ja          | nein        | nein        | ja        |                  | nein  | nein  | nein | nein | nein  | nein  | nein  | nein  | nein  | nein  |
|                               | Infektions-<br>route                         | tonsillär | tonsillär   | i.v.        | i.v.        | tonsillär | i.v.        | i.v.      | tonsillär   | i.v.        | i.v.        | tonsillär |                  | 1     |       | •    |      |       | ı     | 1     |       | ,     | 1     |
|                               | su i V                                       | SIVmac239 | SIV mac 239 | SIV mac 251 | SIV mac 251 | SIVmac239 | SIV mac 251 | SIVmac251 | SIV mac 239 | SIV mac 251 | SIV mac 251 | SIVmac239 |                  | 1     | 1     | ı    | ı    | 1     | 1     | 1     | 1     | ı     | 1     |
|                               | Herkunft                                     | puI       | puI         | puI         | puI         | puI       | puI         | puI       | puI         | puI         | Ch          | puI       |                  | Ind   | Ch    | puI  | puI  | Ind   | Ind   | Ch    | Ch    | Ch    | Ch    |
| 1                             | Geschlecht                                   | W         | W           | m           | m           | m         | m           | m         | m           | m           | m           | W         |                  | ш     | W     | m    | m    | m     | m     | W     | W     | W     | W     |
| ,I,                           | Тіегпиттег                                   |           | 2188        | 9045        | 2250        | 12537     | 13249       | 13255     | 2107        | 13259       | 10943       | 10425     |                  | 13509 | 11229 | 2220 | S9LL | 11590 | 11165 | 11232 | 13788 | 14508 | 14509 |

w, weiblich; m, männlich; Ch, Rhesusaffen chinesischer Herkunft; Ind, Rhesusaffen indischer Herkunft; i.v., intravenös; n.d., nicht durchgeführt; x, durchgeführtes Experiment; DPZ, Deutsches Primatenzentrum; asympt, asymptomatisch; DPZ, Deutsches Primatenzentrum

Tab. 2.9 Analysierte Tiere in Ergebnisteil 4.1., 4.6-8 (ex vivo Probengewinnung)

| 1                                       |   |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | _         |           |
|---|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| slast                                   | BVF   | X         | X         | X         | X         | X         | X         | Х         | ×         | X         | .p.u      | X         | X         | X         | X         | X         | n.d.      | n.d.      | .p.u      | n.d.      | n.d.      | n.d.      | n.d.      | n.d.      | n.d.      | X         |
| RNA-Viruslast                           | Colon                                       | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | n.d.      | X         | X         | X         | X         | n.d.      | X         | n.d.      | Х         | X         |
| RN.                                     | Duodenum Z                                  |           |           | X         | x         | X         | X         | Х         | ×         | X         | n.d.      | X         | X         | Х         | X         | n.d.      | X         | n.d.      | Х         | X         |
| S                                       | OI  | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | ×         | X         | n.d.      | n.d.      | X         | X         | X         | X         | -         | X         | n.d.      | n.d.      | n.d.      | n.d.      | X         | X         | X         | X         |
| gninist2-                               | Тетгятег                                    | Х         | X         | X         | ×         |           | X         | -         | n.d.      |           | X         |           | X         | X         |           | X         | -         | X         |           |           |           | 1         |           | -         | -         | X         |
| s-<br>he                                | BVF   | Х         | ×         | ×         | ×         | Х         | x         | Х         | ×         | X         | Х         | X         | X         | Х         | X         | Х         | Х         | Х         | X         | ×         | ×         | X         | X         | Х         | n.d.      | X         |
| Durchfluss-<br>zytometrische<br>Analyse | Colon                                       | X         | X         | X         | X         | X         | X         | Х         | ×         | X         | X         | X         | X         | Х         | X         | Х         | X         | X         | X         | ×         | ×         | X         | X         | Х         | n.d.      | X         |
| Du<br>zyto                              | Dnodenum                                    | Х         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | ×         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | ×         | ×         | X         | X         | X         | n.d.      | X         |
| Sun                                     | Halt  | DPZ       |
| bnukt der                               | ioitdəfii<br>JiəS mus)<br>nənədorq          | LTNP      | LTNP      | LTNP      | LTNP      | LTNP      | LTNP-P    | LTNP      | LTNP-P    | LTNP      | LTNP      | LTNP      | LTNP      | LTNP      | LTNP      | P         | P         | P         | Ь         | Ь         | Ь         | Ь         | Ь         | P         | P         | P         |
| น มช <b>ะม</b><br>ว <b>ุบทมชิษม</b>     | Deitraum<br>Untersuc<br>Moche<br>Belastungs | 63-184    | 63-184    | 64-184    | 63-184    | 68-187    | 71-142    | 391-501   | 443-507   | 157-267   | 102       | 71-153    | 67-182    | 68-187    | 71-187    | 99-184    | 104       | 107       | 102-107   | 112       | 113       | 116       | 68-85     | 128-146   | 85-126    | 69-126    |
| tynnqtiəS m                             | Alf<br>uz nərhrel ni)<br>gantzalə& rəb      | 4         | 4         | 4         | 4         | 4         | 3         | 4         | 7         | 4         | 4         | 4         | 4         | 5         | 5         | 5         | 4         | 3         | 4         | 4         | 5         | 4         | 4         | 4         | 5         | 5         |
| trsiert                                 | ınmmi                                       | nein      | ja        | ja        | nein      | ja        | nein      | ja        | ja.       | nein      | ja        | ja        | ja        | ja        | nein      | ja        | nein      | ja        | nein      | ja        |
| *                                       | Lon<br>Lon                                  | tonsillär | i.v.      | tonsillär | i.v.      | tonsillär | i.v.      | i.v.      |
| sn.                                     | su'iV                                       |           |           | SIVmac239 | SIVmac239 | SIVmac239 | SIVmac239 | SIVmac251 | SIVmac239 | SIVmac251 | SIVmac239 | SIVmac251 | SIVmac251 |
| 1Jun                                    | Herkunft                                    |           |           | puI       | puI       | puI       | puI       | puI       | Ind       | puI       | Ind       | puI       | puI       | puI       | Ind       | puI       |
| lecht                                   | Gesch                                       | W         | m         | m         | m         | ш         | W         | m         | ш         | m         | m         | m         | m         | m         | m         | m         | m         | W         | m         | W         | W         | m         | m         | m         | m         | m         |
| шшек                                    | Тіегпиттег                                  |           | 2151      | 2153      | 2155      | 2172      | 2191      | 8644      | 9045      | 9794      | 12533     | 12535     | 12536     | 12671     | 12672     | 2118      | 2141      | 2188      | 12537     | 2168      | 10425     | 12539     | 2192      | 12531     | 12538     | 11139     |

| Х         | X         | Х         | n.d.      | n.d.      | Х         | Х         |                        |            | 1          | 1          | ı          | ı          |            |            |            | ı          | ı          | ı          | ı          |            |            | -          | 1          |            | ı          | 1          |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|           |           | d.        |           |           | L.4       | d.        |                        | <u> </u>   | -          |            | _          | _          |            |            | _          | _          | _          | _          | _          |            |            |            |            |            |            |            |
| Х         | X         | n.d.      | n.d.      | n.d       | X         | n.d.      |                        | <u> </u>   | _          | •          | '          | '          | '          | •          | '          | -          | '          | -          | '          | _          | _          | '          | _          | '          | '          |            |
| X         | X         | n.d.      | n.d.      | n.d.      | X         | n.d.      |                        | 1          | 1          | •          | 1          | 1          | 1          | •          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | •          | 1          | 1          | 1          | 1          |
| X         | X         | X         | X         | .p.u      | .p.u      | X         |                        | ×          | X          | X          | X          | X          | x          | X          | X          | X          | X          | X          | X          | X          | ×          | ×          | X          | ×          | x          | X          |
| X         | -         | -         | -         | -         | -         | 1         |                        | ı          | ,          | -          |            |            |            | -          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            | -          |
| Х         | n.d.      | n.d.      | Х         | Х         | n.d.      | n.d.      |                        | n.d.       | X          | n.d.       | n.d.       | X          | X          | ×          | ×          | ×          | ×          | ×          | ×          | Х          |
| Х         | n.d.      | n.d.      | X         | X         | n.d.      | n.d.      |                        | n.d.       | X          | n.d.       | n.d.       | X          | X          | X          | Х          | Х          | X          | Х          | X          | Х          |
| Х         | n.d.      | n.d.      | X         | X         | n.d.      | n.d.      |                        | n.d.       | X          | n.d.       | n.d.       | X          | X          | X          | X          | Х          | X          | X          | X          | Х          |
| DPZ       | e                      | DPZ        |
| Ь         | P         | P         | Ь         | Ь         | Ь         | Ь         | Nicht infizierte Tiere | nicht inf. |
| 69-126    | 96-105    | 105-126   | 69        | 89        | 106       | 105-106   | Nicht inf              | ı          | ı          | 1          | ı          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          |
| 4         | 3         | 4         | 3         | 3         | 3         | 3         |                        | 5          | 4          | 4          | 4          | 4          | 4          | 9          | 4-5        | 4          | 9          | 9-9        | 4          | 4          | 3          | 3          | 4          | 4          | 3          | 3          |
| ja        | ja        | ja        | ja        | ja        | nein      | nein      |                        | 1          | 1          | -          | 1          | 1          | 1          | -          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          |            |            | 1          |            | 1          | -          |
| i.v.      | i.v.      | i.v.      | i.v.      | i.v.      | j.v.      | i.v.      |                        | ı          | ı          | 1          | ı          | ı          | 1          | -          | 1          | 1          | ı          | 1          | 1          | ı          | ı          |            | ı          | ı          | ı          | •          |
| SIVmac251 |                        |            | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          |            | -          |            |            | -          | -          | -          |
| puI       | Ind       | Ind       | Ind       | Ind       | Ind       | Ind       |                        | Ind        | puI        | puI        | puI        | puI        | Ind        | puI        | puI        | puI        | puI        | puI        | puI        | Jud        | Jud        | Ind        | Jud        | Jud        | Ind        | puI        |
| m         | Ш         | m         | m         | m         | m         | m         |                        | ш          | m          | m          | ш          | ш          | ш          | m          | m          | m          | ш          | m          | m          | ш          | ш          | ш          | ш          | ш          | ш          | m          |
| 13251     | 13258     | 13250     | 13253     | 12056     | 13260     | 13257     |                        | 2251       | 13906      | 13907      | 13913      | 13916      | 13918      | 2199       | 2232       | 2278       | 11661      | 2209       | 2249       | 2258       | 2284       | 2290       | 2302       | 2311       | 2334       | 2336       |

w, weiblich; m, männlich; Ch, Rhesusaffen chinesischer Herkunft; Ind, Rhesusaffen indischer Herkunft; i.v., intravenös; inf., infiziert; P, Progressor; LTNP, engl. long-term non-progressor; n.d., nicht durchgeführt; x, durchgeführtes Experiment; DPZ, Deutsches Primatenzentrum; ICS (engl. intracellular cytokine staining)

### 3. Methoden

### 3.1 Narkotisierung der Versuchstiere

Die Rhesusaffen wurden für alle Eingriffe narkotisiert. Für die Blutentnahme, für die Gewinnung von Darmbiopsien und bronchoalveolärer Lavage sowie Immunisierungen wurden die Tiere mit der intramuskulären Verabreichung von 0,1 ml Ketavet® oder 0,2 ml GM II (siehe Material 2.12) pro Kilogramm Körpergewicht narkotisiert. Sämtliche Arbeiten wurden von den Tierärzten und Tierpflegern des DPZ oder des Centre International de Recherches Medicales (Franceville, Gabun) durchgeführt.

### 3.2 Mikrobizid-Experiment

In diesem zweistufigen Experiment (SHIVA-1 und SHIVA-2) wurden unterschiedliche Konzentrationen des NNRTI MC1220 in zwei verschiedenen Gelformulierungen ("Einfaches Gel" und "Komplexes Gel") untersucht (siehe Material 2.14.1 und 2.14.2). In den Kontrollgruppen wurden die Gele ohne Wirkstoffzusatz verwendet. Weibliche Tiere wurden für das Mikrobizid-Experiment zur Synchronisation des hormonellen Zyklus mit 30mg Medroxyprogesteronacetat (Depo-Clinovir, Pfizer) i.m. behandelt. Dadurch wird auch das Vaginalepithel dünner, was die Suszeptibilität gegenüber dem Virus erhöht (Marx et al., 1996). Nach 30 Tagen wurden die Tiere für die Belastungsinfektion mit 2 mg Ketamin pro Kilogramm Körpergewicht narkotisiert und die Hüften der Tiere wurden leicht hochgestellt. Zwei Milliliter der entsprechenden Gelformulierung (Tab.3.1) wurde vaginal mit einem Katheter (Urotech, CH06) appliziert. Nach 30 Minuten erfolgte die Belastungsinfektion mit einem Gemisch aus 0,5 ml RT-SHIV-Suspension (8x10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>) und 0,5 ml humanem Seminalplasma ebenfalls mittels eines Katheters. Die Tiere wurden für weitere 20 Minuten in dieser Position belassen.

Die erste Versuchsreihe (SHIVA-1) wurde am Deutschen Primatenzentrum (DPZ) in Göttingen durchgeführt. Die verschiedenen Gruppen sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen. Die zweite Versuchsreihe (SHIVA-2) wurde am Centre International de Recherches Medicales in Franceville (Gabun) durchgeführt. Die verschiedenen Gruppen sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tab. 3.1 Gruppeneinteilung der Tiere mit den verwendeten Gelformulierungen (SHIVA-1)

| Gruppe   | Appliziertes Gel*          | Tiere                             |
|----------|----------------------------|-----------------------------------|
| Gruppe 1 | Komplexes Gel              | 13079, 13080, 13222, 13566, 13567 |
| Gruppe 2 | Komplexes Gel, 0,1% MC1220 | 13078, 13085, 13327, 13568, 13569 |
| Gruppe 3 | Komplexes Gel, 0,5% MC1229 | 13082, 13086, 13328, 13570, 13573 |
| Gruppe 4 | Einfaches Gel              | 13083, 13087, 13089, 13571, 13574 |
| Gruppe 5 | Einfaches Gel, 0,1% MC1220 | 13090, 13091, 13100, 13572, 13575 |

<sup>\*</sup>mit entsprechender NNRTI-Wirkstoffkonzentration

Tab. 3.2 Gruppeneinteilung der Tiere mit den verwendeten Gelformulierungen (SHIVA-2)

| Gruppe   | Appliziertes Gel*          | Tiere                   |
|----------|----------------------------|-------------------------|
| Gruppe 1 | Komplexes Gel              | R01, R02, R03, R04, R05 |
| Gruppe 2 | Komplexes Gel, 0,5% MC1220 | R06, R07, R08, R09      |
| Gruppe 3 | Komplexes Gel, 1,5% MC1229 | R10, R11, R12, R13, R14 |

<sup>\*</sup>mit entsprechender NNRTI-Wirkstoffkonzentration

### 3.3 Belastungsinfektion der Tiere mit SIV

In der vorliegenden Arbeit wurden SIV-infizierte Tiere verwendet, die aus verschiedenen Impfstoff-Experimenten stammten und teilweise vor der Belastungsinfektion immunisiert worden waren. Die Belastungsinfektion erfolgte entweder i.v. oder oral über die Tonsillen (Stahl-Hennig et al, 1999) mit SIVmac239 oder SIVmac251. Diese und weitere Informationen der verwendeten Tiere sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

### 3.4 Entnahme von Blut und Gewebeproben bei den Versuchstieren

#### 3.4.1 Blutentnahme

Die Rhesusaffen wurden für die Entnahme von Blut und für Immunisierungen durch intramuskuläre Verabreichung von 0,1 ml Ketavet® pro Kilogramm Körpergewicht narkotisiert. Die Blutproben wurden durch Punktion der *Vena femoralis* mit Hilfe von BD Vacutainer-Blutentnahmeröhrchen gewonnen, die zur Verhinderung der Koagulation entweder mit EDTA oder Zitrat versetzt waren. Erfahrungswerte haben gezeigt, dass sich für die Isolation von PBMC Zitratblut am besten eignet. Für die Markierung von Oberflächenantigenen in Vollblut und deren anschließende durchflusszytometrische Analysen wurde EDTA-Blut verwendet.

### 3.4.2 Entnahme von Colon- und Duodenumbiopsien

Während einer 24-stündigen Nahrungskarenz wurde den Rhesusaffen 1,5 ml Dulcolax® über das Trinkwasser verabreicht. Für die Endoskopie am Folgetag wurden die Tiere mit 0,2 ml GM II pro Kilogramm Körpergewicht narkotisiert. Zur Darmrelaxation wurden

zusätzlich 0,01 – 0,04 ml Buscopan® pro Kilogramm Körpergewicht i.m. oder i.v. verabreicht. Bei der Gastro-Duodenoskopie wurde das flexible Endoskop dem auf der Seite liegenden Tier über den Ösophagus in den Magen eingeführt und durch den Pylorus einige Zentimeter in das Duodenum vorgeschoben. Vier bis sechs Biopsien wurden nacheinander unter Zurückziehen des Endoskops entnommen.

Zur Colo-Rektoskopie wurde die Endoskopspitze mit etwas Wasser befeuchtet, in das Rectum eingeführt und etwa. 20 cm weit in das Colon vorgeschoben. Zwölf bis fünfzehn Biopsien wurden nacheinander unter Zurückziehen des Endoskops entnommen. Die Proben wurden je nach Verwendung sofort in PBS auf Eis gestellt oder in RNAlater gegeben.

### 3.4.3 Gewinnung der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BAL)

Für die bronchoalveoläre Lavage wurden die Rhesusaffen mit 0,2 ml GM II pro Kilogramm Körpergewicht narkotisiert. Das Bronchoskop wurde mittels eines Laryngoskops unter Herunterdrücken des Zungengrundes eingeführt und über die *Bifurcatio tracheae* hinaus in einen der Hauptbronchien geschoben bis die Wedgeposition erreicht war. Mit einer 60 ml-Spritze wurden zweimal 30 ml einer 37°C warmen sterilen physiologischen NaCl-Lösung über den Arbeitskanal verabreicht. Anschließend wurde diese mit einer 5ml-Spritze portionsweise wieder abgesaugt, in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben und sofort auf Eis gestellt. Das Rückgewinnungsvolumen der NaCl-Lösung lag bei 60-80%.

### 3.5 Erstellung eines Differentialblutbildes

Eine Analyse des Differentialblutbildes aus EDTA-Blut erfolgte bei den Versuchstieren in regelmäßigen Abständen in der Abteilung Hämatologie des Universitätsklinikums Göttingen gemäß aktueller Standards.

#### 3.6 Euthanasie der Rhesusaffen

### 3.6.1 Durchführung und Organentnahme

Die Tiere wurden mit 0,2 ml GM II pro Kilogramm Körpergewicht sediert und nach der Blutentnahme von 100-150 ml mit 1–1,5 ml Narcoren® (entspricht 160-240 mg Phenobarbital-Natrium) pro Kilogramm Körpergewicht i.v. euthanasiert.

Die benötigten Organe wurden entnommen, in PBS oder Medium überführt und sofort auf Eis gestellt. Die Darmabschnitte Duodenum und Ileum wurden vollständig und von Colon und Jejunum jeweils ein 10-15 cm langes Stück entnommen. Alle Darmabschnitte wurden

aufgeschnitten, mit isotonischer NaCl-Lösung von Kotresten befreit und dann auf Eis gelagert.

Die Sektionen und Organentnahmen wurden von den Tiermedizinern und Pathologen des Deutschen Primatenzentrums oder des Centre International de Recherches Medicales in Franceville (Gabun) durchgeführt.

### 3.6.2 Entnahme des Nasen-assoziierten lymphatischen Gewebes (=NALT, engl. nasa- associated lymphoid tissue)

Zur Entnahme des NALT wurde zuerst der Unterkiefer vom Schädel abgetrennt. Anschließend wurde der weichen Gaumen so dicht wie möglich am Zahnfleisch mit Skalpell und Pinzette abgelöst. Der harten Gaumen wurde mit Hammer und Meißel entlang der Zähne durchtrennt und vorsichtig entfernt. Das NALT lag dann als dünne Membran frei, und wurde mit dem Skalpell beidseitig lateral und mittig vom Septum gelöst und sofort in PBS auf Eis gestellt.

Das Protokoll zur Präparation des NALT wurde von Jill Knips aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Racz (Bernhard-Nocht Institut, Hamburg) übernommen.

# 3.7 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut, bronchoalveolärer Lavage und verschiedenen Organen

### 3.7.1 Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

In einem Leucosep-Röhrchen mit Trennscheibe (Leucosepmembran) wurden 3 ml Ficoll (Dichte 1,077 g/ml) vorgelegt und 2 min bei 500 x g zentrifugiert. Das Blut wurde anschließend auf die Leucosepmembran überführt und 20 min bei 800 x g zentrifugiert. Der Lymphozytensaum in der Interphase zwischen Ficoll und zellfreiem Plasma wurde abgenommen und mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt und diese nach einem weiteren Waschschritt in den unterschiedlichen Tests eingesetzt.

#### 3.7.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus Lymphknoten und Milz

Die bei der Sektion entnommen Lymphknoten und ein ca. 1 x 1 cm großes Stück der Milz wurden mit Hilfe einer Pinzette durch ein Zellsieb (100µm) gerieben. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen und die Anzahl der lebenden Zellen wurde bestimmt. Nach dem Resuspendieren der Zellen in Kulturmedium erfolgte deren Verteilung auf die unterschiedlichen funktionellen Tests.

#### 3.7.3 Isolierung von mononukleären Zellen aus Darmbiopsien (Colon, Duodenum)

Die Biopsien wurden auf einen sterilen Objektträger gegeben und mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebe mit 8-10 ml Collagenase-Medium in einen 20ml-Erlenmeyerkolben überführt und für 3 h in einem Schüttler bei bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde alles über ein Zellsieb (100 μm) gegeben, die Gewebereste mit einem 5 ml Spritzenstempels restlos durchgerieben und anschließend 6 min bei 450 x g zentrifugiert. In einem 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 5 ml 70% Percoll vorgelegt. Das Pellet der Probe wurde in 7 ml 30% Percoll resuspendiert, auf den 70% Percoll geschichtet und anschließend 20 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Lymphozytensaum in der Interphase zwischen den beiden Percollschichten wurde abgenommen und zweimal mit PBS/5% FCS gewaschen. Abschließend wurde die Anzahl der lebenden mononukleären Zellen bestimmt.

### 3.7.4 Gewinnung von mononukleären Zellen aus der bronchoalveolären Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage wurde in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen mit PBS/5% FCS auf 50 ml aufgefüllt und 6 min bei 450 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS/5% FCS aufgenommen, anschließend über ein 70 µm Zellsieb gegeben und mit PBS/5% FCS gewaschen. Die Anzahl der lebenden mononukleären Zellen wurde bestimmt.

### 3.7.5 Isolierung von mononukleären Zellen aus verschiedenen Darmresektaten (Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon)

Die Darmstücke wurden gründlich mit PBS gewaschen, um sämtliche Kotreste zu entfernen. In einer Petrischale wurde von einem maximal 7 x 5 cm großem Darmstück die Mukosa und Submukosa vom Bauchfellüberzug mit Hilfe eines Objekttägers entfernt. Dieses Gewebe wurde in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, mit PBS auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und 0,075 mg DTT hinzugefügt. Durch 3-10 minütiges kräftiges Schütteln erfolgte die Lösung des Schleims. Dem schloss sich eine Zentrifugation von 6 min bei 450 x g an, und das Gewebe wurde erneut mit PBS gewaschen. Das Gewebe wurde nun mit 40 ml EDTA-Inkubationslösung in einem 200ml-Erlenmyerkolben für 20 min in einem Schüttler bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Dieser Inkubationsschritt ist für größere Gewebemengen nötig, um zweiwertige Kationen zu binden und das Gewebe für die Collagenase zugänglicher zu machen.

Danach wurde der Überstand abgenommen, die darin bereits gelösten Zellen abzentrifugiert, in 5 ml PBS/5% FCS resuspendiert und auf Eis gestellt. Das restliche Gewebe wurde mit 40 ml Collagenase-Medium zweimal für je 1h bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde der Überstand abgenommen, die darin gelösten Zellen abzentrifugiert, in 5 ml PBS/5% FCS resuspendiert und auf Eis gestellt. Das Restgewebe wurde nach der letzten Inkubation verworfen. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (100 μm) gegeben und 6 min bei 450 x g zentrifugiert. In einem 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 10 ml 70% Percoll vorgelegt, das Pellet jeder Probe in 25 ml 30% Percoll resuspendiert, auf die 70% Percoll-Lösung geschichtet und 20 min bei 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Es wurde wie unter 3.7.3. beschrieben weiter verfahren.

### 3.7.6 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vaginalepithel, Cervix- und Uterusgewebe

Vagina, Cervix und Uterus wurden mit Schere und Skalpell voneinander getrennt, in PBS gewaschen und anschließend in einer Petrischale mit einer Schere in 1x1 mm kleine Stücke zerkleinert. Die Gewebe wurden in je einem 200 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml Collagenase<sup>+</sup>-Medium dreimal für je 1h bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde der Überstand abgenommen, die darin gelösten Zellen abzentrifugiert, in 5 ml PBS/5% FCS resuspendiert und auf Eis gestellt. Das verbleibende Gewebe wurde mit frischem Collagenase<sup>+</sup>-Medium versetzt und erneut inkubiert. Nach der letzten Inkubation wurden die Gewebereste verworfen. Die gesammelten Zellsuspensionen wurden jeweils über ein Zellsieb (40 μm) gegeben und 6 min bei 450 x g zentrifugiert. In 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 5 ml 70% Percoll vorgelegt. Das Pellet jeder Probe wurde in 7 ml 30% Percoll resuspendiert, auf die 70% Percoll-Lösung geschichtet und dann 20 min bei 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Es wurde wie unter 3.7.3. beschrieben weiter verfahren.

### 3.7.7 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Nasen-assoziierten lymphatischen Gewebe (NALT)

Das Gewebe wurde mit Hilfe einer Schere so weit wie möglich zerkleinert und in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml Collagenase<sup>+</sup>-Medium zwei- bis dreimal für je 1 h bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde der Überstand abgenommen, die darin gelösten Zellen abzentrifugiert, in 5 ml PBS/5% FCS resuspendiert und auf Eis

gestellt. Das Gewebe wurde mit frischem Collagenase<sup>+</sup>-Medium versetzt und erneut inkubiert. Nach den Inkubationen wurden die Zellsuspensionen und die Gewebereste über ein Zellsieb (100µm) gegeben. Die Gewebereste wurden mit einem 5 ml Spritzenstempels möglichst vollständig durchgerieben und anschließend 6 min bei 450 x g zentrifugiert. In einem 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 5 ml 70% Percoll vorgelegt. Das Pellet der Probe wurde in 7 ml 30% Percoll resuspendiert, auf die 70% Percoll-Lösung geschichtet und dann 20 min bei 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Es wurde wie unter 3.7.3. beschrieben weiter verfahren.

### 3.8 Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Vitalität von Zellen wurden 20-30 µl Zellsuspension 1:2 mit Trypanblaulösung verdünnt. Bei dieser Färbemethode werden tote Zellen angefärbt, da der Farbstoff nur in toten Zellen diffundiert. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer erfolgte direkt nach der Färbung die Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen.

### 3.9 Die polychromatische Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik zur Analyse von einzelnen Zellen oder Zellsubpopulationen aus einer heterogenen Zellsuspension. Die zu messenden Zellen werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch die Messzelle des Durchflusszytometers geleitet und mit Laserlicht einer definierten Wellenlänge bestrahlt. Im so genannten *Forward-Scatter* (FSC) wird die Größe der untersuchten Zelle gemessen, der *Side-Scatter* (SSC)-Detektor gibt Auskunft über die Granularität der Zelle.

Durch den Einsatz von spezifischen, Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen verschiedene Proteine der Zelle kann die Expression dieser Moleküle auf oder innerhalb der Zelle analysiert werden. Die Emission der Fluorochrome, angeregt durch das Laserlicht, wird zu Detektoren geleitet und dort in elektrische Impulse umgewandelt. In der nachfolgenden Multiparameteranalyse werden die zeitgleich aufgenommenen Parameter kombiniert und die entsprechenden Zellpopulationen analysiert.

In dieser Arbeit wurden die Durchflusszytometer LSR II und FACScalibur von BD verwendet.

#### 3.9.1 LSRII von BD

Das LSRII ermöglicht in der vorhandenen Konfiguration die gleichzeitige Analyse von zehn Fluorochromen, zu deren Fluoreszenzanregung drei Laser verwendet werden. Zur Erzeugung von monochromatischem Licht der Wellenlänge 405 nm wird ein Coherent Vioflame Diodenlaser, für die Wellenlänge 488 nm ein Argonionenlaser und für 635 nm ein JDS Uniphase Helium-Neon-Laser verwendet.

Da es immer zu einer Überlagerung der Emissionsspektren kommt, wurde vor jeder Messung eine Kompensationsmessung durchgeführt. Dazu wurden Kügelchen (Spherotec beads) mit einem einzelnen Fluorochrom gefärbt und gemessen. Mit Hilfe der Kompensationselektronik der Software FACS Diva (BD) wird das auftretende Signal in allen Detektoren ermittelt und der Anteil der Überlappung elektronisch subtrahiert.

#### 3.9.2 FACScalibur von BD

Das Durchflusszytometer FACScalibur verfügt über einen Aragonionenlaser zur Erzeugung monochromatischen Lichts der Wellenlänge 488 nm und einem Diodenlaser für die Wellenlänge 633 nm. Hier ist nur eine Analyse von vier Fluorochromen möglich, und die optimale Trennung von Negativ- und Positivenpopulationen erfolgte bei jedem Parameter durch eine manuelle Einstellung der Spannung. Die analoge Aufzeichnung der Daten erfolgte mit der CellQuest Software von BD.

### 3.10 Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration

Die optimale Antikörperkonzentration zum Färben der Zellen wurde durch Verdünnungsreihen ermittelt. Die Verdünnungsreihe wurde ausgehend von der vom Hersteller angegebenen Konzentration viermal jeweils 1:2 in PBS verdünnt und damit Vollblutzellen nach Standardprotokoll (siehe 3.13) gefärbt. Die Konzentration an Antikörpern, die ein deutliches Signal der Positivpopulation und eine klare Abtrennung zur Negativpopulation ergab, wurde für die weiteren Versuche verwendet.

### 3.11 Markierung von Oberflächenantigenen auf mononukleären Zellen

### 3.11.1 Markierung von Oberflächenantigenen im Vollblut

Für die Färbung wurden jeweils 50 μl Vollblut in BD-Rundbodenröhrchen gegeben und mit 20 μl Antikörpergemisch versetzt. Die Proben wurden 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur selektiven Lyse von Erythrozyten wurde jeder Probe 1 ml BD-Lysepuffer zugesetzt und für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben 6 min bei 450 x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen mit 1 ml PBS/0,5% BSA-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das

Zellpellet in 50 µl 0,37%iger Formaldehydlösung resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen.

Die durchflusszytometrischen Blutanalysen des SHIVA-2-Experiments während dem Infektionsverlauf wurden von den Mitarbeitern des CIRMF durchgeführt. Die Daten wurden im Rahmen der Kooperation mit dem DPZ für die weitere Auswertung und zum Vergleich der Daten des SHIVA-1-Experiments zur Verfügung gestellt.

### 3.11.2 Markierung von Oberflächenantigenen von isolierten mononukleären Zellen aus verschiedenen Geweben

Für die Markierung von Oberflächenantigenen wurden 0,2 - 1 x 10<sup>6</sup> isolierte mononukleäre Zellen verwendet. Die Zellen wurden in 50 μl PBS aufgenommen und in BD-Rundbodenröhrchen mit 20 μl Antikörpergemisch 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS/0,5% BSA-Puffer versetzt und 6 min bei 450 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 50 μl 0,37%iger Formaldehydlösung resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen.

### 3.11.3 Markierung von Oberflächenantigenen mit Biotin-gekoppelten Antikörpern

Die Färbung mit Biotin-markierten Antikörpern wurde wie unter 3.11.2 beschrieben durchgeführt. Anschließend erfolgte eine zweite Inkubation der Zellen mit 20 μl eines Streptavidin-PE-Cy7-markierten Antikörpers für 20 min bei 4°C im Dunkeln. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1 ml PBS/0,5% BSA-Puffer gewaschen, und es wurde wie in 3.11.2 beschrieben weiter verfahren.

### 3.11.4 Markierung von virusspezifischen T-Zellen mit Hilfe der Tetramer-Technik

Tetramere sind rekombinant hergestellte MHC-Klasse-I-Moleküle, die mit der CM9-Peptidsequenz komplexiert (Gag181-189, CTPYDINQM) sind (siehe Material 1.14.). Diese simulieren eine Antigen-präsentierende Zelle bzw. eine infizierte Zelle und können zur Detektion virusspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Rhesusaffen mit dem MHC-Klasse-I-Allel *MamuA\*01* eingesetzt werden. Für die Färbung dieser T-Zellpopulation wurden 0,7 µl der Tetramerlösung dem Antikörpergemisch zur Markierung von Oberflächenantigenen (siehe Kapitel 3.11.1. und 3.11.2.) zugefügt.

Die MHC-Typisierungen der Rhesusaffen wurden von Frau Dr. Sauermann aus der Arbeitsgruppe "Infektionsmodelle" des DPZ durchgeführt.

# 3.12 Immunologische Methoden zum Nachweis zellulärer und humoraler Immunantworten

### 3.12.1 Intrazelluläre Zytokin-Färbung (ICS, engl. intracellular cytokine staining)

Für die intrazelluläre Zytokin-Färbung wurden  $5x10^5$  bis  $1,5x10^6$  isolierte mononukleäre Zellen aus Blut oder bronchoalveolärer Lavage in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen mit  $250~\mu l$  Kulturmedium unter Zugabe von  $50~\mu l$  Peptidgemisch stimuliert. Für die Stimulation wurden ein Peptidpool für SIV-Gag (Konzentrationen je Peptid  $2~\mu g/m l$ ) verwendet. Als Negativkontrolle diente Kulturmedium und ein Peptidpool des Hepatitis-C-Virus (HCV). Zur polyklonalen unspezifischen Stimulation der Zellen wurde  $1~\mu g/m l$  Staphylococcus-Enterotoxin B (SEB) verwendet. Zu allen Ansätzen (mit Ausnahme des SEB-Ansatzes) wurde ein anti-CD28-Antikörper in einer Konzentration von  $1~\mu g/m l$  als Kostimulator zugesetzt.

Die Stimulationsansätze wurden für eine Stunde bei 37°C und 5%  $CO_2$  inkubiert. Nach Zugabe von 3,5  $\mu$ g Brefeldin A, gelöst in 50  $\mu$ l Kulturmedium, erfolgte eine weitere Inkubation für 5h bei 37°C und 5%  $CO_2$ .

Im Anschluss wurden die Zellen bei 450 x g für 6 min zentrifugiert und das Kulturmedium abgesaugt. Für die Oberflächenfärbung wurde das Zellpellet in 50 μl PBS resupendiert und nach der Zugabe von 20 μl Antikörpergemisch für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml PBS/0,5% BSA-Puffer gewaschen und bei 450 x g für 6 min zentrifugiert. Der Waschpuffer wurde abgesaugt und die Zellen mit 100 μl 3,5% Formaldehydlösung für 10 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> fixiert. Die Zellen wurden erneut mit 1 ml PBS/0,5% BSA-Puffer gewaschen und nach der Zentrifugation bei 700 x g für 5 min in 400 μl PBS/0,5% BSA-Puffer aufgenommen und bei 4°C im Dunkeln über Nacht gelagert.

Am nächsten Tag erfolgte die intrazelluläre Färbung der Zytokine. Hierfür wurden die Zellen bei 700 x g für 5 min zentrifugiert, der Waschpuffer abgesaugt und 20 μl Antikörpergemisch (verdünnt in Saponinpuffer) zugesetzt. Das Zellpellet wurde darin resuspendiert und für 45 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Saponinpuffer gewaschen, bei 700 x g für 5 min zentrifugiert und der Puffer entfernt. Die Zellen wurden in 75 μl PBS/0,5% BSA-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen.

### 3.12.2 Nachweis von IFNy-sezernierenden Zellen mit dem ELISPOT

Der ELISOT (engl. *enzyme-linked immuno spot technique*) dient zum Nachweis und zur Quantifizierung von Zytokin-sezernierenden Zellen nach Antigenstimulation (Kumar et al., 2001). Mit dem hier durchgeführten ELISPOT wurde das Zytokin INFγ gemessen (Suh et al., 2006). Das von den Zellen sezernierte Zytokin wird durch Festphase-assoziierte Antikörper gebunden und mit einem zweiten Enzym-gekoppelten Antikörper durch Farbreaktion sichtbar gemacht. Es kommt zur Bildung eines punktförmigen, violetten Niederschlags, der quantifiziert werden kann und jeweils einer IFNγ-produzierenden, antigenspezifischen T-Zelle entspricht.

Eine 96-well-PVDF-Platte (Millipore) wurde mit Ethanol gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 100 μl des anti-IFNγ-Antikörpers (Klon GZ-4, Konzentration 1 μg/ml) inkubiert. Die Antikörperlösung wurde entfernt und die Platte sechsmal mit PBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden in jede Vertiefung 100 μl Kulturmedium für 2 h gegeben. Anschließend wurde die Platte sechsmal mit PBS gewaschen. Es wurden 1x10<sup>5</sup> PBMC oder Lymphknoten-Zellen in 50 μl Kulturmedium und 50 μl des inaktivierten Virus (=SIV-AT2, Proteinendkonzentration im Ansatz 2 μg/ml) bzw. 50 μl der Gag-Peptide (Proteinendkonzentration im Ansatz 2 μg/ml) pro Vertiefung eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten Kulturmedium und Peptide von HCV (Proteinendkonzentration im Ansatz 2 μg/ml), als Positivkontrolle wurde Staphylococcus-Enterotoxin B (Konzentration 1 μg/ml) verwendet.

Die Platte wurde für 17 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Entfernung der Ansätze wurde die Zellkulturplatte sechsmal mit PBS/0,05% Tween gewaschen.

Je Vertiefung wurden 100 μl der zweiten anti-IFNγ-Antikörper-Lösung zugegeben (Klon 7-B6-1; Konzentration 10 μg/ml). Dieser Antikörper ist Biotin-markiert und gegen ein zweites IFNγ-Epitop gerichtet. Die Platte wurde nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37°C sechsmal mit PBS/0,01% Tween gewaschen und anschließend mit 100 μl eines Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugats (Konzentration 10 μg/ml) pro Vertiefung erneut für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS/0,01% Tween erfolgte die Zugabe von BCIP/NBT und innerhalb von fünf bis zehn Minuten kam es zum Umsatz des Farbstoffs. Die Platte wurde sechsmal mit Wasser gewaschen und die sichtbaren blau-violetten Punkte (engl. *spots*) wurden nach Trocknung der Platte mit dem ELISPOT-Reader (Bioreader 3000, Biosys GmbH) ausgezählt. Aufgrund der hohen Verdünnung entspricht jeder Spot einer INFγ-sezernierenden Zelle, die Anzahl wurde auf 1x106 Zellen normiert. Ein Ergebnis wurde als positiv bewertet,

wenn in dem SIV-Peptidstimulationsansatz über 100 Spots und im Vergleich zum HCV-Peptidpool mindestens die doppelte Spot-Zahl gemessen wurde.

Die ELISPOT-Daten in dieser Arbeit wurden routinemäßig von den technischen Mitarbeitern der Abteilung "Infektionsmodelle" erhoben.

#### 3.12.3 Nachweis humoraler Immunantworten im ELISA

Zum Nachweis SIV-spezifischer Antikörper wurde ein Standard-ELISA durchgeführt (Kuate et al., 2006). Als virale Antigene wurden p27 (EVA643, NIBSC) and SIVgp130 (EVA670, NIBSC) verwendet und das Plasma in verschiedenen Verdünnungsstufen von 1:50 – 1:80000 eingesetzt. Die Absorption wurde bei 450 nm (630 nm Referenzwellenlänge) als OD450nm bestimmt, wobei die doppelte Absorption der autologen Präwerte vorliegen musste.

Die ELISA-Daten in dieser Arbeit wurden von den technischen Mitarbeitern der Abteilung "Infektionsmodelle" erhoben.

### 3.13 Isolierung von RNA aus Darmbiopsien

Die Homogenisierung des Gewebes wurde in einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit einer 5 mm Stahlkugel (Stainless Steel Beads, Qiagen) und dem Tissue-Lyser Gerät für 3-5 Minuten bei 25 1/s durchgeführt. Nach vorheriger Ermittlung ihres Gesamtgewichts wurden zwei bis vier in "RNAlater" asservierte Biopsien für die RNA-Isolierung eingesetzt. Die RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Quiagen nach Angaben des Herstellers isoliert und die RNA-Konzentration photometrisch mit dem NanoDrop bestimmt. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

### 3.14 Isolierung von RNA aus BAL-Zellen

Die RNA-Isolation aus BAL-Zellen erfolgte mit frisch gewonnenen oder aus "RNAlater" asservierten Zellen. Die RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Quiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Pro Isolation wurden 2-8 x 10<sup>6</sup> Zellen eingesetzt, und die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit dem NanoDrop. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

### 3.15 Isolierung von DNA aus PBMC und BAL-Zellen

Die DNA-Isolation wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers zusammen mit einem enzymatischen Verdau der RNA durchgeführt. Für die Isolation wurden 5 x 10<sup>6</sup> Zellen eingesetzt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit dem NanoDrop. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

### 3.16 Quantifizierung der SIV-Viruslast in Rhesusaffen

Die SIV-Viruslast kann mit Hilfe mehrerer Methoden quantitativ bestimmt werden, wodurch unterschiedliche Aussagen getroffen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde eine quantitative Bestimmung der viralen RNA Kopien mittels Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qPCR, engl. *quantitative polymerase chain reaction*) im Plasma und im Gewebe durchgeführt. Für die Detektion der zellassoziierten Viruslast wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Es wurde eine Virusreisolierung aus isolierten Zellen mittels Kokultivierung und eine quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) zum Nachweis viraler DNA-Genomkopien (Provirus) durchgeführt.

### 3.16.1 Quantifizierung der viralen RNA-Genomkopien mittels qRT-PCR

Die quantitative Bestimmung der SIV-spezifischen RNA im Blutplasma der Versuchstiere wurde mittels qRT-PCR durchgeführt (Negri et al., 2004). Es wurde das 7500 Real-Time PCR System von Applied Biosystems mit folgendem Programm verwendet.

Tab. 3.3 PCR-Bedingungen für die qRT-PCR zur Quantifizierung viraler RNA-Kopien und zur Überprüfung der RNA-Qualität

| and day oper printing wer the street quantum |                 |             |            |  |  |  |  |  |  |  |
|--|-----------------|-------------|------------|--|--|--|--|--|--|--|
| Zyklusschritt                                | Temperatur (°C) | Dauer (min) | Zyklenzahl |  |  |  |  |  |  |  |
| Reverse Transkription                        | 50              | 30          | 1          |  |  |  |  |  |  |  |
| PCR  |                 |             |            |  |  |  |  |  |  |  |
| Initiale Aktivierung                         | 95              | 10          | 1          |  |  |  |  |  |  |  |
| Denaturierung                                | 95              | 0,15        | 15         |  |  |  |  |  |  |  |
| Annealing und Elongation                     | 60              | 1           | 43         |  |  |  |  |  |  |  |

### Quantifizierung der viralen RNA-Genomkopien im Blutplasma

Hierzu wurde die virale RNA aus 200 μl Serum mit Hilfe des MagAttract® Virus Mini M48-Kit und des BioRobot M48 der Firma Qiagen isoliert. Mit dem QuantiTect<sup>TM</sup> Probe RT-PCR-Kits der Firma Qiagen wurde mit den in Tab. 2.2 angegebenen Primern und Sonden eine qRT-PCR durchgeführt. Der Reaktionsansatz ist in Tab.3.2 A) zu finden und das entsprechende Programm ist in Tab 3.1 aufgeführt. Es wurde ein RNA-Standard mit 50, 10², 10³, 10⁴ und 10⁶ viralen Kopien verwendet.

Die viralen RNA-Genomkopien im Blutplasma wurden von Frau Dr. Sauermann, aus der Arbeitsgruppe "Infektionsmodelle" am DPZ und von G. Besson am CIRMF bestimmt.

Quantifizierung der viralen RNA-Genomkopien in Darmbiopsien, BAL-Zellen und PBMC Die Gesamt-RNA wurde aus Darmbiopsien oder BAL-Zellen isoliert (siehe Kapitel 3.13 und 3.14). Zusätzlich zur Quantifizierung der viralen RNA-Kopien wurde die Qualität der RNA durch den Nachweis des Haushaltsgens GAPDH überprüft. Die qRT-PCR wurde mit den in Tab. 2.2 angegebenen Primern. Sonde und dem entsprechenden Programm gemäß Tab. 3.1 durchgeführt. Die Reaktionsansätzte sind in Tab. 3.4 A) und B) dargestellt. Es wurde eine RNA-Standardreihe mit 1x10<sup>1</sup>-1x10<sup>6</sup> Kopien verwendet.

Tab. 3.4 Reaktionsansätze für die qRT-PCR

| A) Quantifizierung | von viralen RNA-C                     | Genomkopien                          | B) Überprüfung der I | RNA-Qualität                         |
|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| Reagenz            | Reaktionsansatz<br>mit Plasma-<br>RNA | Reaktionsansatz<br>mit<br>Gesamt-RNA | Reagenz              | Reaktionsansatz<br>mit<br>Gesamt-RNA |
| Mastermix-Qiagen   | 12,5 µl/Ansatz                        | 12,5 µl/Ansatz                       | Mastermix-Qiagen     | 12,5 µl/Ansatz                       |
| Gag sense          | 2,4 μΜ                                | 2,4 μΜ                               | GAPDH-for            | 2,4 μΜ                               |
| Gag antisense      | 2,4 μΜ                                | 2,4 μΜ                               | GAPDH-rev            | 2,4 μΜ                               |
| Taqman-Sonde       | 1,2 μΜ                                | 1,2 μΜ                               | SybrGreen            | 1,2 μΜ                               |
| RT-Mix             | 0,5 U/Ansatz                          | 0,5 U/Ansatz                         | RT-Mix               | 0,5 U/Ansatz                         |
| RNA                | 5 μl/Ansatz                           | 500 ng                               | RNA                  | 500 ng                               |
| $H_2O$             | ad 25 μl                              | ad 25 μl                             | $H_2O$               | ad 25 μl                             |

Alle Bestimmungen erfolgten in Duplikaten und die Ergebnisse der qRT-PCR wurden mit der 7500 System SDS-Software von Applied Biosystems ausgewertet.

# 3.16.2 Quantitative Bestimmung der zellassoziierten proviralen DNA-Genome mittels qRT-PCR

Die quantitative Bestimmung der zellassoziierten Viruslast mit der Real Time-PCR wurde mit isolierten PBMC durchgeführt. Die qRT-PCR wurde mit den in Tab. 2.2 angegebenen Primern und Sonden und dem entsprechenden Programm aus Tab. 3.4 durchgeführt. Es wurde der TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) verwendet und der Reaktionsansatz wurde nach Tab. 3.3 angesetzt. Als Standard wurde das Plasmid (pSTBlue1-gag), versetzt mit 500 ng genomischer DNA (pro Ansatz) eines nicht infizierten Tieres, in den Kopienzahlen  $1x10^1$ - $1x10^6$  verwendet. Es konnte kein Einfluss der genomischen DNA auf die Standard-Reihe festgestellt werden.

Die Berechnung der proviralen Kopien pro 1x10<sup>6</sup> PBMC basiert auf dem Gesamt-DNA-Gehalt von 6,3pg pro Leukozyt (diploid) von *Macaca mulatta*.

Tab. 3.5 Reaktionsansätze für die qRT-PCR zur Quantifizierung viraler DNA-Genomkopien

| Reagenz       | Reaktionsansatz<br>mit<br>genomischer DNA |
|---------------|---|
| Mastermix-ABI | 12,5 µl/Ansatz                            |
| Gag sense     | 2,4 μΜ                                    |
| Gag antisense | 2,4 μΜ                                    |
| Taqman-Sonde  | 1,2 μΜ                                    |
| DNA           | 500 ng                                    |
| $H_2O$        | ad 25 μl                                  |

Tab. 3.6 PCR-Bedingungen für die Quantifizierung viraler DNA-Genomkopien

| Zyklusschritt            | Temperatur (°C) | Dauer (min) | Zyklenzahl |
|--------------------------|-----------------|-------------|------------|
| Initiale Aktivierung     | 50              | 2           | 1          |
| PCR                      |                 |             |            |
| Initiale Aktivierung     | 95              | 10          | 1          |
| Denaturierung            | 95              | 0,15        | 15         |
| Annealing und Elongation | 60              | 1           | 43         |

Die Bestimmungen erfolgten in Duplikaten und die Ergebnisse der qRT-PCR wurden mit der 7500 System SDS-Software von Applied Biosystems ausgewertet.

### 3.16.3 Quantitative Bestimmung von infektiösem zellassoziiertem Virus mittels Virusreisolierung

Zur Quantifizierung der zellassoziierten Viruslast mittels Virusreiolierung wurden PBMCs oder isolierte mononukleäre Zellen aus Lymphknoten mit der T-Zelllinie C8166 kokultiviert. Die zu untersuchenden Zellen wurden nach der Isolation so in Kulturmedium aufgenommen, dass eine Zellsuspension mit einer Konzentration von  $1x10^6$  Zellen/ml entstand. Davon ausgehend erfolgte eine 1:2 Verdünnungsreihe bis  $48,8x10^1$  Zellen/ml. Pro Zellkulturflasche wurden jeweils 3, 1 und  $0,5x10^6$  Zellen mit  $3x10^6$  C8166-Zellen in einem Gesamtvolumen von 4-6 ml kultiviert. Die höheren Verdünnungsstufen  $2,5x10^6$  bis  $48,8x10^1$  wurden in einer 24-well-Platte mit  $3x10^5$  C8166-Zellen in einem Gesamtvolumen von 2 ml kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden die Kulturen auf virusinduzierte Syncytienbildung untersucht und alle 3-4 Tage 1:2 gesplittet. Nach zwei Wochen erfolgte der Virusnachweis mittels intrazellulärer Immunfärbung (Norley et al., 1993).

Die Daten der zellassoziierten Viruslast im Ergebnisteil 4.4.2. dieser Arbeit wurden routinemäßig von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Infektionsmodelle", die in Ergebnisteil 4.5.2. von M. Caron am CIRMF (Franceville, Gabun), erhoben.

### 3.17 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism. Für Korrelationsanalysen wurde die nicht-parametrische Spearman-Korrelation mit einer zweiseitigen Analyse und einem Konfidenzintervall von 95% durchgeführt. Für die vergleichenden Auswertungen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney (U) Test verwendet. Auch bei diesem Test wurde eine zweiseitige Analyse mit einem Konfidenzintervall von 95% gewählt. Als statistisch signifikant wurden in beiden Tests Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner als 0,05 und als hochsignifikant Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner als 0,01 bezeichnet.

### 3.18 Schutzmaßnahmen

Die Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank der Sicherheitsstufe II innerhalb einer gentechnischen Anlage der Sicherheitsstufe II oder III.

### 3.19 Antikörper-Kombinationen und Definition verschiedener Lymphozytenpopulationen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

### 3.19.1 Antikörper-Kombinationen zur Charakterisierung der Lymphozyten im Mikrobizid-Experiment (SHIVA-1 und SHIVA-2)

Tab. 3.7 Übersicht über die Kombination der verwendeten Fluorochrom-konjugierten Antikörper für die Charakterisierung der T-Zellen in Ergebnisteil 4.6.

| Fluorochrom           | SHIVA-1              |         | SHIVA-2              |         |
|-----------------------|----------------------|---------|----------------------|---------|
|                       | Versuchs-<br>verlauf | Sektion | Versuchs-<br>verlauf | Sektion |
| FITC                  | CD29                 | -       | CD29                 | -       |
| PE                    | -                    | -       | CD8                  | CD8     |
| ECD                   | -                    | -       | -                    | -       |
| PerCP-Cy5.5           | -                    | -       | CD4                  | CD4     |
| PE-Cy7                | CD20                 | ı       | -                    | -       |
| APC                   | CD11a                | 1       | CD3                  | CD3     |
| APC-Cy7               | CD8                  | ı       | -                    | -       |
| Alexa700              | CD3                  | CD3     | -                    | -       |
| PacificBlue/Alexa 405 | CD4                  | CD4     | -                    | -       |
| AmCyan                | -                    | CD8     | -                    | -       |

### 3.19.2 Antikörper-Kombination zur Charakterisierung der Lymphozyten von Biopsie- und Sektionsmaterial SIV-infizierter und uninfizierter Rhesusaffen

Tab. 3.8 Übersicht über die Kombination der verwendeten Fluorochrom-konjugierten Antikörper für die Charakterisierung der Gesamtlymphozyten und der T-Zellen

| Fluorochrom           | Antigen<br>(Analyse der Lymphoyzten<br>Gesamtpopulation) |       | <b>Antigen</b><br>(T-Lymphoyzten-Analyse) |           |
|-----------------------|--|-------|---|-----------|
| FITC                  | CD45   | -     | -   | -         |
| PE                    | NKG2a  | NKG2a | -   | CM9-      |
|                       |  |       |   | Tetramere |
| ECD                   | -  | -     | CD45RA                                    | CD45RA    |
| PerCP-Cy5.5           | -  | -     | -   | -         |
| PE-Cy7                | CD20   | CD20  | •   | -         |
| APC                   | CD195  | CD11a | CD195                                     | -         |
| APC-Cy7               | CD16   | CD16  | 1   | HLA-DR    |
| Alexa700              | CD3  | CD3   | CD3                                       | CD3       |
| PacificBlue/Alexa 405 | CD4  | CD4   | CD4                                       | CD4       |
| AmCyan                | CD8  | CD8   | CD8                                       | CD8       |

### 3.19.3 Definition verschiedener Lymphozytenpopulationen

Die Lymphyozytengesamtpopulation wurde als erstes über die Expression eines Leukozytenmarkers (CD11a oder CD45), und über Zellgröße (FSC, Forward-Scatter) und Granularität (SSC, Side-Scatter) definiert. Anschließend wurden die B-Lymphoyzten über das Oberflächenantigen CD20 und die T-Lymphoyzten über das Antigen CD3 identifiziert. Die Population der NK-Zellen wurde über die Expression von NKG2a in Verbindung mit CD16 bestimmt.

Nach der Definition der T-Lymphoyzten über das Oberflächenantigen CD3 wurden die T-Helferzellen über die Expression von CD4 und die zytotoxischen T-Zellen über CD8 definiert. Anschließend wurde auf diesen Zelltypen die Expression weiterer Oberflächenantigene untersucht. Es wurden die Gedächtnis T-Zellmarker CD29 und CD45RA, der Chemokinrezeptor CCR5 (=CD195), sowie der Aktivierungsmarker HLA-DR (MHC-Klasse-II Antigenmarker) untersucht.

Virusspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Hilfe der Tetramer-Technik fluoreszenzmarkiert und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Kapitel 2.8.).

### 3.19.4 Antikörper-Kombination zur Charakterisierung der Lymphozyten im polyfunktionalen ICS

Nach der Charakterisierung der T-Lymphoyzten mit dem FSC und SSC sowie der Expression von CD3<sup>+</sup> wurden die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen abgegrenzt. Für beide Populationen wurden die Gedächtniszellen durch das Fehlen des CD45RA-Antigens auf der Oberfläche definiert. Die relativen Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CD45RA negativen T-Zellen, die eines der drei Zytokine INFγ, TNFα und IL2 produzierten, wurde bestimmt. Polyfunktionale Zellen, die für zwei oder drei Zytokine positiv waren, wurden mit Hilfe der "Boolen Gates"-Funktion der Analysesoftware "FlowJo" analysiert.

Tab. 3.9 Übersicht über die Kombination der verwendeten Fluorochromkonjugierten Antikörper für die intrazelluläre Zytokin-Färbung

| Fluorochrom          | Antigen |  |  |
|----------------------|---------|--|--|
| FITC                 | IL2     |  |  |
| PE                   | TNFα    |  |  |
| ECD                  | CD45RA  |  |  |
| APC                  | INFγ    |  |  |
| Alexa700             | CD3     |  |  |
| PacificBlue          | CD4     |  |  |
| <b>PacificOrange</b> | CD8     |  |  |

### 4. Ergebnisse

# 4.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus verschiedenen mukosalen Geweben und erzielte Zellausbeuten

Alle Methoden zur Isolierung mononukleärer Zellen aus verschiedenen mukosalen Geweben mussten im Rahmen dieser Arbeit am Institut neu etabliert werden. Für die durchflusszytometrische Analyse mukosaler Kompartimente an lebenden Tieren wurden Zellisolierungen aus der bronchoalveolären Lavage (BAL), Colon- und Duodenumbiopsien durchgeführt. Diese Methoden sind essentiell für die Charakterisierung von mukosalen Geweben der SIV-infizierten Tiere und ermöglichen Langzeitanalysen in künftigen Impfstoffexperimenten.

Zum Zeitpunkt der Sektion wurde die Isolierung mononukleärer Zellen aus den vier Darmabschnitten Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon, sowie dem Nasen-assoziierten lymphatischen Gewebe (NALT, engl. *nasal-associated lymphoid tissue*) durchgeführt. Bei weiblichen Tieren erfolgten zusätzlich Zellisolationen aus Vagina-, Cervix- und Uterusgewebe.

Von der Arbeitsgruppe Prof. Schneider an der Charité Berlin wurden zwei etablierte Protokolle zur Isolierung mononukleärer Zellen aus Darmbiopsien und -resektaten in wesentlichen Punkten modifiziert (siehe Methoden 3.7.3 und 3.7.5). Für die Aufarbeitung aller weiteren mukosalen Gewebe mussten die Protokolle neu entwickelt werden (siehe Methoden 3.7.4/6/7).

Die Zellausbeuten variierten von Tier zu Tier beträchtlich und hingen vor allem bei den SIV-infizierten Tieren von deren Gesundheitszustand ab. In Tabelle 4.1 sind die Mittelwerte der Zellausbeuten nach Etablierung aller Methoden von fünf bis zehn nicht mit SIV infizierten Rhesusaffen dargestellt.

Die Isolierung mononukleärer Zellen aus vier bis sechs Duodenum-Biopsien ergab eine durchschnittlich 20%ig höhere Ausbeute als 12-15 Colon-Biopsien (siehe Tabelle 4.1). Bei der Bronchoalveolar Lavage ist die Zellausbeute unabhängig vom zurück gewonnenen Volumen der Spülflüssigkeit, vielmehr variierte sie von Tier zu Tier.

Aus den Darmresektatmaterial und NALT ließen sich durchschnittlich zwischen 4x10<sup>6</sup> und 44x10<sup>6</sup> mononukleäre Zellen isolieren. Die Lymphozyten-Isolierung aus dem dichten Gewebe des weiblichen Genitaltrakts war schwierig und langwierig, auch bedingt durch die Keratinisierung bei Vagina und Cervix. Dementsprechend wurde der Collagenase-Verdau der Gewebe verlängert und das Enzym in höherer Konzentration eingesetzt als bei

Darmresektaten (siehe Methoden 3.7.6). Bei diesen Geweben ergaben sich durchschnittliche Zellausbeuten von 3,8 - 6,3 x 10<sup>6</sup> Zellen. Eine exakte Feststellung der hormonellen Zyklusphase zum Zeitpunkt der Sektion wurde nicht durchgeführt, jedoch ist die Zahl und Zusammensetzung der Lymphozyten im Genitaltrakt von Rhesusaffen während des Menstruationszyklus konstant (Ma et al., 2001)

Tab. 4.1 Erzielte Ausbeuten mononukleärer Zellen aus ex vivo und zum Zeitpunkt der Sektion gewonnenen mukosalen Geweben von uninfizierten Rhesusaffen

| Gewebe/Probe          | Größe/Anzahl/Volumen              | Zellausbeute (x 10 <sup>6</sup> ) |              |  |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|--|
| Sevienciione          |                                   | Mittelwert                        | Streubereich |  |
| A) BAL- und Biopsiep  | A) BAL- und Biopsieproben (n=10)* |                                   |              |  |
| Duodenum-Biopsien     | 4-6 Biopsien                      | 0,69                              | 0,43 - 0,87  |  |
| Colon-Biopsien        | 12-15 Biospien                    | 0,57                              | 0,24 - 0,66  |  |
| BAL                   | 35-45 ml                          | 3,97                              | 1,3-7,8      |  |
| B) Sektionsproben (n= | B) Sektionsproben (n=5)**         |                                   |              |  |
| Duodenum-Resektat     | gesamter Darmabschnitt            | 4,0                               | 1,4 - 8,8    |  |
|                       | (ca. 5-7 cm)                      |                                   |              |  |
| Jejunum-Resektat      | ca. 15 cm                         | 44,0                              | 7 – 85,5     |  |
| Ileum-Resektat        | gesamter Darmabschnitt            | 12,0                              | 3,3-40,5     |  |
|                       | (ca. 8-10 cm)                     |                                   |              |  |
| Colon-Resektat        | ca. 15 cm                         | 24,2                              | 8 – 46,5     |  |
| Vagina                | gesamtes Gewebe                   | 3,8                               | 1,55 – 7,5   |  |
| Cervix                | gesamtes Gewebe                   | 3,9                               | 1,9 – 5,2    |  |
| Uterus                | gesamtes Gewebe                   | 6,3                               | 1,6 – 15,3   |  |
| NALT                  | gesamtes Gewebe                   | 5,4                               | 4,9 – 6,5    |  |

<sup>\*</sup> Tiere siehe Tabelle 2.9

# 4.2 Untersuchung zur Vergleichbarkeit durchflusszytometrischer Analysen von isolierten mononukleären Zellen aus Darmbiopsien und Darmresektaten

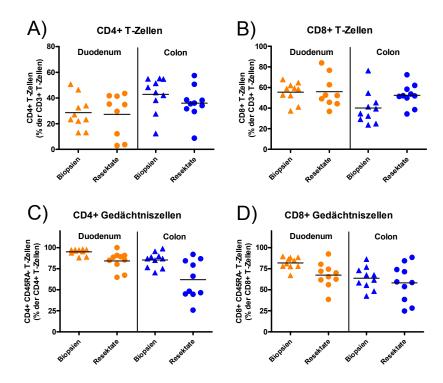
In der Literatur werden häufig durchflusszytometrische Daten aus Biopsie- und Sektionsmaterial gleichwertig behandelt (z.B. Veazey et al., 2000). Für eine exakte Prüfung der Vergleichbarkeit von *ex vivo* bzw. *post mortem* gewonnenen Gewebeproben desselben Organs muss eine parallele Zellisolation und durchflusszytometrische Analyse aus Darmbiopsien und -resektaten des gleichen Tieres zum selben Zeitpunkt erfolgen. Dies war im Rahmen dieser Arbeit unter Standardbedingungen aus logistischen Gründen nur nicht möglich. Um diese Frage annähernd zu beantworten, wurden Daten aus Biopsie- und

<sup>\*\*</sup> Tiere: 11232,14509,13788,11165,7769 siehe Tabelle 2.8

Sektionsmaterial von unterschiedlichen nicht infizierten Tieren miteinander verglichen. Da in dieser Arbeit hauptsächlich T-Zellpopulationen analysiert wurden, ist ein Vergleich der prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen an den T-Lymphoyzten (Abb. 4.1 A+B), sowie der Anteil an CD45RA negativen Gedächtniszellen dieser beiden Populationen (Abb. 4.1 C+D) dargestellt.

Diese Untersuchungen ergaben, dass die prozentualen Anteile an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Duodenumbiopsien und -resektaten gleich waren (Abb. 4.1 A). Bei den Colonbiopsien dagegen wurde ein höherer Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und ein niedrigerer Anteil an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Vergleich zum Colonresektat detektiert (Abb. 4.1 B). Bei der Gegenüberstellung der relativen Anteile an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen konnte bei beiden Darmabschnitten ein höherer Anteil dieser Zellpopulationen in Biopsieproben im Vergleich zum Resektatmaterial ermittelt werden (Abb. 4.1 C+D).

Aus diesen Ergebnissen geht klar hervor, dass erhobene Daten aus Biopsie- und Sektionsmaterial bei der Auswertung getrennt beurteilt werden müssen. Es wurde deshalb in dieser Arbeit darauf verzichtet, unterschiedlich gewonnenes Material desselben Organs miteinander zu vergleichen.



**Abb. 4.1 Vergleich relativer Anteile von T-Zellpopulationen aus intestinalem Biopsie- und Sektions-material von nicht infizierten Tieren.** Dargestellt sind die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B) an den CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Der relative Anteil an CD45RA<sup>-</sup> Gedächtniszellen ist für die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in C) und D) gezeigt. Die Querstriche stellen den Mittelwert der jeweiligen Gruppe dar.

### 4.3 Charakterisierung der physiologischen Lymphozytenzusammensetzung in Blut und mukosalen Geweben bei nicht infizierten Rhesusaffen

Für die Analyse SIV-bedingter Veränderung verschiedener Lymphozytenpopulationen musste zunächst die Normalsituation der mukosalen Gewebe von uninfizierten Tieren analysiert werden. Diese Daten dienten im weiteren Verlauf dieser Arbeit außerdem als Vergleichswerte zu SIV- und RT-SHIV-infizierten Tieren.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung von verschiedenen T-Zellpopulationen. Daher wurde als erstes die Zusammensetzung der Gesamtlymphozytenpopulation aus T-, B- und Natürlichen Killer (NK) Zellen in allen untersuchten mukosalen Geweben bei nicht SIV-infizierten Tieren durchflusszytometrisch bestimmt. Im Anschluss daran wurden die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> und der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an den CD3<sup>+</sup> Lymphozyten-Zellen näher betrachtet. Weiterhin wurde untersucht, wie hoch der Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist, die zusätzlich den SIV-Korezeptor CCR5 (CD195) auf ihrer Oberfläche exprimieren, da diese die Hauptzielzellen für die SIV-Infektion darstellen (Chen et al., 1997). In dieser Arbeit wurden nur Tiere untersucht, die mit den CCR5trophen SIV-Stämmen SIVmac239 oder SIVmac251 bzw. mit RT-SHIV infiziert waren. Für diese Analyse wurde Sektionsmaterial von zehn nicht infizierten Rhesusaffen und die bronchoalveoläre Lavage von weiteren zehn Tieren (siehe Tab. 2.8 und 2.9) verwendet. Parallel erfolgte bei allen Tieren eine durchflusszytometrische Analyse des Blutes, um die mukosalen Kompartimente mit diesen Werten vergleichen zu können. Weiterhin wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Darmabschnitten Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon, sowie den drei Geweben Vagina, Cervix und Uterus aus dem weiblichen Genitaltrakt analysiert.

# 4.3.1 Analyse der relativen Anteile von T- und B-Lymphozyten und der NK-Zellen an der Gesamtlymphozyten-Population

Die Gesamtheit der Lymphozyten besteht aus T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen. In Abbildung 4.2 wurden die relativen Anteile dieser Zellpopulationen anteilig an den Lymphozyten dargestellt.

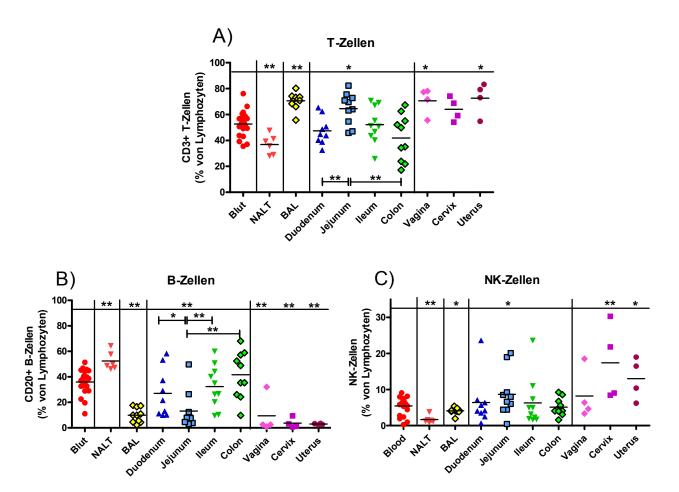
Der Anteil der **T-Zellen** an den Lymphozyten liegt im Blut bei 56 %. BAL, Jejunum, Vagina und Uterus hatten signifikant höhere Anteile an T-Zellen (Abb. 4.2 A). Außerdem konnte bei der Analyse der vier Darmabschnitte untereinander im Jejunum ein signifikant höherer Anteil an T-Zellen im Vergleich zum Colon und Duodenum ermittelt werden. Das

NALT wies im Verhältnis zum Blut als einziges mukosales Gewebe einen signifikant niedrigeren prozentualen Anteil an T-Zellen auf.

In allen Geweben des weiblichen Genitaltrakts, sowie im Jejunum und im BAL war im Vergleich zum Blut der Anteil an **B-Zellen** signifikant niedrigerer (Abb. 4.2 B). Das Jejunum hatte zudem den signifikant niedrigsten Prozentsatz an B-Zellen im Vergleich zu den drei anderen Darmabschnitten. Ein zum Blut signifikant höherer Anteil an B-Zellen wurde nur im NALT festgestellt.

Das Jejunum und die Cervix wiesen einen signifikant höheren Anteil an **NK-Zellen** auf als das Blut (Abb. 4.2 C). Im NALT und BAL-Zellen hatten dagegen einen signifikant niedrigeren Prozentsatz dieser Zellpopulation.

Diese Ergebnisse zeigen, wie grundlegend sich mukosale Gewebe hinsichtlich ihrer prozentualen Lymphozytenzusammensetzung untereinander und vom Blut unterscheiden. Weiterhin wurde bei der Gegenüberstellung der vier Darmabschnitte deutlich, dass sich das Jejunum am stärksten von den übrigen Abschnitten unterscheidet. Dieses wies einen höheren Prozentsatz an T- und NK-Zellen auf, zeigte dafür aber einen geringeren Anteil an B-Zellen. Dagegen konnte im weiblichen Genitaltrakt zwischen den Kompartimenten Vagina, Cervix und Uterus kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

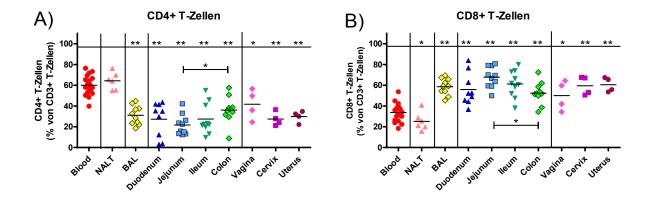


**Abb. 4.2 Relativer Anteil der T-Zellen (A), B-Zellen (B) und NK-Zellen (C) an den Lymphozyten in allen untersuchten mukosalen Geweben.** Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich bei jedem Kompartiment. Die Sterne über dem Querstrich oben in den Grafiken zeigen signifikante Unterschiede zum Blut an. Die Sterne und Querbalken darunter symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001).

# 4.3.2 Analyse der prozentualen Anteile von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten an den T-Zellen

In allen mukosalen Geweben ergab sich ein signifikant geringerer prozentualer Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und ein signifikant höherer Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an den CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Vergleich zum Blut (Abb. 4.3 A+B). Die einzige Ausnahme ist das NALT, bei dem ebenfalls ein signifikant niedrigerer Prozentsatz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt wurde. Zum Blut ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Von den vier Darmabschnitten wies das Jejunum den geringsten Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und den höchsten Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf. Aus diesen Werten ergab sich bei diesen beiden T-Zellpopulationen ein signifikanter Unterschied zwischen Jejunum und Colon.



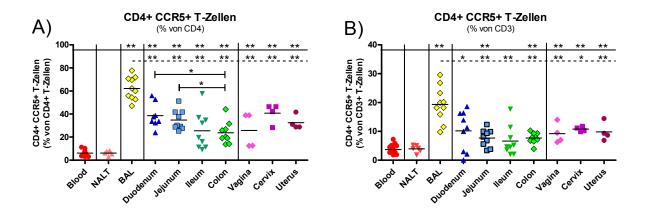
**Abb. 4.3 Prozentualer Anteil der CD4**<sup>+</sup> **(A) und CD8**<sup>+</sup> **T-Zellen (B) an den CD3**<sup>+</sup> **T-Lymphozyten in den untersuchten mukosalen Geweben.** Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich bei jedem Kompartiment. Die Sterne über dem Querstrich oben in den Grafiken zeigen signifikante Unterschiede zum Blut an. Die Sterne und Querbalken darunter symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen(Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001).

### 4.3.3 Analyse der Expression von CCR5 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Zunächst wurden die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen anteilig an den CD4<sup>+</sup> T-Zellen analysiert (Abb. 4.4 A). In allen mukosalen Kompartimenten mit Ausnahme des NALT exprimieren signifikant mehr Zellen CCR5 als im Blut. In den BAL-Zellen wurde zusätzlich ein signifikant höherer Anteil dieser Zellen im Vergleich zu den anderen Kompartimenten beobachtet. Der Vergleich der vier Darmabschnitte ergab im Colon den niedrigsten Anteil an CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen und damit einen signifikanten Unterschied zu Duodenum und Jejunum.

Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse und den in Abschnitt 4.3.2. gezeigten Daten ergab sich die Frage, ob sich die prozentual höheren Anteile der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen (anteilig an den CD4<sup>+</sup> T-Zellen) mit dem niedrigeren Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (anteilig an den CD3<sup>+</sup> Lymphozyten) in den mukosalen Kompartimenten gegenseitig relativieren. Daher wurden die relativen Verhältnisse der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen anteilig an den T-Lymphozyten berechnet (siehe Abb. 4.4 B). Bei dieser Analyse wird deutlich, dass im Vergleich zum Blut nur noch ein signifikanter Unterschied zum Jejunum, Colon und den Geweben des weiblichen Genitaltrakts vorliegt. Der signifikant höhere Anteil der

CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> Zellen im BAL gegenüber allen anderen mukosalen Kompartimenten bleibt bestehen (Abb. 4.4 B).



**Abb. 4.4 Prozentualer Anteil der CD4**<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen in allen untersuchten mukosalen Geweben. Dargestellt sind die Einzelwerte der 20 Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich bei jedem Kompartiment. Die Sterne über dem Querstrich oben in den Grafiken zeigen signifikante Unterschiede zum Blut an; die Sterne in der Zeile darunter (oberhalb des gestrichelten Querstrichs) zeigen signifikante Unterschiede zum BAL an. Die Sterne und Querbalken darunter symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001). A) zeigt die CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen anteilig an den CD4<sup>+</sup> Zellen B) zeigt die CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> T-Zellen anteilig an den T-Lymphozyten

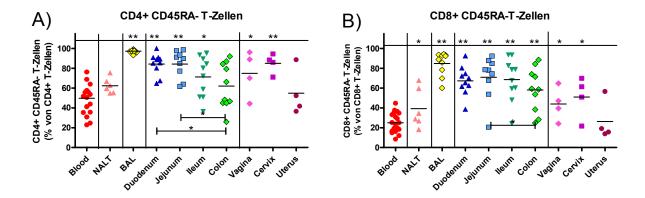
### 4.3.4 Anteil der CD45RA negativen Gedächtniszellen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Blut und in den mukosalen Geweben

Im Darm ist ein hoher Anteil an Gedächtniszellen vorhanden (Zeitz et al., 1991). CD45RO ist eine Isoform von CD45 und wird seit vielen Jahren als Oberflächenmarker zur Untersuchung von Gedächtniszellen verwendet (Akbar et al, 1988; Michie et al, 1992). CD45RA wird auf naïven Zellen exprimiert und geht bei der Differenzierung zum Gedächtniszelltyp verloren. Aus diesem Grund und wegen eines fehlenden kreuzreaktiven Antikörpers gegen simianes CD45RO erfolgte die Definition der Gedächtniszellen über die fehlende Oberflächenexpression von CD45RA. Abb. 4.5 A zeigt, dass der Anteil der CD45RA CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut bei 40% liegt und

Abb. 4.5 A zeigt, dass der Anteil der CD45RA CD4 T-Zellen im Blut bei 40% liegt und in den mukosalen Geweben BAL, Duodenum, Ileum, Jejunum, Vagina und Cervix ein signifikant höherer Anteil dieser Population vorliegt. Weiterhin wurde im Colon der niedrigste Anteil an Gedächtniszellen im Darmtrakt und ein signifikanter Unterschied zu Jejunum und Ileum festgestellt.

Der prozentuale Anteil an CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen war im Vergleich zum Blut in allen mukosalen Geweben, mit Ausnahme des Uterus, signifikant höher (siehe Abb. 4.5 B). Wie bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde auch im Colon der niedrigste Anteil an CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-

zellen festgestellt. Weiterhin ergab sich ein signifikanter Unterschied zum Jejunum, in dem der höchste Prozentsatz an CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> T-Zellen nachgewiesen wurde.



**Abb. 4.5** Prozentuale Anteile der CD45RA negativen Gedächtniszellen an den CD4<sup>+</sup> (A) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B) in den untersuchten mukosalen Geweben. Dargestellt sind die Einzelwerte der 20 Tiere mit dem Mittelwert als Querstrich bei jedem Kompartiment. Die Sterne über dem Querstrich oben in den Grafiken zeigen signifikante Unterschiede zum Blut an. Die Sterne und Querbalken darunter symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001).

Diese Ergebnisse (4.3.2-4) zeigen, dass die mukosalen Gewebe in der Regel niedrigere Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zum Blut aufweisen. Dagegen liegen höhere prozentuale Anteile an CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Gedächtniszellen vor. Das NALT unterschiedet sich als einziges mukosales Gewebe hinsichtlich der verschiedenen CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen nicht vom Blut. Nennenswert ist ebenfalls der höchste Anteil an CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen und Gedächtniszellen im BAL gegenüber allen anderen mukosalen Kompartimenten. Unterschiede zwischen den drei Geweben des weiblichen Genitaltrakts bestanden nicht, im Gegensatz zu den verschiedenen Darmregionen. Das Jejunum zeigte den niedrigsten relativen Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und den höchsten Prozentsatz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber allen anderen Darmabschnitten. Außerdem wurden im Jejunum und Duodenum die meisten CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen (anteilig an den CD4<sup>+</sup> T-Zellen) und CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> Gedächtnis-T-Zellen nachgewiesen, wobei in beiden Populationen ein signifikanter Unterschied zum Colon bestand.

### 4.4 Mikrobizid-Experiment - Teil 1 (SHIVA-1)

Dieses Experiment ist ein von der EU gefördertes Projekt, von dem der erste Teil (SHIVA-1) am Deutschen Primantenzentrum und der zweite Teil (SHIVA-2) am Centre International de Recherches Médicales (Franceville, Gabun) durchgeführt wurde.

Hierbei handelt es sich um die ersten *in vivo* Versuche zur Neuentwicklung eines Mikrobizides (Vaginalgel), das mit einem NNRTI (engl. *non-nuncleosid reverse transkriptase inhibitor*) gegen HIV versetzt war. Durch die lokale Gel-Applikation soll der Wirkstoff (MC1220) intrazellulär die virale Reverse Transkriptase von HIV hemmen und so eine Infektion verhindern.

Rhesusaffen lassen sich nicht mit HIV infizieren. Da der untersuchte Wirkstoff als NNRTI nur die Reverse Transkriptase von HIV hemmt, wurde für die Belastungsinfektion das rekombinante chimäre Virus RT-SHIV verwendet (siehe Kapitel 2.15.2), welches derzeit die einzige Möglichkeit bietet, RT-Inhibitoren für HIV im Rhesusaffen-Modell zu prüfen (Balzarini et al., 1995).

Antivirale Wirkstoffe, die einen nachweislich wirksamen inhibierenden Effekt auf die virale Replikation *in vitro* haben, sollten zur Klärung ihrer Wirksamkeit beim Menschen im Rhesusaffen-Modell überprüft werden (Veazey et al., 2008, Grant et al., 2008).

Neben der näheren Analyse dieses Infektionsmodells und des eigentlichen Experiments, sollten im Verlauf der RT-SHIV-Infektion in der chinesischen Subspezies von *Macaca mulatta* Veränderungen von T-Zellpopulationen in Darm und Genitaltrakt näher untersucht werden.

Das primäre Ziel dieses Versuchs war es jedoch, zwei verschiedene Gelformulierungen, die unterschiedliche Konzentrationen des NNRTI MC1220 enthielten, auf ihre Schutzwirkung vor einer vaginalen Infektion zu prüfen. Das "Einfache Gel" basierte auf einer Microemulsion und das "Komplexe Gel" bestand aus einer Liposomenformulierung, die im Gegensatz zur Microemulsion eine höhere Wirkstoffendkonzentration ermöglichte (siehe Kapitel 2.14.). Beide Gele wurden mit 0,1% MC1200 untersucht (Gruppe 2+5), das "Komplexe Gel" zusätzlich mit einer Konzentration von 0,5% (Gruppe 3). In den zwei Kontrollgruppen (Gruppe 1+4) wurden beide Gele jeweils ohne Zusatz des Wirkstoffs verwendet (siehe Tab 4.2.). In jeder Versuchsgruppe wurden fünf Rhesusaffen chinesischer Herkunft verwendet (siehe Tab 3.1.). Der genaue Ablauf der Gel-Applikation und die Belastungsinfektion sind in Kapitel 3.2. ausführlich beschrieben.

In einem Vorversuch wurde die lokale Verträglichkeit alle Gele untersucht, wobei keine Anzeichen von Irritationen oder Toxizität festgestellt werden konnten. Die genaue Durchführung der Gel-Applikation mit Belastungsinfektion ist in Kapitel 3.2. beschrieben.

Tab. 4.2 Versuchsgruppen mit der verwendeten Gelformulierung und Wirkstoffkonzentration

| Gruppe   | Appliziertes Gel           |
|----------|----------------------------|
| Gruppe 1 | Komplexes Gel              |
| Gruppe 2 | Komplexes Gel, 0,1% MC1220 |
| Gruppe 3 | Komplexes Gel, 0,5% MC1220 |
| Gruppe 4 | Einfaches Gel              |
| Gruppe 5 | Einfaches Gel, 0,1% MC1220 |

#### 4.4.1 Bestimmung der Viruslast nach Belastungsinfektion

Die Viruslast der Rhesusaffen wurde im Blutplasma bis Woche 8 nach vaginaler Belastungsinfektion mit RT-SHIV quantitativ als Anzahl viraler RNA-Kopien im Abstand von ein bis zwei Wochen bestimmt. Das Experiment wurde zwischen Woche 9 und 17 beendet und mit der damit verbundenen Euthanasie der Rhesusaffen erfolgte die letzte Bestimmung der Viruslast. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

In den Gruppen 1, 2, 4 und 5 waren jeweils vier von fünf Tieren infiziert und zeigten eine Spitzenvirämie zwischen Woche 2 und 6 von bis zu 1,23 x 10<sup>7</sup> viralen RNA-Kopien pro ml Plasma. Bei den Tieren 13566, 13078, 13572 aus Gruppen 1, 2 und 5 konnte im gesamten Verlauf kein Virus nachgewiesen werden. Das Tier 13089 in Gruppe 4 zeigte nur in der Woche 6 nach Belastungsinfektion eine messbare Viruslast von 6,9 x 10<sup>2</sup> Kopien pro ml Plasma. Bei drei von fünf Tieren in Gruppe 5, die das "Komplexe Gel" mit der höchsten Wirkstoffkonzentration von 0,5% MC1220 erhielten, war keine virale RNA im Plasma festzustellen.

Somit konnte kein nennenswerter Unterschied zwischen dem "Einfachen Gel" und dem "Komplexen Gel" mit jeweils 0,1% MC1220 bei der Anzahl an Tieren mit nachweisbaren viralen RNA-Kopien im Plasma festgestellt werden. Ebenso ergaben sich keine Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollgruppen mit dem entsprechenden Gel ohne Wirkstoff. Diese Ergebnisse zeigten allerdings auch, dass mit dem "Komplex Gel" 0,5% MC1220 ein deutlicher Schutz vor Infektion im Vergleich zu den anderen Gruppen erreicht wird.

Da die RT-SHIV-Infektion in Rhesusaffen chinesischer Herkunft bisher noch nicht beschrieben ist und die Viruslast im Versuchsverlauf in den Tieren teilweise recht unterschiedlich verlief, wurden in weiteren Experimenten der Infektionsstatus bessere charakterisiert.

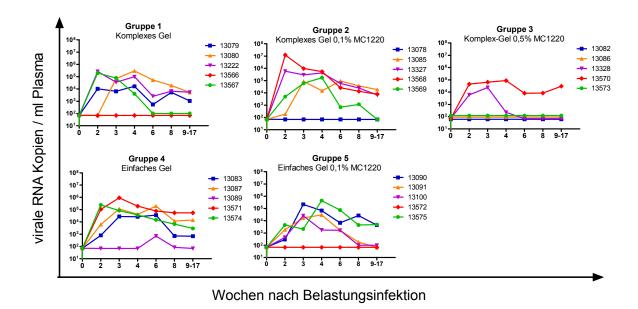


Abb. 4.6 Anzahl der viralen RNA-Kopien pro ml Blutplasma der einzelnen Tiere in allen Versuchsgruppen im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion

### 4.4.2 Bestimmung der zellassoziierten Viruslast durch Virusreisolierung und Nachweis INFy sezernierender T-Zellen nach SIV-AT2-Stimulation

Zum Zeitpunkt der Sektion wurde in verschiedenen Organen die zellassoziierte Viruslast quantifiziert, um vor allem bei Tieren ohne messbare virale RNA im Plasma eine lokale transiente Virusreplikation in verschiedenen Organen auszuschließen. Es wurde eine Virusreisolierung von PBMC und mononukleären Zellen aus Milz, Vagina sowie den axillären, mesenterialen und iliakalen Lymphknoten durchgeführt. Eine Kokultivierung von vaginalen Lymphozyten war nicht möglich, da es nach kurzer Zeit zu Kontaminationen kam (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde mittels ELISPOT die INFγ-Sekretion von PBMC und isolierten mononukleären Zellen aus Lymphknoten nach Stimulation mit chemisch inaktiviertem SIV (SIV-AT-2) überprüft.

Bei beiden Experimenten wurden die Ergebnisse nur qualitativ bewertet. Diese Ergebnisse sind für alle Tiere einschließlich ihrer individuellen Spitzenvirämie in Tab. 4.3 zusammengefasst.

Von insgesamt 19 Tieren mit nachweisbarer viraler RNA im Plasma war auch bei 17 Rhesusaffen eine Virusreisolierung in den untersuchten Organen erfolgreich. Bei den Tieren 13567 und 13569, mit nachweisbarer RNA-Viruslast im Plasma bis Woche 6 (Abb.

4.6), war zum Zeitpunkt der Sektion kein zellassoziiertes infektiöses Virus durch Virusreisolierung aus PBMC und Organen nachweisbar. Es lies sich jedoch eine virusspezifische INFγ-Sekretion nachweisen (siehe Tab. 4.3). Bei den Tieren 13566, 13082 und 13086 konnten weder virale RNA-Kopien im Plasma noch infektiöses Virus aus PBMC oder Organen reisoliert werden. Dennoch zeigten auch diese Tiere eine virusspezifische INFγ-Sekretion in einem der beiden untersuchten Lymphknoten.

Der jeweilige Status "infiziert" oder "geschützt" der Tiere wurde nach folgenden Kriterien beurteilt:

- <u>infizierte Tiere</u>: virale RNA-Kopien im Plasma während des Versuchsverlaufs
- geschützte Tiere: keine virale RNA-Kopien im Plasma während des Versuchsverlaufs und keine Nachweis von zellassoziiertem Virus in den mittels Virusreisolierung untersuchten Organen

Nach diesen Kriterien konnte in Gruppe 3 durch Applikation des "Komplexen Gels" mit 0,5% MC1220 eindeutig der höchste Schutz vor einer Infektion festgestellt werden. In der Gruppe 4 gab es kein geschütztes Tier und in den Gruppen 1, 2 und 4 jeweils nur eines von fünf (siehe Tab. 4.4).

Tab. 4.3 Virale und immunologische Parameter aller Versuchstiere aus SHIVA-1 nach vaginaler RT-SHIV Exposition

| nummer<br>Gruppe |     | Spitzenvirämie                    |   | Nachweis von zell-<br>assoziiertem Virus<br>(Virusreisolierung) |      |       |        |            | Virus-<br>spezifische<br>INFγ Antwort* |       |            | Infektions-<br>status |
|------------------|-----|-----------------------------------|---|---|------|-------|--------|------------|--|-------|------------|-----------------------|
| Tiernummer       | Gru | RNA<br>Kopien<br>pro ml<br>Plasma | Woche<br>nach Be-<br>lastungs-<br>infektion | PBMC  | Milz | LN ax | ry mes | LN iliakal | PBMC                                   | LN ax | LN iliakal | Infek<br>sta          |
| 13079            | 1   | $1,62 \times 10^4$                | 4   | +   | +    | +     | +      | +          | n.d.                                   | n.d.  | n.d.       | infiziert             |
| 13080            | 1   | $2,92 \times 10^5$                | 4   | +   | +    | +     | +      | +          | n.d.                                   | n.d.  | n.d.       | infiziert             |
| 13222            | 1   | $2,67 \times 10^5$                | 2   | +   | +    | +     | +      | +          | +                                      | +     | +          | infiziert             |
| 13566            | 1   | -                                 | -   | -   | -    | -     | -      | -          | -                                      | -     | +          | geschützt             |
| 13567            | 1   | $1,97 \times 10^5$                | 2   | -   | -    | -     | -      | -          | -                                      | +     | +          | infiziert             |
| 13078            | 2   | -                                 | -   | -   | -    | -     | -      | -          | -                                      | n.d.  | n.d.       | geschützt             |
| 13085            | 2   | $9,21 \times 10^4$                | 6   | +   | +    | +     | +      | +          | n.d.                                   | n.d.  | n.d.       | infiziert             |
| 13327            | 2   | $5,76 \times 10^5$                | 2   | +   | +    | +     | +      | +          | n.d.                                   | n.d.  | n.d.       | infiziert             |
| 13568            | 2   | $1,23 \times 10^7$                | 2   | -   | +    | +     | +      | +          | +                                      | +     | +          | infiziert             |
| 13569            | 2   | $1,74 \times 10^5$                | 4   | -   | -    | -     | -      | -          | +                                      | +     | +          | infiziert             |
| 13082            | 3   | -                                 | -   | -   | -    | -     | -      | -          | -                                      | +     | -          | geschützt             |
| 13086            | 3   | -                                 | -   | -   | -    | -     | -      | -          | -                                      | -     | +          | geschützt             |
| 13328            | 3   | $2,38 \times 10^4$                | 3   | -   | -    | +     | +      | +          | +                                      | +     | +          | infiziert             |
| 13570            | 3   | $8,73 \times 10^4$                | 4   | +   | +    | +     | +      | +          | +                                      | +     | +          | infiziert             |
| 13573            | 3   | -                                 | -   | -   | -    | -     | -      | -          | -                                      | -     | +          | geschützt             |
| 13083            | 4   | $2,75 \times 10^4$                | 3   | +   | +    | -     | +      | -          | +                                      | +     | +          | infiziert             |
| 13087            | 4   | $1,94 \times 10^5$                | 6   | +   | +    | +     | +      | +          | n.d.                                   | n.d.  | n.d.       | infiziert             |
| 13089            | 4   | $6.9 \times 10^2$                 | 6   | +   | +    | +     | +      | +          | +                                      | +     | -          | infiziert             |
| 13571            | 4   | $9,23 \times 10^5$                | 3   | +   | +    | +     | +      | +          | +                                      | -     | -          | infiziert             |
| 13574            | 4   | $8,41 \times 10^4$                | 2   | +   | +    | +     | +      | +          | +                                      | +     | +          | infiziert             |
| 13090            | 5   | $2,16 \times 10^5$                | 3   | +   | +    | +     | +      | +          | -                                      | +     | +          | infiziert             |
| 13091            | 5   | $3,03 \times 10^4$                | 4   | +   | +    | +     | +      | +          | -                                      | +     | +          | infiziert             |
| 13100            | 5   | $2,57 \times 10^4$                | 3   | -   | +    | +     | -      | +          | +                                      | -     | +          | infiziert             |
| 13572            | 5   | -                                 | -   | -   | -    | -     | -      | -          | -                                      | -     | -          | geschützt             |
| 13575            | 5   | $4,43 \times 10^5$                | 4   | -   | +    | +     | +      | +          | +                                      | _     | +          | infiziert             |

<sup>\*</sup> ELISPOT nach SIV-AT-2 Stimulation

Tab. 4.4 Schutzrate der Versuchsgruppen nach vaginaler RT-SHIV Exposition

| Gruppe                        | Geschützte Tiere /<br>Gesamtzahl der Tiere | Schutzrate |  |  |
|-------------------------------|--|------------|--|--|
| Gruppe 1 (Komplexes Gel)      | 1/5  | 20%        |  |  |
| Gruppe 2 (Komplexes Gel 0,1%) | 1/5  | 20%        |  |  |
| Gruppe 3 (Komplexes Gel 0,5%) | 3/5  | 60%        |  |  |
| Gruppe 4 (Einfaches Gel)      | 0/5  | 0%         |  |  |
| Gruppe 5 (Einfaches Gel 0,1%) | 1/5  | 20%        |  |  |

**n.d.**, nicht durchgeführt; **LN**, Lymphknoten (engl. *lymph node*); **ax**, axillar; **mes**, mesenterial;

<sup>+,</sup> positives Ergebnis (zellassoziiertes Virus nachweisbar bzw. positive INFγ-Sekretion nach SIV-AT-2 Stimulation)

<sup>-,</sup> negatives Ergebnis (kein zellassoziiertes Virus nachweisbar bzw. keine INF $\gamma$ -Sekretion nach SIV-AT-2 Stimulation)

#### 4.5 Mikrobizid-Experiment - Teil 2 (SHIVA-2)

In der ersten Versuchsreihe wurde mit einer Schutzrate von 60% der höchste Schutz vor Infektion mit dem "Komplexen Gel" 0,5% MC1220 erzielt und damit eine Wirkstoffdosisabhängigkeit festgestellt. Da eine weitere Erhöhung der Wirkstoffendkonzentration in dem "Einfachen Gel" wegen der chemischen Löslichkeit nicht möglich war, wurde im folgenden Versuch das "Komplex Gel" mit einer MC1220 Konzentration von 1,5% untersucht. In einer weiteren Tiergruppe wurde das "Komplex Gel" mit 0,5% MC1220 parallel dazu erneut appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt, wie im ersten Experiment (SHIVA-1), nur das "Komplexe Gel" ohne Zusatz von MC1220. Die Gelapplikation sowie die Belastungsinfektion wurden bei den Tieren analog zu SHIVA-1 durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.).

#### 4.5.1 Bestimmung der Viruslast nach Belastungsinfektion

Die Viruslast der Tiere wurde bis Woche 8 nach vaginaler Belastungsinfektion mit RT-SHIV quantitativ als Anzahl viraler RNA Kopien im Blutplasma im Abstand von ein bis zwei Wochen bestimmt (Abb. 4.7). Das Experiment wurde zwischen Woche 14 und 16 beendet, mit der Sektion der Rhesusaffen erfolgte die letzte Bestimmung der Viruslast.

Wie bereits im Experiment SHIVA-1 festgestellt, waren auch hier in der Kontrollgruppe (Gruppe 1) vier von fünf Tieren infiziert und zeigten eine Spitzenvirämie zwischen Woche 2 und 4 nach Belastungsinfektion. Bei der Gruppe 2 mit dem Komplex-Gel 0,5% MC1220 konnte bei zwei von vier Tieren keine virale RNA im Versuchsverlauf nachgewiesen werden. Auch in der Gruppe 3, in der die höhere Wirkstoffkonzentration von 1,5% MC1220 untersucht wurde, wiesen nur zwei von fünf Tieren im Versuchsverlauf keine Viruslast auf.

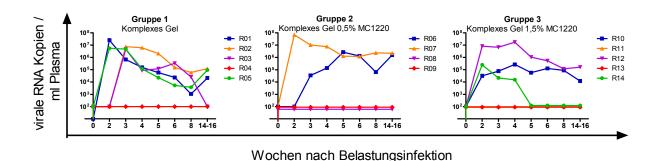


Abb. 4.7 Anzahl der viralen RNA-Kopien pro ml Blutplasma für alle Tiere im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion

#### 4.5.2 Bestimmung der zellassoziierten Viruslast durch Virusreisolierung

Zum Zeitpunkt der Sektion wurde von verschiedenen Organen die zellassoziierte Viruslast quantifiziert, um auch bei Tieren ohne messbare virale RNA Beladung im Blut eine lokale, transiente Virusreplikation in verschiedenen Organen auszuschließen. Es wurde eine Virusreisolierung von PBMC und isolierten Zellen aus der Milz und den axillären, mesenterialen und iliakalen Lymphknoten durchgeführt. Ein Nachweis von INFγ-Sekretion nach Stimulation mit viralen Antigenen in PBMC oder Lymphknotenzellen konnte nicht durchgeführt werden. Diese Methode des ELISPOT war am Centre International de Recherches Médicales nicht etabliert und ein Transport der kryo-konservierten Proben zum Deutschen Primatenzentrum war aus logistischen Gründen noch nicht möglich.

Der jeweilige Status "infiziert" oder "geschützt" der Tiere wurde nach folgenden Kriterien beurteilt:

- infizierte Tiere: virale RNA-Kopien im Plasma während des Versuchsverlaufs
- geschützte Tiere: keine virale RNA-Kopien im Plasma während des Versuchsverlaufs und kein Nachweis von zellassoziiertem Virus in den mittels Virusreisolierung untersuchten Organen

In den Gruppen 2 und 3 waren jeweils nur zwei von vier bzw. fünf Tieren vor einer Infektion geschützt und zeigten somit vergleichbare Schutzraten von 40 bzw. 50% (siehe Tab. 4.6). Folglich konnte durch eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration des NNRTI MC1220 im "Komplexen Gel" von 0,5% auf 1,5% kein erhöhter Schutz vor einer RT-SHIV-Infektion erzielt werden.

 $Tab.\ 4.5\ \ Virale\ und\ immunologische\ Parameter\ aller\ Versuchstiere\ aus\ SHIVA-1\ nach\ vaginaler\ RT-SHIV\ Exposition$ 

| mmer       | Gruppe | Spitzenv                          | irämie                                      | Nachweis von zell-<br>assoziiertem Virus |      |       |        |           | tus       |
|------------|--------|-----------------------------------|---|--|------|-------|--------|-----------|-----------|
| Tiernummer | Gru    | RNA<br>Kopien<br>pro ml<br>Plasma | Woche<br>nach Be-<br>lastungs-<br>infektion | PBMC                                     | Milz | LN ax | LN mes | LN liakal | Status    |
| R01        | 1      | $2,55 \times 10^7$                | 2   | +  | -    | +     | -      | +         | infiziert |
| R02        | 1      | $7,54 \times 10^6$                | 3   | +  | +    | +     | +      | +         | infiziert |
| R03        | 1      | $4,57 \times 10^6$                | 3   | -  | -    | +     | +      | +         | infiziert |
| R04        | 1      | -                                 | -   | -  | -    | -     | -      | -         | geschützt |
| R05        | 1      | $5,54 \times 10^6$                | 2   | +  | +    | +     | +      | -         | infiziert |
| R06        | 2      | $2,67 \times 10^6$                | 5   | +  | +    | +     | +      | +         | infiziert |
| R07        | 2      | $6,94 \times 10^7$                | 2   | +  | +    | +     | +      | +         | infiziert |
| R08        | 2      | -                                 | -   | -  | -    | -     | _      | -         | geschützt |
| R09        | 2      | -                                 | -   | -  | -    | -     | -      | -         | geschützt |
| R10        | 3      | $2,67 \times 10^5$                | 4   | -  | -    | -     | -      | -         | infiziert |
| R11        | 3      | -                                 | -   | -  | _    | -     | _      | -         | geschützt |
| R12        | 3      | $1,75 \times 10^7$                | 4   | -  | +    | +     | -      | -         | infiziert |
| R13        | 3      |                                   | -   | -  | -    | -     | _      | -         | geschützt |
| R14        | 3      | $2,5 \times 10^5$                 | 2   | -  | -    | -     | -      | -         | infiziert |

**n.d.**, nicht durchgeführt; **LN**, Lymphknoten (engl. lymph node); **ax**, axillar; **mes**, mesenterial;

Tab. 4.6 Schutzrate der Versuchsgruppen nach vaginaler RT-SHIV Exposition

| Gruppe                        | Geschützte Tiere /<br>Gesamtzahl der Tiere | Schutzrate |  |  |
|-------------------------------|--|------------|--|--|
| Gruppe 1 (Komplexes Gel)      | 1/5  | 20%        |  |  |
| Gruppe 2 (Komplexes Gel 0,5%) | 2/4  | 50%        |  |  |
| Gruppe 3 (Komplexes Gel 1,5%) | 2/5  | 40%        |  |  |

<sup>+,</sup> positives Ergebnis (zellassoziiertes Virus nachweisbar)

<sup>-,</sup> negatives Ergebnis (kein zellassoziiertes Virus nachweisbar)

# 4.6 Charakterisierung der RT-SHIV-Infektion in Rhesusaffen chinesischer Herkunft unter besonderer Berücksichtigung mukosaler Kompartimente

Bisher wurde RT-SHIV noch nicht in Rhesusaffen chinesischer Herkunft verwendet. In der Literatur ist beschrieben, dass bei RT-SHIV-infizierten Rhesusaffen indischer Herkunft ohne systemische Therapie mit RT-Inhibitoren ein CD4-Verlust im Blut ähnlich wie bei SIVmac festzustellen ist (North et al. 2005; Van Rompay et al. 2007). Von Rhesusaffen chinesischer Herkunft ist jedoch bekannt, dass sie einen milderen Krankheitsverlauf nach SIV-Infektion zeigen (Ling et al., 2002). Daher wurde dieses Mikrobizid-Experiment zusätzlich dazu genutzt, die RT-SHIV-Infektion in Blut und mukosalen Geweben von Rhesusaffen chinesischer Herkunft genauer zu analysieren.

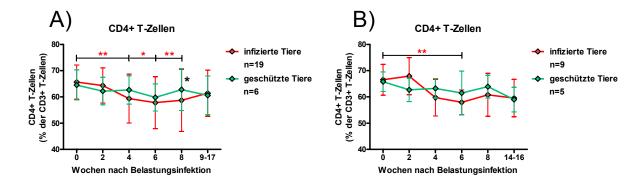
Die Tiere aus beiden Versuchsreihen (SHIVA-1 und SHIVA-2) wurde hierzu in die zwei Gruppen "infiziert" und "geschützt" eingeteilt. Alle folgenden Daten, die im Versuchsverlauf oder zum Zeitpunkt der Sektion erhoben wurden, sind nach diesem Gesichtspunkt analysiert worden. Ausführlich Informationen über die durchgeführten Experimente und Zellisolationen sind Tabelle 2.7 zu entnehmen.

### 4.6.1 Durchflusszytometrische Analyse der zirkulierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten während der Infektion

Der prozentuale Anteil der zirkulierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde mit der polychromatischen Durchflusszytometrie im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion bestimmt. Von jedem Tier wurde ein autologer Präwert unmittelbar vor der Belastungsinfektion erhoben.

#### 1. Bestimmung des prozentualen Anteils der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Blut

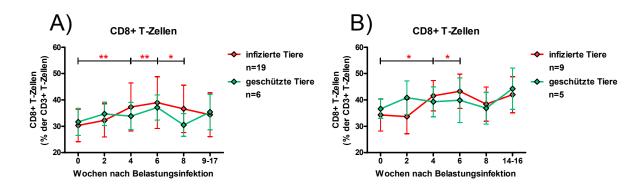
In der akuten Phase der Infektion (Woche 4-8) zeigten die infizierten Tiere vom SHIVA-1-Experiment eine signifikante Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation im Vergleich zum autologen Präwert, aber ein signifikanter Unterschied zu den geschützten Tieren ergab sich nur zu Woche 8. Im SHIVA-2-Experiment konnte nur zu Woche 6 nach Belastungsinfektion eine signifikante Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zum Präwert und kein Unterschied zu den geschützten Tieren bestimmt werden.



**Abb. 4.8 Prozentualer Anteil der CD4**<sup>+</sup> T-Zellen an den T-Lymphozyten im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion als Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Querbalken mit den roten Sternen zeigen signifikante Unterschiede von Woche 0 zu der entsprechenden Woche nach Belastungsinfektion der infizierten Tiere an und der schwarze Stern gibt einen signifikanten Unterschied zwischen den infizierten und geschützten Tieren an (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001). Teil A) zeigt den Verlauf der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von SHIVA-1 Teil B) zeigt den Verlauf der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von SHIVA-2.

### 2. Bestimmung des prozentualen Anteils der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Blut

In den infizierten Tieren von SHIVA-1 stieg in der akuten Phase der Infektion (Woche 4-8) der prozentuale Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation im Vergleich zum Präwert signifikant an. Im SHIVA-2 konnte nur zu Woche 4 und 6 nach Belastungsinfektion ein signifikanter Anstieg der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zum Präwert detektiert werden (Abb. 4.9 B). In beiden Experimenten wurde kein Unterschied zwischen den infizierten und den geschützten Tieren festgestellt.

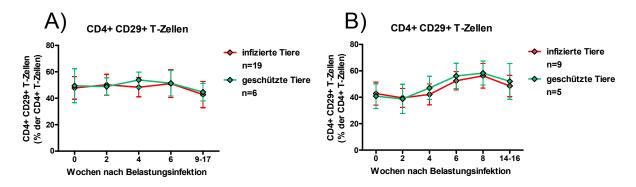


**Abb. 4.9 Prozentualer Anteil der CD8**<sup>+</sup> T-Zellen an den T-Lymphozyten im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion als Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Querbalken mit den roten Sternen zeigen signifikante Unterschiede von Woche 0 zu der entsprechenden Woche nach Belastungsinfektion der infizierten Tiere an (Mann-Whitney-Test (\* p<0,05, \*\*p<0,001). Teil A) zeigt den Verlauf der CD8<sup>+</sup> T-Zellen von SHIVA-1. Teil B) zeigt den Verlauf der CD8<sup>+</sup> T-Zellen von SHIVA-2.

### 3. Bestimmung des prozentualen Anteils der CD29 hochpositiven CD4<sup>+</sup> Gedächtnis T-Lymphozyten im Blut

Für die SIV-Infektion in Rhesusaffen ist beschrieben, dass es in Woche 2 nach Belastungsinfektion zu einem Abfall der prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup>CD29 hochpositiven T-Zellen kommt (Sopper et al., 2000). Im weiteren Verlauf der Infektion zeigen Tiere, die innerhalb weniger Monate AIDS-ähnliche Symptome entwickelten (Progressoren), einen ausgeprägten und stetigen Verlust dieser Zellen. Tiere mit einem milderen Krankheitsverlauf weisen dagegen gleich bleibende Anteile dieser Zellpopulation auf.

In beiden Experimenten war während des Versuchsverlaufs kein Unterschied der CD4<sup>+</sup> CD29 hoch-positiven Gedächtniszellen zwischen den RT-SHIV-infizierten Tieren und den geschützten Tieren zu sehen (Abb. 4.10 A+B).



**Abb. 4.10 Prozentualer Anteil der CD4<sup>+</sup> CD29 hochpositiven T-Zellen an den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion als Mittelwert der jeweiligen Gruppe.** Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Teil A) zeigt den Verlauf der CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> T-Zellen von SHIVA-1, Teil B) zeigt den Verlauf der CD4<sup>+</sup> CD29<sup>+</sup> T-Zellen von SHIVA-2.

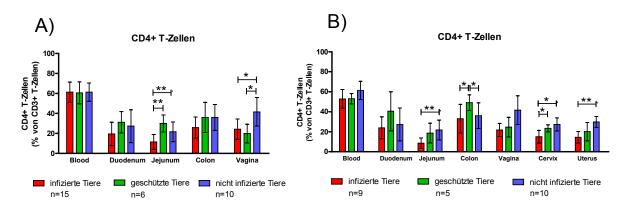
### 4.6.2 Bestimmung des prozentualen Anteils der CD4<sup>+</sup> und der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in verschiedenen mukosalen Geweben zum Zeitpunkt der Sektion

Im Blut der RT-SHIV-infizierten Rhesusaffen konnte eine leichte Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden (Abb. 4.9). Ob es bei diesen Tieren zu einer Veränderung der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation in den mukosalen Geweben gekommen ist, wurde zum Zeitpunkt der Sektion untersucht. Dazu wurden mononukleäre Zellen aus dem Vaginalepithel und den Darmabschnitten Duodenum, Jejunum und Colon von infizierten und geschützten Tieren isoliert. Bei SHIVA-2 wurden zusätzlich Zellisolationen aus Cervix- und Uterusgewebe durchgeführt. Im Anschluss wurde der prozentuale Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen an den CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten durchflusszytometrisch im Vergleich zum Blut

analysiert. Die Ergebnisse der geschützten und infizierten Tiere wurden miteinander und mit zehn nicht infizierten Rhesusaffen verglichen, um auch mögliche Veränderungen der Zellpopulationen im Genitaltrakt aufgrund der vaginalen Belastungsinfektion bei den geschützten Tieren feststellen zu können.

#### CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten

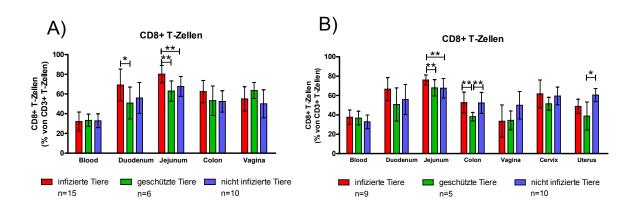
In beiden Versuchsreihen wiesen die infizierten Tiere im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren einen hoch signifikant niedrigeren Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Jejunum auf (Abb. 4.11 A+B). Ein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten und den geschützten Tieren konnte nur in SHIVA-1 beobachtet werden. Hier konnte auch eine Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Vagina der infizierten und geschützten Tieren festgestellt werden (Abb. 4.11 A). In SHIVA-2 ist diese Reduktion ebenfalls zu sehen, war jedoch zu den Kontrolltieren nicht statistisch signifikant (Abb. 4.11B). Des Weiteren konnte in SHIVA-2 eine signifikante Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Cervix und im Uterus von infizierten Tieren im Vergleich zu nicht infizierten Tieren festgestellt werden (Abb. 4.11 B). Bei der Cervix ergab sich zusätzlich eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den geschützten Tieren.



**Abb. 4.11 Anteil der CD4**<sup>+</sup> **T-Lymphozyten an den T-Zellen der verschiedenen Organe zum Zeitpunkt der Sektion.** A) Tiere aus der Versuchsreihe SHIVA-1, B) Tiere aus der Versuchsreihe SHIVA-2. Zum Vergleich dienten jeweils 10 nicht infizierte Tiere. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den entsprechenden Tiergruppen sind mit Querbalken und Sternen gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001).

#### CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Im Jejunum beider Versuchsreihen bestand in den infizierten Tieren ein signifikant höherer Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den geschützten und uninfizierten Tieren (Abb. 4.12 A+B). Ähnliche Unterschiede ergaben sich auch im Duodenum. Es konnte jedoch nur im SHIVA-1 Experiment ein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten und den geschützten Tieren festgestellt werden (Abb. 4.12 A). In SHIVA-2 zeigten die geschützten Tiere im Colon und im Uterus einen signifikant niedrigeren Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber nicht infizierten Tieren (Abb. 4.12 B).



**Abb. 4.12** Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten an den T-Zellen der verschiedenen Organe zum Zeitpunkt der Sektion. A) Tiere aus der Versuchsreihe SHIVA-1, B) Tiere aus der Versuchsreihe SHIVA-2. Zum Vergleich dienten jeweils 10 nicht infizierte Tiere. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den entsprechenden Tiergruppen sind mit Querbalken und Sternen gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001).

Nur in SHIVA-2 unterschieden sich die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Colon signifikant zwischen nicht infizierten und geschützten Tieren. Diese Versuchsreihe wurde in Gabun durchgeführt, während die Vergleichswerte der nicht infizierten Rhesusaffen von Tieren aus dem DPZ stammen. Die ungünstigeren Hygienebedingungen in Gabun sowie das Vorkommen anderer parasitärer und bakterieller Erreger könnte einen Einfluss auf die Lymphozytenverhältnisse im Colon haben und diese Unterschiede erklären.

# 4.7 Durchflusszytometrische Charakterisierung von systemischen und mukosalen Lymphozytenpopulationen bei LTNPs

Einige SIV-infizierte Rhesusaffen sind in der Lage, nach der Spitzenvirämie die systemische Viruslast weitestgehend zu kontrollieren. Das führt dazu, dass die chronische klinisch unauffällige Phase der Infektion deutlich länger ist als bei Tieren mit einem normalen Infektionsverlauf. Diese Tiere werden als LTNP (engl. *long-term non-progressors*) bezeichnet. Ein wesentlicher Faktor für die natürliche Kontrolle der Virusreplikation kann der genetische MHC-Hintergrund sein. Das Vorliegen des MHC-Klasse-I-Allels (*Mamu\*A01*) ist mit einem längeren Überleben bei SIV-infizierten Rhesusaffen indischer Herkunft assoziiert (Mühl et al., 2002). Bei allen untersuchten Rhesusaffen wurde eine MHC-Typsierung bezüglich dieses MHC-Klasse-I-Allels *Mamu\*A01* durchgeführt. Tiere mit diesem genetischen Hintergrund sind in Abb. 4.13 A+B mit (A01) hinter der Tiernummer gekennzeichnet.

Hier wurde eine umfangreiche Untersuchung der LTNPs *ex vivo* durchgeführt. Dies sollte ein deutlicheres Bild über weitere immunologische Mechanismen liefern, die speziell in diesen Tieren der Kontrolle der Viruslast zu Grunde liegen. Genauere Kenntnisse über den Mechanismus der natürlichen und effektiven Kontrolle der Virusreplikation sind essentiell für die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes.

Der Fokus lag hauptsächlich auf der Charakterisierung verschiedener mukosaler Gewebe, da diese eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen. Hierzu wurden drei mukosale Kompartimente untersucht. Die zwei Darmabschnitte Duodenum und Colon wurden mittels Biopsie-Entnahme und die Situation in der Lunge durch Gewinnung einer bronchoalveolären Lavage analysiert. Es sollten Unterschiede zwischen LTNPs und Tieren mit einer hohen Viruslast (Progressoren) identifiziert werden. Die Ergebnisse aller infizierten Tiere wurden zusätzlich mit Daten von uninfizierten Tieren verglichen.

Die in dieser Querschnittsstudie untersuchten Tiere sind ausschließlich indischer Herkunft. Diese haben im Gegensatz zu chinesischen Rhesusaffen in der Regel einen schnelleren Krankheitsverlauf und entwickeln früher AIDS-ähnliche Symptome (Ling et al., 2002; Trichel et al., 2002). Trotzdem war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, eine große Gruppe von Tieren indischer Herkunft zu charakterisieren, die eine natürliche Reduktion der Viruslast zeigten.

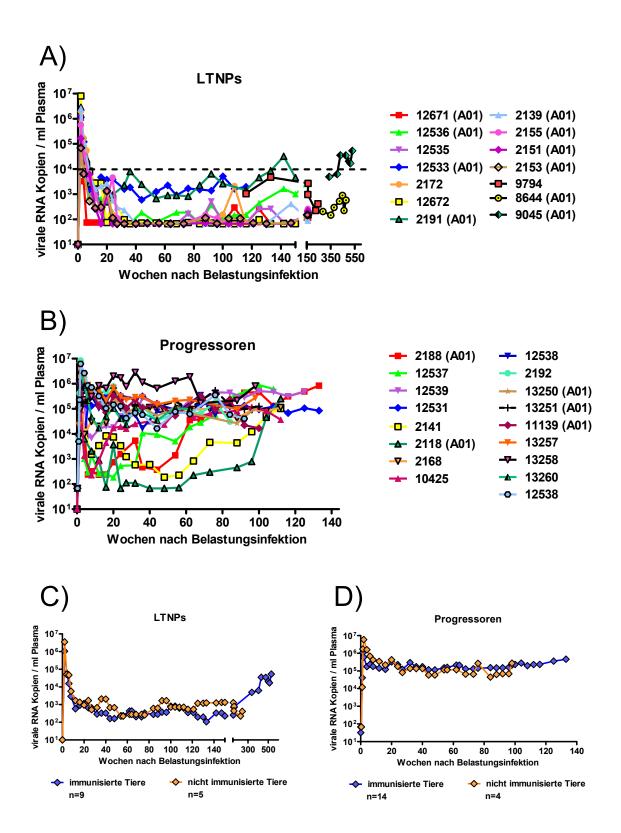
Diese Tiere stammten aus verschiedenen Vakzine-Experimenten und wurden teils vor der Belastungsinfektion unterschiedlich immunisiert. Daher ergab sich ein unterschiedlicher Beobachtungszeitraum bei den verschiedenen Rhesusaffen. Die Informationen über die Infektionsroute, der verwendete Virusstamm sowie teilweise vorher erfolgte Immunisierungen sind in der Tabelle 2.9 zu finden.

### 4.7.1 Unterteilung der Tiergruppen in LTNPs und Progressoren aufgrund der Viruslast nach Belastungsinfektion

Die Gruppe der LTNPs (n=14) wurde über die Kontrolle der systemischen Viruslast bis mindestens Woche 100 nach Belastungsinfektion definiert. Die Viruslast lag nach der Spitzenvirämie konstant unter 1x10<sup>4</sup> viralen RNA-Kopien pro ml Plasma. Als einzige Ausnahme hiervon wurde das Tier 9045 mit einer konstanten Viruslast bei etwa 3x10<sup>4</sup> Kopien pro ml Plasma mit in diese Gruppe genommen, da es über eine ungewöhnlich lange chronische Phase von 10 Jahren klinisch unauffällig war. Von den übrigen Tieren kontrollierten neun die Viruslast an der Nachweisgrenze und bei vier Tieren lag sie im quantifizierbaren Bereich von 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> Kopien pro ml Plasma. Bei den Tieren 2191 und 9045 wurde im Laufe der Experimente ein Anstieg der Viruslast festgestellt und sie entwickelten AIDS-ähnliche Symptome. Unmittelbar nach dem Verlust der Viruslastkontrolle wurden diese Tiere aus der Gruppe der LTNPs herausgenommen. Die unter 4.7. dargestellten Daten der LTNPs wurden zwischen Woche 99 und 107 nach Belastungsinfektion erhoben (Ausnahmen: 9794: Woche 209; 8644: Woche 444; 9045: Woche 495 nach Belastungsinfektion).

Die Rhesusaffen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Viruslast von über  $10^4$  Kopien pro ml Plasma hatten, wurden als Progressoren definiert. Diese Tiere waren zu keinem Zeitpunkt oder nur über einen relativ kurzen Zeitraum von einigen Wochen in der Lage, die Viruslast zu reduzieren.

In Abb. 4.13 A+B ist die Viruslast für die einzelnen Tiere der LTNPs und Progressoren im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion dargestellt. Um einen möglichen Einfluss einer vorher erfolgten Immunisierung auf den spätern Verlauf der Viruslast festzustellen, wurden die Mittelwerte der Viruslasten von den immunisierten und den nicht immunisierten Tiere der LTNPs und der Progressoren gegenübergestellt (Abb. 4.13 C+D). Es konnte nur in der akuten Phase eine niedrigere RNA-Viruslast im Plasma zwischen den immunisierten und den nicht immunisierten festgestellt werden (Schulte et al., 2009). Im weiteren Infektionsverlauf bestand jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen innerhalb der LTNPs oder der Progressoren.

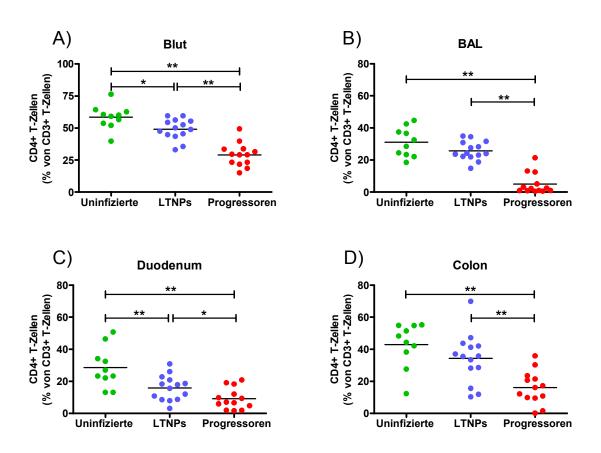


**Abb. 4.13 Viruslast von LTNPs und Progressoren im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion.** A) zeigt die Viruslast der einzelnen LTNPs. Für die Tiere 9794, 8644, 9045 sind keine Daten von der akuten Phase der Infektion verfügbar. B) zeigt die Viruslast der einzelnen Progressoren; C) und D) zeigen die Mittelwerte der immunisierten und der nicht immunisierten Tiere in der Gruppe der LTNPs bzw. der Progressoren. Der 2.Teil der x-Achse in C) beinhaltet nur die drei Tiere 9794 (nicht immunisiert) und 8644, 9045 (immunisiert). A01, Tiere mit dem MHC-Klasse-I-Allel *Mamu\*A01*.

### 4.7.2 Bestimmung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Blut und mukosalen Geweben von LTNPs und Progressoren

Der drastische Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Darm bzw. in mukosalen Geweben während der akuten Infektion wurde oft als irreversibel beschrieben (Veazey et al., 1998; Li et al., 2005; Mattapallil et al., 2005). Neuere Publikationen zeigten, dass es durchaus auch zu einer Repopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen kommen kann, was als prognostischer Marker für einen milderen Krankheitsverlauf angesehen wird (Nishimura et al, 2007; Ling et al. 2007). Als erste Untersuchung der LTNPs wurden daher die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut und den drei verschiedenen mukosalen Gewebe bestimmt.

Im Blut und Duodenum von LTNPs waren die Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu uninfizierten Tieren signifikant niedrigerer (Abb. 4.14 A+C). Im BAL und Colon dagegen konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 4.14 B+D). Die Progressoren wiesen in allen untersuchten Kompartimenten eine signifikante Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den beiden anderen Tiergruppen auf (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14 Relative Anteile der CD4**<sup>+</sup> **T-Zellen in Blut, BAL, Duodenum und Colon von uninfizierten Tieren, LTNPs und Progressoren.** Die Querstriche geben den Mittelwert der jeweiligen Gruppe an. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001).

### 4.7.3 Korrelation der prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit der RNA-Viruslast im Plasma

Hier wurde ein direkter Einfluss der systemischen Viruslast aller Tiere auf die Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut und den mukosalen Geweben analysiert. Die Anzahl der viralen RNA-Kopien im Plasma wurde mit den prozentualen Anteilen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den unterschiedlichen Kompartimenten ins Verhältnis gesetzt.

Es wurde eine hoch signifikante negative Korrelation der prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut und allen mukosalen Geweben zu der systemischen RNA-Viruslast zum Zeitpunkt der Probenentnahme festgestellt (Abb. 4.15).

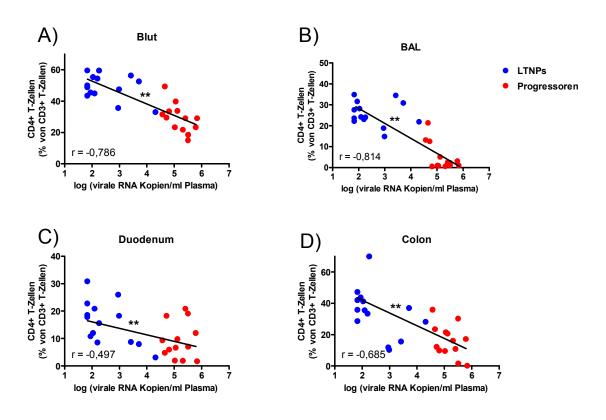
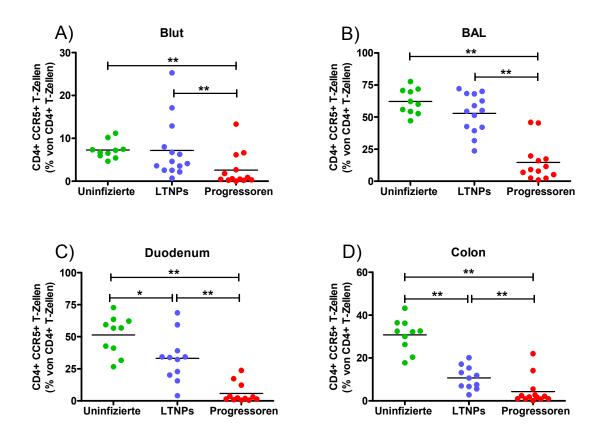


Abb. 4.15 Korrelation der viralen Plasma-RNA Beladung mit den prozentualen Anteilen der CD4 $^{+}$  T-Zellen in Blut (A), BAL (B), Duodenum (C) und Colon (D) von allen infizierten Tieren. r gibt den Spearman-Korrelationskoeffizienten an (\*\* = p < 0,001).

## 4.7.4 Untersuchung der Expression von CCR5 auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Blut und mukosalen Geweben von LTNPs und Progressoren

Der Chemokinrezeptor CCR5 dient den hier verwendeten SIV-Stämmen (SIVmac239 und SIVmac251) als Korezeptor für den Viruseintritt in die Zelle (Chen et al., 1997). Hier wurden die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Lymphozyten analysiert, da sie die Hauptzielzellen von SIV sind.

In den beiden Darmabschnitten von LTNPs war diese Zellpopulation im Vergleich zu nicht infizierten Tieren signifikant reduziert (Abb. 4.16 C+D). In allen Kompartimenten der Progressoren wurde ein signifikant niedrigerer Anteil CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu LTNPs und nicht infizierten Rhesusaffen festgestellt (Abb. 4.16).



**Abb. 4.16 Relative Anteile der CCR5 Expression auf CD4**<sup>+</sup> **T-Zellen in Blut (A), BAL (B), Duodenum (C) und Colon (D) von uninfizierten Tieren, LTNPs und Progressoren.** Die Querstriche geben den Mittelwert der jeweiligen Gruppe an. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001).

### 4.7.5 Korrelation der prozentualen Anteile der CCR5-exprimierenden CD4<sup>+</sup> TZellen mit der Viruslast

Auch hier wurde ein direkter Einfluss der systemischen Viruslast aller Tiere auf die Anteile der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen im Blut und den mukosalen Geweben analysiert. Die Anzahl der viralen RNA-Kopien im Plasma wurde mit den Anteilen der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen in den unterschiedlichen Kompartimenten ins Verhältnis gesetzt.

Es zeigte sich eine hoch signifikante negative Korrelation der prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen im Blut und allen mukosalen Organen zu der systemischen RNA-Viruslast zum Zeitpunkt der Probenentnahme (Abb. 4.17).

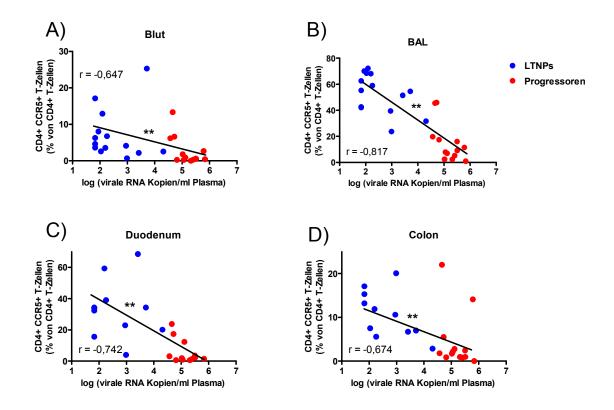
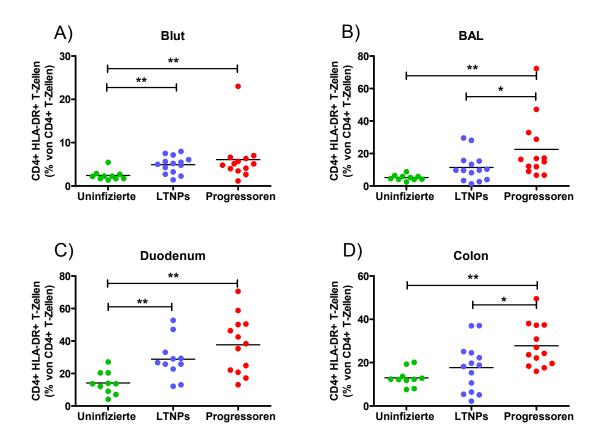


Abb. 4.17 Korrelation der viralen Plasma-RNA mit den prozentualen Anteilen der CCR5 exprimierenden CD4 $^+$  T-Zellen in Blut (A), BAL (B), Duodenum (C) und Colon (D) von allen infizierten Tieren. r gibt den Spearman-Korrelationskoeffizienten an (\*\* = p < 0,001).

### 4.7.6 Untersuchung des Aktivierungsstatus von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Blut und mukosalen Geweben von LTNPs und Progressoren

Der Aktivierungsstatus von T-Zellen kann über das MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DR bestimmt werden. Dies wird auf der Oberfläche von antigenpräsentierenen Zellen exprimiert und ist auf aktivierte Zellen beschränkt (Ko et al., 1979).

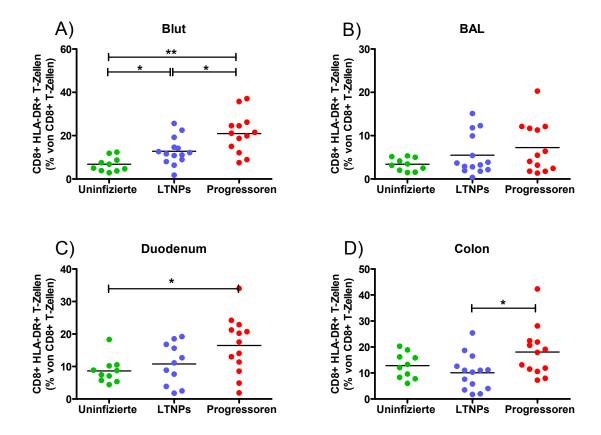
Die Expression von HLA-DR auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist bei LTNPs in Blut und Duodenum im Vergleich zu uninfizierten Tieren signifikant erhöht (Abb. 4.18 A+C). Bei Progressoren konnte dies in allen Kompartimenten festgestellt werden, jedoch wurden signifikante Unterschiede zwischen LTNPs und Progressoren nur im BAL und Colon beobachtet (Abb. 4.18).



**Abb. 4.18 Relative Anteile an aktivierten CD4**<sup>+</sup> T-Zellen in Blut (A), BAL (B), Duodenum (C) und Colon (D) von uninfizierten Tieren, LTNPs und Progressoren. Gezeigt ist der prozentuale Anteil an HLA-DR-positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die Querstriche geben den Mittelwert der jeweiligen Gruppe an. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet, Mann-Whitney-Test (\* p<0,05, \*\*p<0,001).

### 4.7.7 Untersuchung des Aktivierungsstatus von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Blut und mukosalen Geweben von LTNPs und Progressoren

LTNPs zeigen im Vergleich zu uninfizierten Tieren nur im Blut eine signifikant erhöhte Expression von HLA-DR auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 4.19 A). Für Progressoren ließ sich zu den LTNPs eine weitere signifikante Erhöhung der CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen beobachten. Im BAL war ein ähnlicher Trend zu erkennen, jedoch war hier keine statistische Signifikanz gegeben (Abb. 4.19 B). Die Progressoren wiesen auch in den beiden Darmabschnitten eine erhöhte HLA-DR Expression auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf. Dies ergab im Duodenum einen signifikanten Unterschied zu den uninfizierten Tieren und im Colon zu den LTNPs (Abb. 4.19 C+D).



**Abb. 4.19 Relative Anteile an aktivierten CD8**<sup>+</sup> T-Zellen in Blut (A), BAL (B), Duodenum (C) und Colon (D) von uninfizierten Tieren, LTNPs und Progressoren. Gezeigt ist der prozentuale Anteil an HLA-DR positiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Querstriche geben den Mittelwert der jeweiligen Gruppe an. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet, Mann-Whitney-Test (\* p<0,05, \*\*p<0,001).

#### 4.7.8 Korrelation der Viruslast mit der HLA-DR-Expression auf T-Zellen

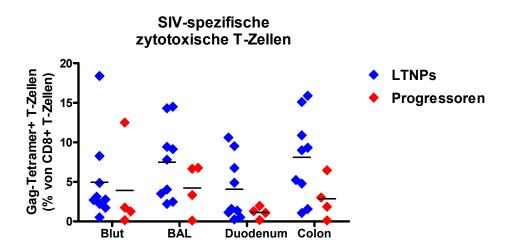
Die HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen im BAL korrelierte signifikant mit der RNA-Viruslast im Plasma. Bei den relativen Anteilen der CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen konnte nur im Colon eine Korrelation zur Viruslast festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

## 4.7.9 Bestimmung von SIV-spezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Blut und mukosalen Geweben von LTNPs und Progressoren

Rhesusaffen mit dem MHC-Klasse-I-Allel *MamuA\*01* sind in der Lage, SIV-spezifische zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CTL, engl. *cytotoxic T-lymphocytes*) zu bilden, die die CM9-Peptidsequenz (Gag181-189, CTPYDINQM) des SIV Gag-Proteins erkennen. Diese Zellen besitzen lytische Aktivität und können mit Hilfe von synthetisch hergestellten tetrameren MHC-Komplexen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Letvin et al., 1999) (siehe Kapitel 2.8.). In der vorliegenden Arbeit wurde die lytische Aktivität nicht nochmals

überprüft.

SIV-spezifische Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, im Weiteren als CTL bezeichnet, konnten bei neun *MamuA\*01* positiven LTNPs und vier *MamuA\*01* positiven Progressoren analysiert werden. Die LTNPs wiesen im Blut und Duodenum 4 - 5% CTLs auf, dagegen waren die Anteile im Colon und BAL mit 7,5 – 8% deutlich höher. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die Progressoren zeigten in allen Kompartimenten niedrigere Anteile der SIV-spezifischen T-Zellen als die LTNPs. Aber auch diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abb. 4.20 Prozentualer Anteil SIV-spezifischer zytotoxischer CD8**<sup>+</sup> **T-Lymphozyten in LTNPs und Progressoren.** Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile an Gag-Tetramer<sup>+</sup> T-Zellen an den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Blut, BAL, Duodenum und Colon von neun LTNPs und vier Progressoren.

#### 4.7.10 Zusammenfassung von Ergebnisteil 4.7

Die wichtigsten Resultate des Ergebnisteils 4.7 sind in Tab. 4.7 zusammengefasst. Dieser ist zu entnehmen, dass grundsätzlich eine Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem höheren Anteil an aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (HLA-DR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen) und einem niedrigeren Anteil an virusspezifischen T-Zellen assoziiert ist. Dies ist im Blut und Duodenum von LTNPs, sowie in allen Kompartimenten von Progressoren zu beobachten. Im BAL und Colon von LTNPs waren die Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der HLA-DR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit den prozentualen Anteilen in nicht infizierten Tieren vergleichbar. Zudem waren hier höhere Anteile an virusspezifischen zytotoxischen T-Zellen als im Blut und Duodenum festzustellen.

Bei der Betrachtung aller SIV-infizierten Tiere wurde zudem beobachtet, dass eine negative signifikante Korrelation zwischen der RNA-Viruslast im Plasma und den

prozentualen Anteilen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen bestand.

Blut **BAL** Duodenum Colon **LTNPs** LTNPs Prog. LTNPs Prog. Prog. Prog. **LTNPs** CD4<sup>+</sup> T-Zellen HLA-DR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen Virusspezifische 7,5% 1,1% 5% 3.9% 4,2% 4.1% 8.1% 2.9% **CTLs** 

Tab. 4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse 4.7.2/4.7.5/4.7.8

Ein normaler prozentualer Anteil der T-Zellpopulation im Vergleich zu uninfizierten Tieren ist mit einem Gleichheitszeichen (=), ein höherer oder niedrigerer Anteil ist mit einem diagonalen Pfeil nach oben bzw. unten symbolisiert; 2 Pfeile bedeutet starker Anstieg bzw. Abfall. In der letzten Zeile sind die prozentualen Durchschnittswerte der virusspezifischen T-Zellen (anteilig an den CD8<sup>+</sup> T-Zellen) genannt. CTL, Tetramer positive, Gag-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen; Prog., Progressoren

#### 4.8 Langzeitanalyse der LTNPs

### 4.8.1 Mukosale und systemische Veränderungen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und SIVspezifischen zytotoxischen T-Zellen

Da die infektionsbedingten Schäden in den mukosalen Geweben einen entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben, ist eine alleinige Analyse der systemischen Veränderungen im Infektionsverlauf nicht ausreichend.

Daher wurden elf LTNPs über eine Zeitspanne von fast zwei Jahren beobachtet. Es erfolgte mehrmals eine Untersuchung des Blutes und der mukosalen Gewebe zu verschiedenen Zeitpunkten. Dies diente dazu, Veränderungen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der relativen Anteile an SIV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen in mukosalen Kompartimenten zusammen mit der Viruslast zu analysieren. Das Tier 2191 entwickelte sich während dieses Zeitraums vom LTNP zum Progressor.

In Abb. 4.21 A ist der Verlauf der relativen Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen von fünf Tieren exemplarisch zusammen mit der Viruslast grafisch dargestellt. Vier dieser Tiere hatten den genetischen MHC-Hintergrund *MamuA\*01*. Die Analyse der prozentualen Anteile der SIV-spezifischen CTLs dieser Tiere ist in Abb. 4.21 B gezeigt. Informationen über die Ergebnisse der übrigen Tier sind in Tab. 4.8 zu finden.

Das Tier **2139** kontrolliert während des gesamten Untersuchungszeitraums die RNA-Viruslast gleichbleibend an der Nachweisgrenze. Parallel dazu blieben die relativen Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls konstant. Dies war ebenfalls bei Tier 2153 zu sehen und ist repräsentativ für sieben weitere LTNPs: 2151, 2155, 8644, 9794, 12671,12672 (siehe Tab. 4.8).

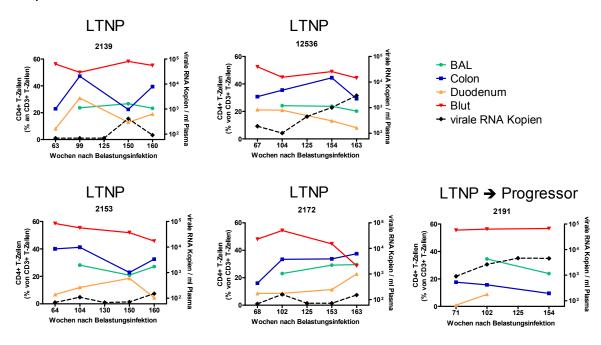
Die Analyse der zytotoxischen T-Zellen ergab, dass die Anteile dieser Zellpopulation bei Tier 2139 und vier weiteren LTNPs (2151, 2155, 8644, 12671) im Untersuchungszeitraum konstant blieben (Abb. 4.21 B). Das Tier 2153 zeigte trotz gleich bleibender Viruslast als einziges einen deutlichen Anstieg der CTLs in Colon und BAL zwischen Woche 64 bzw. 104 zu Woche 160 nach Belastungsinfektion.

Im Gegensatz zu den übrigen LTNPs wiesen die Tiere 12536 und 2172 weitere Unterschiede auf. Von Woche 100 zu 160 zeigte das Tier 12536 einen kontinuierlichen Anstieg der Viruslast bei gleichbleibenden prozentualen Anteilen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut und den mukosalen Geweben. Mit dem Anstieg der Viruslast ging jedoch ein drastischer Verlust der SIV-spezifischen CTLs in allen untersuchten Geweben einher. Die Anteile der CTLs lagen zu Woche 160 nach Belastungsinfektion jedoch immer noch im Bereich von 1-2%. Weiterhin war das Tier 12536 bis über Woche 200 nach Belastungsinfektion hinaus klinisch unauffällig.

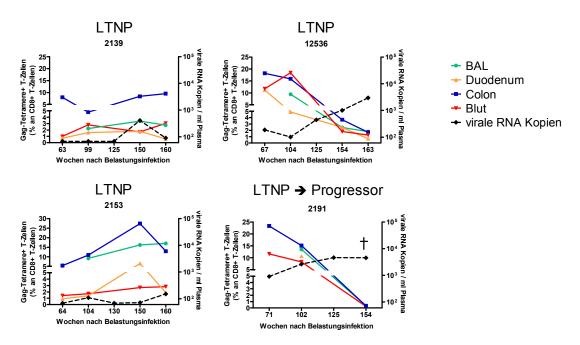
Bei dem Tier **2172** bewegte sich die Viruslast im Untersuchungszeitraum ebenfalls an der Nachweisgrenze und die Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in allen mukosalen Geweben blieben stabil. Jedoch wurde eine stetige langsame Reduktion an systemischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet (Abb. 4.21 A).

Während des Untersuchungszeitraums entwickelte sich das Tier **2191** als einziges Tier vom LTNP zum Progressor. Es kontrollierte die Viruslast nach der Spitzenvirämie konstant bei etwa 10<sup>3</sup> viralen RNA Kopien pro ml Plasma (siehe Abb. 4.13 A). Obwohl die Daten für Duodenum und BAL nicht vollständig sind, ist in Abb. 4.21 A zu erkennen, dass der leichte Anstieg der Viruslast in keinem Kompartiment eine ausgeprägte Reduktion an CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Folge hatte. Hingegen konnte bei diesem Tier ein kompletter Verlust der SIV-spezifischen CTLs beobachtet werden (Abb. 4.21 B). Das Tier wurde in der Woche 154 nach Belastungsinfektion aufgrund AIDS-ähnlicher Symptome euthanasiert.

### A) CD4+ T-Zellen



### B) SIV-spezifische zytotoxische T-Zellen



**Abb. 4.21** Relative Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A) und SIV-spezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> Lymphozyten (B) in Blut, BAL, Duodenum und Colon von fünf LTNPs im Verlauf. Die Anteile der CD4<sup>+</sup> und SIV-spezifischen CTL sind auf der linken y-Achse aufgetragen, die viralen RNA-Kopien pro ml Plasma auf der rechten y-Achse. Tiernummern und Status der Infektion sind über jeder Grafik angegeben.

**BAL** Duodenum Colon Viruslast Blut (ggf. mit viralen Tier RNA-Kopien/ml CD4 CTL CD4 CTL CD4 CTL CD4 CTL Plasma) 2139\* → 2151\* 2153\* 2155\* 2172 2191\*  $9x10^2 - 5x10^3$ 8644\* 9794 12536\*  $2x10^2 - 3x10^3$ 12671\* 12672

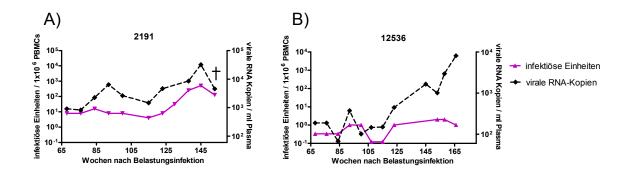
Tab. 4.8 Langzeitanalyse von elf SIV-infizierten Tieren

Konstante Werte der viralen RNA-Kopien/ml Plasma, der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und SIV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen sind mit einem waagerechten Pfeil gekennzeichnet. Ein Anstieg oder Abfall ist mit einem diagonalen Pfeil nach oben bzw. unten symbolisiert; 2 Pfeile bedeutet starker Anstieg bzw. Abfall. CTL=Tetramer positive / Gag-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen; *MamuA01\**-Tiere sind mit einem Stern hinter der Tiernummer gekennzeichnet.

### 4.8.2 Vergleich von RNA-Viruslast im Plasma und der Anzahl an infektiösen Zellen bei den Tieren 12536 und 2191

Die beiden Tiere **12536 und 2191** zeigten beide einen massiven Verlust der CTL und eine steigende Viruslast. Jedoch nur das Tier 2191 wies zusätzlich einen leichten Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf und entwickelte AIDS-ähnliche Symptome. Eine essentielle Frage war nun, was abgesehen von dem leichten Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei 2191 das Fortschreiten der Krankheit erklärt. Daher wurde die RNA-Viruslast im Plasma mit der Anzahl an infektiösen Zellen in dem Untersuchungszeitraum verglichen.

Bei dem Tier 2191 ging die ansteigende RNA-Viruslast im Plasma mit einem gleichzeitigen Anstieg der infektiösen Zellen einher (Abb. 4.22 A). Dagegen blieb bei dem Rhesusaffen 12536 trotz steigender viraler RNA-Kopien im Plasma die Anzahl der infektiösen Zellen gleich (Abb. 4.22 B).



**Abb. 4.22 Verlauf der viralen RNA-Kopien im Plasma und der infektiösen Zellen von den Tieren 2191 (A) und 12536 (B).** Auf der linken y-Achse sind jeweils die infektiösen Zellen pro 1x10<sup>6</sup> PBMC, und auf der rechten y-Achse die viralen RNA-Kopien pro ml Plasma aufgetragen. † Sektion des Tieres aufgrund AIDS-ähnlicher Symptome

# 4.9 Nachweis von virusspezfischen humoralen und zellulären Immunantworten im Blut von LTNPs und Progressoren

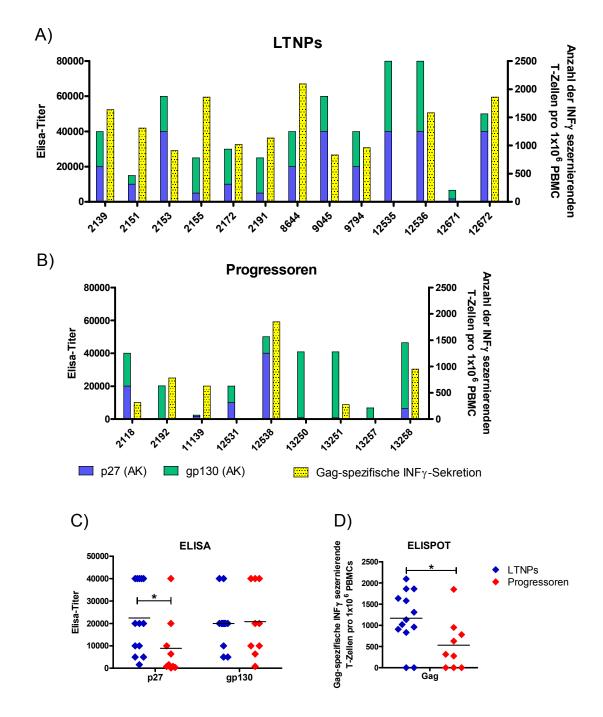
Die in 4.7.5. und 4.8. verwendete Tetramer-Technik ermöglicht nur den Nachweis von Gag-spezifischen zytotoxischen T-Zellen bei *Mamu\*A01*-Tieren, die gegen das SIV-CM9-Peptid gerichtet sind. Im Folgenden wurden virusspezifische Immunantworten in allen Tieren mit weiteren Methoden untersucht. Zur Analyse der SIV-spezifischen peripheren Antikörper wurde ein ELISA gegen das Oberflächenprotein gp130 und das Kapsidprotein p27 von SIV durchgeführt. Die zelluläre Immunantwort wurde über die Anzahl an IFNγ-sezernierenden Zellen nach Stimulation mit SIV Gag-Peptiden mit dem ELISPOT quantifiziert. Die Anzahl der INFγ-sekretierenden Zellen lässt indirekt auf die Stärke der virusspezifischen zytotoxischen T-Zellantwort schließen.

In Abb. 4.22 A sind die Ergebnisse von ELISA und ELISPOT der einzelnen LTNPs gezeigt. Elf von 13 Tieren wiesen sowohl eine zelluläre als auch eine humorale virusspezifische Immunantwort auf. Von diesen elf Tieren zeigten drei (2153, 9045, 12536) eine stärkere Antikörper-Antwort und drei (2151, 2155, 8644) eine stärkere zelluläre Immunreaktion. Nur bei zwei Rhesusaffen konnte keine INFγ-Sekretion nach Antigensimulation (12535 und 12671) nachgewiesen werden.

Alle hier untersuchten Progressoren hatten eine SIV-spezifische humorale Immunantwort, aber nur sechs der neun Tiere zeigten auch eine zelluläre Immunantwort (Abb. 4.23 B).

Der Vergleich der beiden Tiergruppen ergab bei Progressoren sowohl eine signifikant niedrigere humorale Antwort gegen p27, als auch eine signifikant geringere zelluläre INFγ-Antwort nach Gag-Stimulation im Vergleich zu den LTNPs (siehe Abb. 4.23 C+D)

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei den LTNPs eine balancierte humorale Immunantwort gegen p27 und gp130 zusammen mit einer zellulären INFγ-Sekretion mit einer Kontrolle der Viruslast assoziiert ist.



**Abb. 4.23 Humorale und zelluläre SIV-spezifische Immunantwort in LTNPs und Progressoren.** Es sind für die LTNPs (A) und die Progressoren (B) die ELISA-Titer gegen p27 (blau) und gp130 (grün) additiv, sowie die Anzahl der INFγ-sezernierenden Zellen pro 1x10<sup>6</sup> PBMC nach Gag-Stimulation (gelb) jeweils als Einzelwerte für jedes Tier gezeigt. In C) und D) ist ein Vergleich dieser Antworten zwischen LTNPs und Progressoren dargestellt. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001).

# 4.10 Nachweis von Zytokin-produzierenden T-Lymphozyten mit Hilfe der polyfunktionalen intrazellulären Zytokin-Färbung

Die Ergebnisse aus 4.9. zeigten, dass eine zelluläre und humorale Immunantwort gegen Gag einen entscheidenden Beitrag zur Kontrolle der Virusreplikation liefert. Für die detailliertere Analyse der zellulären Immunantwort wurde eine intrazelluläre Zytokin-Färbung (ICS, engl. *intracellular cytokine staining*) durchgeführt. Diese Methode bietet die Option, die Sekretion mehrerer Zytokine gleichzeitig zu messen und somit auch polyfunktionale Zellen zu analysieren. Außerdem ist es möglich, zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zytokin sekretierenden T-Zellen zu unterscheiden. Es wurde ein ICS mit PBMC durchgeführt, zur Untersuchung der mukosalen zellulären Immunantwort wurden BAL-Zellen verwendet. Eine Analyse von Darmzellen war vor allem wegen der geringen Zellausbeute bei Biopsien nicht möglich.

Das ICS wurde mit LTNPs (n=13) und Progressoren (n=9) durchgeführt und mit uninfizierten Tieren (n=10) verglichen (siehe Tab. 2.9). Die Zytokinproduktion in den  $CD4^+$  und  $CD8^+CD45RA^-$  Gedächtnis-T-Zellen wurde genauer analysiert. Es wurden die drei Zytokine INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL2 nachgewiesen und bei der Auswertung wurde zwischen einfach positiven und mehrfach positiven (polyfunktionalen) T-Zellen unterschieden. Einfach positiv waren Zellen, die nur eines der untersuchten Zytokine (INF $\gamma$  oder TNF $\alpha$  oder IL2) produzierten. Als polyfunktional wurden die Zellen definiert, die in der Lage waren, zwei oder alle drei Zytokine (INF $\gamma$ +TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ +IL2, IL2+TNF $\alpha$  oder INF $\gamma$ +TNF $\alpha$ +IL2) zu produzieren.

# 4.10.1 Bestimmung von Zytokin-produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen in Blut und BAL von nicht infizierten Tieren nach polyklonaler (unspezifischer) Stimulation

Zunächst wurde untersucht, ob sich PBMC und BAL-Zellen in ihrem Anteil an Zytokinproduzierenden Zellen oder deren Potential zur Polyfunktionalität unterscheiden.

Hierfür wurden PBMC und BAL-Zellen von nicht infizierten Tieren mit SEB (Staphyloccocus Enterotoxin B) stimuliert. Es wurde der Gesamtanteil an einfach positiven und polyfunktionalen Zellen anteilig an den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen analysiert. Abb. 4.24 ist zu entnehmen, dass im BAL hoch signifikant mehr CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zytokin-produzierende Gedächtnis T-Zellen vorhanden waren als in PBMC. Dieses galt für die Population der einfach positiven und der polyfunktionalen Zellen. Weiterhin waren im BAL beider T-Zellpopulationen signifikant höhere Anteile an polyfunktionalen Zellen als

einfach positive Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Lunge, als mukosales Gewebe, einerseits durch die Menge an Zytokin-produzierenden Zellen deutlich vom Blut unterscheidet. Andererseits geht zusätzlich daraus hervor, dass die BAL-Zellen ein deutlich höheres Potential zur Polyfunktionalität besitzen als PBMC.

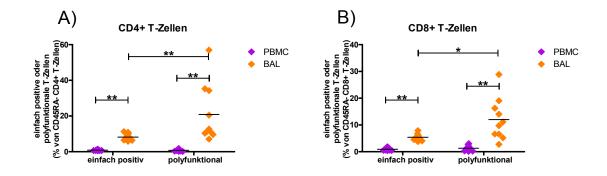


Abb. 4.24 Anteile der einfach positiven und polyfunktionalen Zytokin-produzierenden CD4 $^+$  (A) und CD8 $^+$  (B) Gedächtnis T-Zellen in PBMC und BAL von uninfizierten Tieren nach SEB-Stimulation. Dargestellt ist jeweils der Gesamtanteil an Gedächtniszellen, die nur ein Zytokin produzieren (INF $\gamma$  oder TNF $\alpha$  oder IL2) und der Gesamtanteil derer, die zwei oder drei Zytokine produzieren. Die Querstriche geben den Mittelwert an, mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001).

# 4.10.2 Bestimmung von Zytokin-produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen in Blut und BAL von LTNPs und Progressoren nach polyklonaler (unspezifischer) Stimulation

Als nächstes wurden die Anteile an Zytokin-produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen von LTNPs und Progressoren nach polyklonaler Stimulation durch SEB mit den Daten der uninfizierten Rhesusaffen (aus 4.10.1) verglichen. Die fortgeschrittene infektionsbedingte Reduktion an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im BAL macht eine Charakterisierung dieser Zellpopulation in Progressoren schwierig. Die prozentualen Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen lagen im BAL durchschnittlich bei etwa 5% (siehe Abb. 4.14 B), so dass eine geringe Anzahl an Zytokinpositiven Zellen ein hoher prozentualer Anteil bedeutet. Dieser Aspekt ist bei der Betrachtung der folgenden Ergebnisse der CD4<sup>+</sup> BAL-Zellen von Progressoren zu berücksichtigen.

#### CD4<sup>+</sup> Zytokin-produzierende Gedächtniszellen

In Abb. 4.25 ist zu sehen, dass die LTNPs deutlich mehr polyfunktionale und einfach positive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den PBMC aufwiesen als die uninfizierten Tiere. Die Progressoren hatten vergleichbare Prozentsätze wie die uninfizierten Tiere (Abb. 4.25 A+B). Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zu diesen oder den LTNPs festgestellt.

Im BAL zeigten die Progressoren signifikant niedrigere Anteile an einfach positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen als die LTNPs und die nicht infizierten Tiere, sowie weniger polyfunktionale CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten als die uninfizierten Tiere (Abb. 4.25 D+E).

Bei der Betrachtung der Summenverhältnisse von einfach positiven und polyfunktionalen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten konnte für die LTNPs ein signifikant höherer Anteil im Blut im Vergleich zu uninfizierten Tieren festgestellt werden. Im BAL dagegen waren die Anteile signifikant niedriger im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren, jedoch noch signifikant höher als bei den Progressoren (Abb. 4.25 C+F).

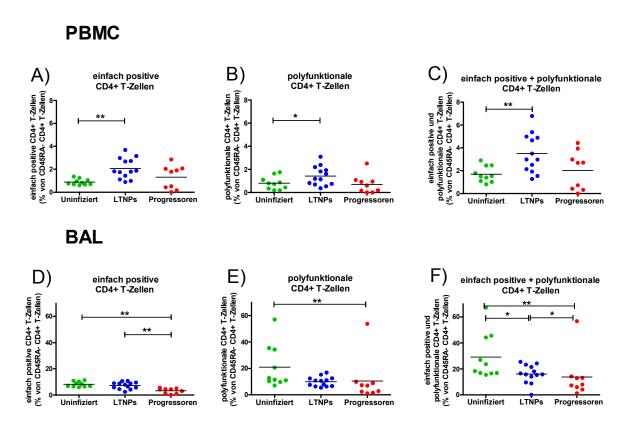


Abb. 4.25 Anteile der einfach positiven und polyfunktionalen Zytokin-produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC und BAL von uninfizierten Tieren, LTNPs und Progressoren nach SEB-Stimulation. Dargestellt ist jeweils der Gesamtanteil an Gedächtniszellen, die nur ein Zytokin produzieren (A+D) und der Gesamtanteil derer, die zwei oder drei Zytokine produzieren (B+E). Die Teile C und F zeigen jeweils den Gesamtanteil der einfach positiven und polyfunktionalen Populationen aus A+B bzw. D+E. Die Querstriche geben den Mittelwert an, mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet, Mann-Whitney-Test (\* p<0,05, \*\*p<0,001).

#### CD8<sup>+</sup> Zytokin produzierende Gedächtniszellen

Bei der Gegenüberstellung der CD8<sup>+</sup> Zytokin-sekretierenden Zellen ist in Abb. 4.26 zu sehen, dass die LTNPs im Blut über signifikant mehr einfach positive Zellen verfügen als nicht infizierte Tiere. Ein Unterschied zu den Progressoren wurde jedoch nicht festgestellt. Auch beim Vergleich der relativen Anteile an polyfunktionalen T-Zellen in den drei Tiergruppen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Im BAL von infizierten Tieren wurden niedrigere Levels an polyfunktionalen Zellen festgestellt als bei uninfizierten Rhesusaffen (Abb. 4.26 E). Statistisch signifikante Unterschiede bestanden allerdings nur zwischen den uninfizierten Tieren und den Progressoren.

Bei Betrachtung der Summenverhältnisse von einfach positiven und polyfunktionalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten im Blut zwischen allen Tiergruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 4.26 C). Dagegen zeigten die Progressoren im BAL deutliche geringere Prozentsätze an Zytokin-sezernierenden Zellen gegenüber LTNPs und uninfizierten Tieren (Abb. 4.26 F).

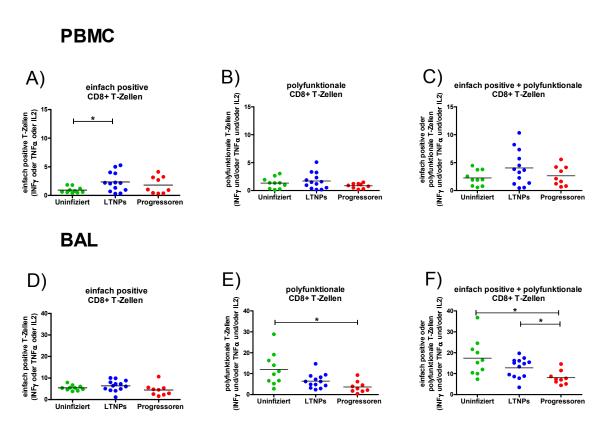


Abb. 4.26 Anteile der einfach positiven und polyfunktionalen Zytokin-produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC und BAL von uninfizierten Tieren, LTNPs und Progressoren nach SEB-Stimulation. Dargestellt ist jeweils der Gesamtanteil an Gedächtniszellen, die nur ein Zytokin produzieren (A+D) und der Gesamtanteil derer, die zwei oder drei Zytokine produzieren (B+E). Die Teile C und F zeigen jeweils der Gesamtanteil der einfach positiven und polyfunktionalen Populationen aus A+B bzw. D+E. Die Querstriche geben den Mittelwert an, mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet, Mann-Whitney-Test (\* p<0,05, \*\*p<0,001).

### 4.10.3 Bestimmung von Zytokin-produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Gedächtnis T-Lymphozyten in Blut und BAL von LTNPs und Progressoren nach SIVspezifischer Gag-Stimulation

#### Vorversuch mit uninfizierten Tieren

Eine virusspezifische zelluläre Immunantwort in uninfizierten Tieren ist nicht zu erwarten. Es wurde aber für BAL-Zellen eine erhöhte spontane INFγ-Sekretion beobachtet (Daten nicht gezeigt) und ein höheres Potential zur Zytokinproduktion in diesen Zellen festgestellt (siehe Kapitel 4.10.1). Daher wurde in Voruntersuchungen eine SIV-Gag-Stimulation mit PBMC und BAL-Zellen von uninfizierten Tieren durchgeführt, um eine unspezifische Reaktion auf den Gag-Peptidpool auszuschließen. Mit der Analyse von zehn uninfizierten Tieren konnte gezeigt werden, dass es im BAL vereinzelt zu niedrigen unspezifischen Reaktionen kommt, die aber im vernachlässigbaren Bereich waren (Daten nicht gezeigt).

#### CD4<sup>+</sup> Zytokin-sezernierende Gedächtnis T-Zellen in SIV-infizierten Tieren

Im Blut konnte nach Gag-Stimulation kein signifikanter Unterschied zwischen LTNPs und Progressoren in der Zytokinproduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden (Abb. 4.27 A-C). Wie bereits in 4.10.2 erwähnt, stellt sich eine Analyse von Zytokin-sezernierenden CD4<sup>+</sup> Gedächtnis T-Zellen im BAL von Progressoren sehr problematisch dar. Die Untersuchung der CD4<sup>+</sup> BAL-Zellen wies keinen signifikanten Unterschied zu den LTNPs auf (Abb. 4.27 D-E). Der Aspekt, dass Progressoren kaum noch CD4<sup>+</sup> T-Zellen im BAL besitzen, muss hierbei jedoch auch berücksichtigt werden.

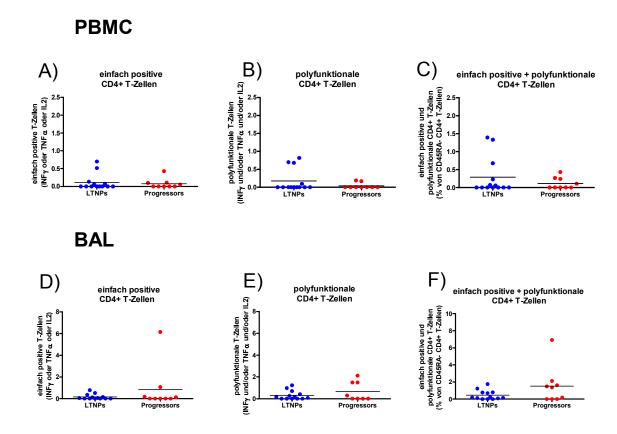


Abb. 4.27 Anteile der einfach positiven und polyfunktionalen Zytokin-produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC (A) und BAL (B) von LTNPs und Progressoren nach Gag-Stimulation. Dargestellt ist jeweils der Gesamtanteil an Gedächtniszellen, die nur ein Zytokin produzieren (A+D) und der Gesamtanteil derer, die zwei oder drei Zytokine produzieren (B+E). Die Teile C und F zeigen jeweils der Gesamtanteil der einfach positiven und polyfunktionalen Populationen aus A+B bzw. D+E. Die Querstriche geben den Mittelwert an.

#### CD8<sup>+</sup> Zytokin-sezernierende Gedächtnis T-Zellen in SIV-infizierten Tieren

Bei der Charakterisierung der LTNPs und Progressoren wurde in PBMC und BAL ein signifikant niedrigerer Anteil einer virusspezifischen CD8-vermittelten Zytokinsekretion von einfach positiven Zellen nachgewiesen (Abb. 4.28 A+D). Des Weiteren verfügten die LTNPs im BAL über einen hoch signifikant höheren Prozentsatz an polyfunktionalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gegensatz zu den Progressoren (Abb. 4.28 E). Bei Betrachtung der Summe an CD8<sup>+</sup> Zytokin-sekretierenden T-Zellen nach Gag-Stimulation findet man einen signifikant höheren relativen Anteil in PBMC und BAL-Zellen von LTNPs im Vergleich zu den Progressoren.

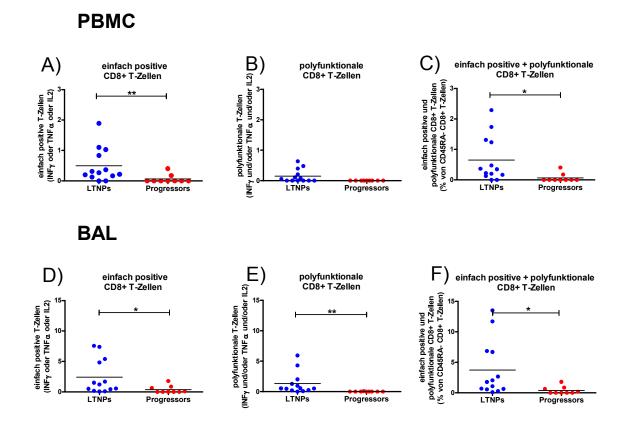
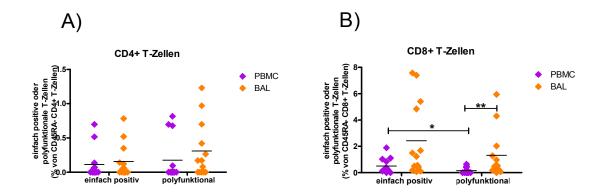


Abb. 4.28 Anteile der einfach positiven und polyfunktionalen Zytokin-produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC (A) und BAL (B) in LTNPs und Progressoren nach Gag-Stimulation. Dargestellt ist jeweils der Gesamtanteil an Gedächtniszellen, die nur ein Zytokin produzieren (A+D) und der Gesamtanteil derer, die zwei oder drei Zytokine produzieren (B+E). Die Teile C und F zeigen jeweils der Gesamtanteil der einfach positiven und polyfunktionalen Populationen aus A+B bzw. D+E. Die Querstriche geben den Mittelwert an, mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001).

### 4.10.4 Vergleich der Zytokin produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Blut und BAL von LTNPs nach spezifischer Gag-Stimulation

Die im Ergebnisteil 4.10.3 gezeigten Daten der LTNPs wurden hier unter einem anderen Aspekt betrachtet. Es wurden die relativen Anteile der Zytokin-produzierenden Zellen nach Gag-Stimulation von PBMC und BAL-Zellen gegenübergestellt.

Es ergab sich kein Unterschied zwischen den CD4<sup>+</sup> Zytokin produzierenden Zellen in PBMC und BAL-Zellen (Abb. 4.29 A). Dagegen waren im BAL signifikant mehr polyfunktionale CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden als im Blut (Abb. 4.29 B). In PBMC wurde zudem im Vergleich zu den einfach positiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen ein signifikant niedrigerer Anteil an polyfunktionalen Zellen festgestellt (Abb. 4.29 B).



**Abb. 4.29** Anteile der einfach positiven und polyfunktionalen Zytokin-produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC und BAL von LTNPs nach Gag-Stimulation. Dargestellt ist jeweils der Gesamtanteil an einfach positiven und polyfunktionalen Gedächtniszellen von BAL und PBMC der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B). Die Querstriche geben den Mittelwert an, mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet, Mann-Whitney-Test (\* p<0,05, \*\*p<0,001).

#### 4.10.5 Zusammenfassung von Ergebnisteil 4.10

Der Ergebnisteil 4.10 gibt wesentliche Auskünfte über das allgemeine Potential der Zellen in der Peripherie und der Lunge, Zytokine zu produzieren, sowie über die virusspezifische Zytokinsekretion.

Nach einer polyklonalen Stimulation wurde im BAL ein höherer Anteil an einfachpositiven und vor allem an polyfunktionalen Zellen als im Blut festgestellt. Die LTNPs verfügten sowohl bei den CD4<sup>+</sup> als auch bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut über höhere Anteile an Zytokin-produzierenden Zellen als die uninfizierten Tiere. Im BAL dagegen waren die Anteile auf ähnlichem Niveau wie bei den uninfizierten Tieren. Die Progressoren zeigten nur im BAL signifikant niedrigere Anteile an einfach positiven und polyfunktionalen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Nach SIV-Gag-Stimulation konnte weder im BAL noch im Blut ein signifikanter Unterschied zwischen LTNPs und Progressoren in der CD4 vermittelten Immunantwort festgestellt werden. Progressoren zeigten nach Gag-Stimulation im BAL signifikant weniger CD8<sup>+</sup> einfach positive und polyfunktionale T-Zellen im Vergleich zu den LTNPs, sowie einen niedrigeren Anteil an CD8<sup>+</sup> einfach positiven T-Zellen in den PBMC. Darüber hinaus waren bei LTNPs nach Gag-Stimulation im BAL signifikant mehr polyfunktionale CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden sind als im Blut. In PBMC war der Anteil an einfach positiven höher als der Anteil der polyfunktionalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Daraus wird deutlich, dass vor allem die virusspezifische CD8-vermittelte Immunantwort der Lunge einen wesentlichen Beitrag zur Kontrolle der Viruslast leistet.

### 4.11 Bestimmung der viralen RNA-Kopien in Darmbiopsien und BAL-Zellen

Wie bereits in Abb. 4.13 A dargestellt, ist bei vielen LTNPs eine Reduktion der RNA-Viruslast im Plasma, teilweise bis an die Nachweisgrenze, zu beobachten. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen in den Kapiteln 4.7. und 4.10. zeigten außerdem, dass diese Tiere eine virusspezifische mukosale Immunantwort besitzen und in zwei von drei untersuchten mukosalen Kompartimenten (BAL und Colon) normale Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorlagen. Es stellte sich daher die Frage, ob diese Tiere in der Lage sind, die Virusreplikation auch in den mukosalen Geweben zu kontrollieren. Darum wurden die viralen RNA-Kopien von LTNPs im Darm und BAL analysiert und mit der Viruslast der Progressoren in diesen Kompartimenten verglichen. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus BAL-Zellen sowie aus Colon- und Duodenumbiopsien isoliert und die viralen RNA-Kopien mit der qRT-PCR quantifiziert.

Für die Quantifizierung der RNA-Virusbeladung in mukosalen Geweben musste zunächst ein Protokoll etabliert werden.

## 4.11.1 Bestimmung der viralen RNA-Kopien in Darmbiopsien und BAL-Zellen von Progressoren und LTNPs

Es wurde die Gesamt-RNA aus BAL-Zellen sowie aus Duodenum- und Colonbiopsien isoliert. Vor der Isolation wurde das Gewicht der eingesetzten Biopsien bestimmt und anschließend 500 ng isolierte Gesamt-RNA zur Quantifizierung der viralen RNA-Kopien eingesetzt. Die Nachweisgrenze der qRT-PCR lag bei einer viralen RNA-Kopie und der Quantifizierungsbereich zwischen  $1x10^1 - 1x10^6$  RNA-Kopien. Die Qualität der RNA wurde gleichzeitig durch den Nachweis von GAPDH-mRNA überprüft (siehe Kapitel 3.16.1.).

Die detektierten viralen RNA-Kopien im Gewebe sind zusammen mit der von Dr. Ulrike Sauermann routinemäßig bestimmten Viruslast im Plasma (Nachweisgrenze 100 Kopien pro ml Plasma) in Abb. 4.30 dargestellt. Bei sieben der elf LTNPs konnten zum Untersuchungszeitpunkt zwischen 1,5x10<sup>2</sup> und 1x10<sup>3</sup> virale RNA-Kopien pro ml Plasma festgestellt werden; bei drei Tieren war keine virale RNA nachweisbar (Abb. 4.30 A).

Nur bei Tier 12536, welches die höchste Viruslast im Plasma zum Untersuchungszeitpunkt aufwies, konnte in den mukosalen Kompartimenten virale RNA quantifiziert werden. Die Anzahl an viralen RNA-Kopien lag in den BAL-Zellen bei 37 und im Colon bei 20 Kopien pro 500 ng Gesamt-RNA (Abb. 4.30 A).

Im Colon oder Duodenum von drei weiteren Tieren (2151, 9794, 12535) konnte eine geringe Anzahl an viralen RNA-Kopien nachgewiesen werden, die jedoch unterhalb des Quantifizierungsbereichs von 10 Kopien lag (Abb. 4.30 A).

Bei den Progressoren, die eine systemische Viruslast von 1,6 x10<sup>4</sup> - 8,19x10<sup>5</sup> viralen RNA-Kopien pro ml Plasma aufwiesen, ließ sich in allen untersuchten Geweben die Anzahl an viralen RNA-Kopien quantifizieren (Abb. 4.30 B). Die Anzahl an viralen RNA-Kopien lag im Colon zwischen 72 und 7,27x10<sup>3</sup>, im Duodenum zwischen 15 und 1,54x10<sup>4</sup> und bei den BAL-Zellen zwischen 17 und 2,94x10<sup>3</sup> pro 500ng Gesamt-RNA (Abb. 4.30 B).

In Abb. 4.30.C wurden die viralen RNA-Kopien (aus Abb. 4.30 A+B) von LTNPs und Progressoren in Blut und allen mukosalen Geweben verglichen. In den Progressoren war in allen Kompartimenten die Viruslast signifikant erhöht. Die Anzahl der viralen RNA-Kopien im Colon und Plasma der Progressoren waren etwa 700-770-fach höher als in den LTNPs, sowie im BAL etwa 400-fach erhöht. Im Duodenum zeigte sich die größte Differenz mit einer etwa 14.000-fach höheren RNA-Viruslast im Vergleich zu den LTNPs. Hier aus wird deutlich, dass es offensichtlich gerade zwischen den beiden Darmabschnitten einen deutlichen Unterschied in der Höhe der viralen Replikation gibt, obwohl die Anzahl der viralen RNA-Kopien pro 500 ng Gesamt-RNA aller infizierten Tiere durchschnittlich vergleichbar war.

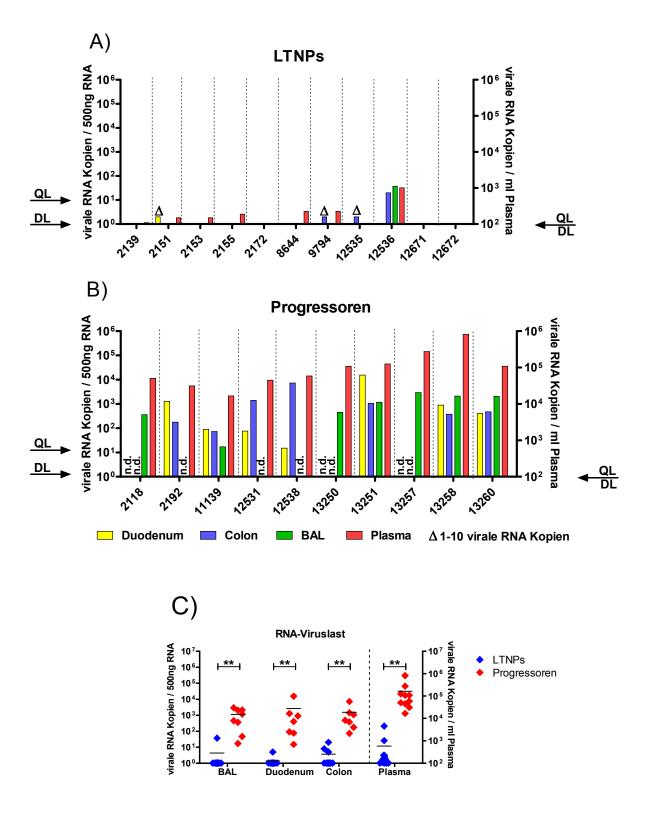
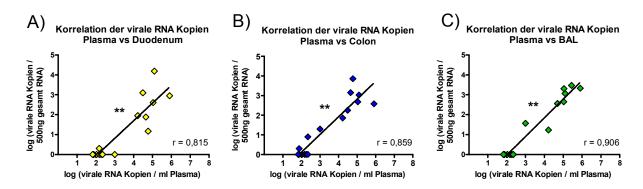


Abb. 4.30 Virale RNA-Kopien in Duodenum, Colon, BAL-Zellen und Plasma von LTNPs und Progressoren. A) zeigt die LTNPs und B) die Progressoren, deren jeweilige Tiernummern auf den X-Achsen gelistet sind. Auf den linken y-Achsen sind die viralen RNA-Kopien pro 500 ng Gesamt-RNA aus den mukosalen Geweben aufgetragen; auf den rechten y-Achsen ist die Viruslast pro ml Plasma aufgetragen. DL=Detektionslimit, QL=Quantifizierungslimit, jeweils zusätzlich mit einem Pfeil gekennzeichnet. n.d.=nicht durchgeführt. In C) ist ein Vergleich aller Werte aus A) und B) zwischen LTNPs und Progressoren von BAL, Duodenum, Colon und Blut dargestellt. Die Querstriche geben den Mittelwert der jeweiligen Gruppe an. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\* p<0,001).

### 4.11.2 Korrelation der viralen RNA-Kopien im Plasma mit der mukosalen RNA-Viruslast in infizierten Tieren

Mit einer Korrelationsanalyse wurde ein Zusammenhang zwischen systemischer und mukosaler Viruslast unter Verwendung aller in Abb. 4.30 A+B gezeigten Werte überprüft. Bei drei LTNPs lagen die Werte unterhalb der Quantifizierungsgrenze von 10 Kopien (pro 500 ng Gesamt-RNA), aber innerhalb des Detektionsbereichs. Da hier eine eindeutige Quantifizierung der viralen RNA-Kopien in diesem Falle nicht möglich war, wurde in der folgenden statistischen Analyse für diese Tiere der Wert 5 festgesetzt.

Die Anzahl der viralen RNA Kopien in allen mukosalen Geweben korrelierte hoch signifikant mit der RNA-Viruslast im Plasma (Abb. 4.31).



**Abb. 4.31 Korrelationsanalyse der viralen RNA-Kopien in mukosalen Geweben mit der systemischen Viruslast.** Auf den y-Achsen ist der Logarithmus der detektierten viralen RNA-Kopien (pro 500ng Gesamt-RNA) im Duodenum (A), Colon (B) und in BAL-Zellen (C) zu dem Logarithmus der Viruslast im Plasma auf der x-Achse aufgetragen. r gibt den Spearman-Korrelationskoeffizienten an (\*\* = p < 0.001)

## 4.11.3 Berechnung der viralen RNA-Kopien pro Gramm Gewebe bzw. pro 1x10<sup>6</sup> BAL-Zellen

Um zu verdeutlichen wie hoch die mukosale Viruslast bezogen auf das Gewicht bzw. die Zellzahl ist, wurden die quantifizierten viralen RNA-Kopien (pro 500ng) bei den Biopsien auf 1g Gewebe und für die BAL-Zellen auf 1x10<sup>6</sup> Zellen berechnet. Exemplarisch sind hier die errechneten RNA-Kopien von zwei Progressoren (11139, 13260) einschließlich der systemischen Viruslast zum Vergleich (Tab. 4.8) gezeigt. Die Viruslast im Plasma war bei beiden Tieren mit etwa 1x10<sup>5</sup> viralen RNA-Kopien pro ml Plasma in etwa vergleichbar hoch. Im Colon und Duodenum von Tier 13260 lag die berechnete Anzahl an viralen RNA-Kopien bei etwa 2x10<sup>6</sup> Kopien pro Gramm Gewebe. Die BAL-Zellen wiesen bei 3x10<sup>4</sup> Kopien pro 1x10<sup>6</sup> Zellen auf. Das Tier 13251 zeigte im Vergleich mit 3,30x10<sup>7</sup> Kopien im Duodenum und 4,34x10<sup>6</sup> Kopien im Colon eine etwas höhere Viruslast.

Dagegen war die Anzahl an viralen RNA-Kopien in den BAL-Zellen mit 6,48x10<sup>3</sup> Kopien niedriger.

Tab. 4.9 Virale RNA-Kopien von zwei Progressoren pro Gramm Darmgewebe und pro 1x10<sup>6</sup> BAL-Zellen einschließlich der Viruslast im Plasma

| Tiernummer | Duodenum           | Colon                  | BAL                          | Plasma                 |  |
|------------|--------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|--|
|            | pro 1g Gewebe      | pro 1g Gewebe          | pro 1x10 <sup>6</sup> Zellen | pro ml Plasma          |  |
| 13260      | $2,07 \times 10^6$ | 1,90 x 10 <sup>6</sup> | $3,04 \times 10^4$           | $1,09 \times 10^5$     |  |
| 13251      | $3,30 \times 10^7$ | 4,34 x 10 <sup>6</sup> | 6,48 x 10 <sup>3</sup>       | 1,25 x 10 <sup>5</sup> |  |

# 4.12 Bestimmung der zellassoziierten proviralen SIV-Genomkopien in PBMC und BAL-Zellen

Für die Charakterisierung von LTNPs, welche die RNA-Viruslat im Plasma effektiv kontrollieren, sollte eine weitere Methode zur Bestimmung der zellassoziierten Viruslast etabliert werden. Neben der in der Abteilung "Infektionsmodelle" routinemäßigen Untersuchung der zellassoziierten Viruslast durch Virusreisolierung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Etablierung der quantitativen Analyse von integrierten proviralen DNA-Genomen mit Hilfe der qRT-PCR. Diese beiden Methoden sollten zusammen mit der RNA-Viruslast im Plasma verglichen und beurteilt werden. Die qRT-PCR bietet außerdem die Möglichkeit zur Analyse der zellassoziierten Viruslast für Gewebezellen aus Darm, Lunge oder Vagina, bei welchen eine Kokultivierung bzw. Virusreisolierung aufgrund von mikrobiellen Kontaminationen kaum möglich ist.

Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, in wie weit sich LTNPs und Progressoren hinsichtlich der Anzahl an integrierten proviralen DNA-Genomen im Blut und einem mukosalen Kompartiment unterschieden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen der zellassoziierten Proviruslast und der RNA-Viruslast im Plasma besteht ist.

#### 4.12.1 Bestimmung der zellassoziierten proviralen SIV-Kopien mittels qRT-PCR

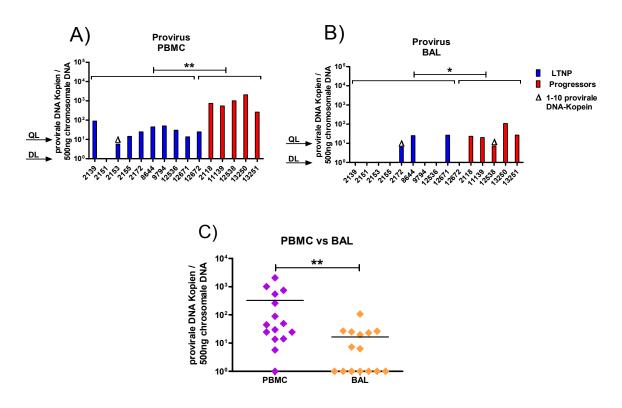
Die genomische DNA aus PBMC und BAL-Zellen von zehn LTNPs und fünf Progressoren wurde isoliert und für eine quantitative RT-PCR wurden 500 ng DNA einsetzt.

In acht von zehn LTNPs und bei allen Progressoren konnte die Anzahl an proviralen DNA-Genomen eindeutig quantifiziert werden (Abb. 4.32 A). Bei dem LTNP 2151 konnte kein

Provirus nachgewiesen werden. Bei dem LTNP 2153 lagen die bestimmten Kopienzahlen unterhalb des Quantifizierungslimits von 10 Kopien. Die Anzahl der quantifizierten Provirus-Genome lag bei den übrigen acht LTNPs bei 14 bis 90 Kopien pro 500 ng DNA, bei den Progressoren bei 260 bis 2065 Kopien pro 500 ng DNA. Zwischen LTNPs und Progressoren konnte ein hoch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

In den BAL-Zellen konnte bei allen Progressoren Provirus nachgewiesen werden, dagegen aber nur in drei LTNPs (Abb. 4.32 B). Bei einem LTNP und einem Progressor lag die Anzahl der detektierten viralen DNA-Kopien unterhalb des Quantifizierungslimits. Bei den zwei LTNPs wurden 25-26 proviralen Genomkopien, bei den Progressoren 20 bis 108 proviralen Genomkopien pro 500 ng DN nachgewiesen.

Ein Vergleich der Anzahl der proviralen DNA-Genome in Blut und BAL von allen Tieren ergab hoch signifikant mehr provirale DNA-Kopien in PBMC im Vergleich zu BAL-Zellen (Abb. 4.32 C).



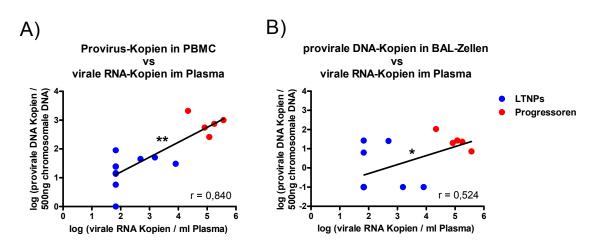
**Abb. 4.32 Quantifizierung proviraler DNA-Kopien in PBMC und BAL-Zellen von LTNPs und Progressoren.** Dargestellt ist die Anzahl an nachgewiesenen proviralen DNA-Genomen pro 500 ng genomischer DNA in A) PBMC und B) BAL-Zellen. DL=Detektionslimit, QL=Quantifizierungsgrenze, jeweils zusätzlich mit einem Pfeil gekennzeichnet. C) zeigt einen Vergleich der proviralen DNA-Kopien in PBMC und BAL-Zellen aller infizierten Tiere. Mit Querbalken und Sternen sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet, Mann-Whitney-Test (\* p<0,05; \*\*p<0,001).

## 4.12.2 Korrelation der proviralen Viruslast in PBMC und BAL-Zellen mit der Anzahl an viralen RNA-Kopien im Plasma

Die viralen Genom-Kopien (Abb. 4.32) in PBMC und BAL-Zellen aller Tiere wurden mit der RNA-Viruslast im Plasma zum entsprechenden Untersuchungszeitpunkt korreliert. Da drei der nachgewiesenen Provirus-Werte unterhalb der Quantifizierungsgrenze von 10 Kopien (pro 500 ng DNA), aber innerhalb des Detektionsbereichs lagen, wurde für diese der Wert 5 festgesetzt.

Abb. 4.33 zeigt, dass die Anzahl der proviralen DNA-Kopien in PBMCs und BAL-Zellen signifikant mit der systemischen RNA-Viruslast korreliert.

Eine zeitgleiche Analyse der proviralen DNA- und RNA-Viruslast in BAL-Zellen, sowie eine Analyse der Proviruslast in Darmbiopsien war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.



**Abb. 4.33** Korrelationsanalyse der proviralen DNA-Genomkopien mit der systemischen RNA-Viruslast. Auf den y-Achsen ist jeweils der Logarithmus der nachgewiesenen proviralen DNA-Kopien (pro 500 ng genomischer DNA) in PBMC (A) und BAL-Zellen (B) zu dem Logarithmus der RNA-Viruslast im Plasma auf der x-Achse aufgetragen. r gibt den Spearman-Korrelationskoeffizienten an (\* = p < 0.05; \*\* = p < 0.001)

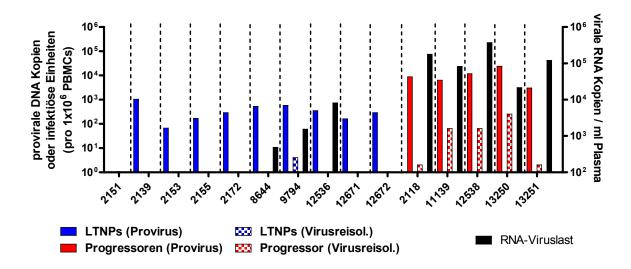
### 4.12.3 Vergleich der zellassoziierten infektiösen Zellen durch Virusreisolierung und der Anzahl proviraler SIV-Genomkopien

Die bereits in Abb. 4.32 gezeigten proviralen DNA-Kopien der LTNPs und Progressoren wurden auf Kopienanzahl pro 1x10<sup>6</sup> PBMC normiert. Diese sind in Abb. 4.34 für jedes Tier einzeln, zusammen mit der RNA-Viruslast im Plasma und der Anzahl an infektiösen Zellen, die mit Hilfe der Virusreisolierung bestimmt wurde, dargestellt.

In der Gruppe der LTNPs war nur bei den Tieren 8644, 9794 und 12536 die RNA-Viruslast im Plasma zum Untersuchungszeitpunkt quantifizierbar. Des Weiteren konnte nur bei dem Tier 9794 Virus reisoliert werden. Im Gegensatz dazu konnte bei allen Progressoren im Blut gleichzeitig virale RNA im Plasma und zellgebundenes infektiöses Virus bestimmt werden.

Besonders auffällig sind die Tiere 2118 und 13251, die neben einer relativ hohen systemischen RNA- und proviralen Viruslast nur eine sehr geringe Anzahl an infektiösen Zellen aufwiesen.

Eine statistische Analyse unter Einbeziehung aller SIV-infizierten Tiere ergab, dass die provirale DNA-Viruslast signifikant höher ist als die Anzahl infektiöser Einheiten (p<0,0001).



**Abb. 4.34 Vergleich der zellassoziierten Viruslast (Provirus und infektiösen Zellen) mit der zellfreien RNA-Viruslast (im Plasma) in LTNPs und Progressoren.** Auf der linken y-Achse ist die Anzahl an detektierten proviralen DNA-Genomen und die Anzahl an infektiösen Einheiten pro 1x10<sup>6</sup> PBMC dargestellt. Die viralen RNA-Kopien pro ml Plasma sind auf der rechten y-Achse aufgetragen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser drei Methoden zur Bestimmung der Viruslast zeigen zum einen, dass bei den Tieren, die keine systemische RNA-Viruslast aufwiesen, trotzdem provirale Genomkopien nachweisbar waren. Außerdem wird deutlich, dass eine hohe RNA-Viruslast im Plasma und hohe Anzahlen an proviralen Genomen nicht zwangsläufig mit einer hohen Freisetzung an infektiösen Partikeln assoziiert ist.

# 4.13 Charakterisierung des CD4-Verlustes und der virusspezifischen CTL-Antwort in unterschiedlichen mukosalen Geweben von SIV-infizierten Tieren

# 4.13.1 Charakterisierung des CD4-Verlusts in verschiedenen mukosalen Geweben von infizierten Tieren im Endstadium der Krankheit und teils AIDS-ähnlichen Symptomen

Durch die Analysen von uninfizierten Tieren in Ergebnisteil 4.1. ist deutlich geworden, dass sich die untersuchten mukosalen Gewebe hinsichtlich ihrer prozentualen Lymphozytenzusammensetzung teilweise deutlich voneinander unterscheiden. Weiterhin haben die *ex vivo* Analysen von infizierten Tieren in Kapitel 4.7. ergeben, dass auch die zwei untersuchten Darmabschnitte Duodenum und Colon unterschiedliche Veränderungen, bedingt durch die SIV-Infektion, zeigen.

Der massive CD4-Verlust in mukosalen Geweben, insbesondere im Darm, wurde mehrfach in der Literatur beschrieben (Veazey et al., 1998; Li et al., 2005; Mattapallil et al., 2005). Im Folgenden wurde erstmals im Detail untersucht, wie ausgeprägt dieser CD4-Verlust in den verschieden Geweben ist und ob es Unterschiede zwischen den vier Darmabschnitten, Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon gibt.

Für diese Untersuchungen wurden mukosale mononukleäre Zellen von elf Tieren (acht männlich, drei weiblich) zum Zeitpunkt der Sektion isoliert. Sieben Tiere wurden aufgrund AIDS-ähnlicher Symptome seziert, vier weitere Tiere wegen Beendigung des Experiments ohne klinische Symptome (siehe Tab. 4.10, weitere Informationen siehe Tab. 2.8). Die durchschnittliche Viruslast der Tiere lag bei 2,08x10<sup>6</sup> viralen RNA-Kopien pro ml Plasma. Die erhobenen Daten wurden mit den Daten der zehn nicht infizierten Tiere aus dem Ergebnisteil 4.3.2. verglichen.

| Tiernummer | MHC-<br>Hintergrund | Geschlecht | Viruslast* (Zeitpunkt der Sektion) | Status         |  |
|------------|---------------------|------------|------------------------------------|----------------|--|
| 2188       | A01                 | W          | $8,35 \times 10^5$                 | AIDS           |  |
| 2191       | A01                 | W          | $4,54 \times 10^3$                 | AIDS           |  |
| 2250       | A01                 | m          | $4,02 \times 10^4$                 | AIDS           |  |
| 9045       | A01                 | m          | $5,04 \times 10^4$                 | AIDS           |  |
| 12537      | _                   | m          | $6,11 \times 10^5$                 | AIDS           |  |
| 13249      | -                   | m          | $2,05 \times 10^6$                 | AIDS           |  |
| 13255      | -                   | m          | $1,66 \times 10^7$                 | AIDS           |  |
| 2107       | A01                 | m          | $1,42 \times 10^4$                 | asymptomatisch |  |
| 10425      | -                   | W          | $6,38 \times 10^3$                 | asymptomatisch |  |
| 13259      | A01                 | m          | $1,56 \times 10^5$                 | asymptomatisch |  |
| 10943      | _                   | m          | $2.53 \times 10^6$                 | asymptomatisch |  |

Tab. 4.10 Übersicht der chronisch SIV infizierten Tiere für die Analyse des CD4-Verlusts

Abb. 4.35 zeigt, dass in Blut, NALT und den vier Darmabschnitten ein signifikanter Unterschied zwischen den relativen Anteilen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen von uninfizierten und den SIV-infizierten Tieren bestand.

Im weiblichen Genitaltrakt ist dieser Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls deutlich zu erkennen, hier ergaben sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede. Aufgrund der geringen Anzahl an weiblichen Rhesusaffen in beiden Tiergruppen konnte für die Gewebe Vagina, Cervix und Uterus nur ein p-Wert von 0,0571 festgestellt werden.

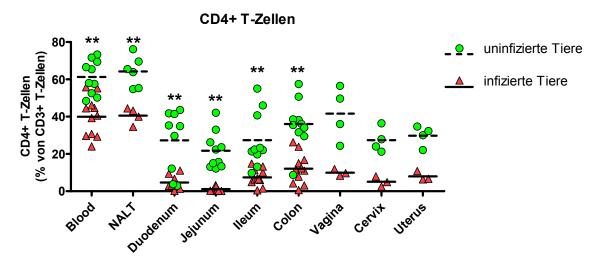


Abb. 4.35 Prozentuale Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen an den CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Blut und acht verschiedenen mukosalen Geweben in uninfizierten und SIV-infizierten Tieren. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen an (Mann-Whitney-Test, \* p<0,05, \*\*p<0,001).

<sup>\*</sup>systemische Viruslast (Kopien pro ml Plasma); A01, Tiere mit dem MHC-Klasse-I-Allel Mamu\*A01

#### Prozentualer Verlust in den verschiedenen mukosalen Geweben

In den mukosalen Geweben, insbesondere auch in den vier Darmabschnitten, der infizierten Tiere waren noch unterschiedlich hohe Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden (Abb. 4.35). Ausgehend vom Mittelwert an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in uninfizierten und dem Mittelwert bei infizierten Tieren wurde daher der prozentuale Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen berechnet (siehe Tab. 4.10). Das NALT zeigte zusammen mit dem Blut den geringsten prozentualen Verlust dieser Lymphozyten von 34,8% bzw. 36,85%. Beim Vergleich der vier Darmabschnitte war im Jejunum der stärkste Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen von fast 95% festzustellen. Im Colon lag dagegen die geringste Reduktion mit 66,52% vor. Im weiblichen Genitaltrakt war ein ähnlich starker Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen 73,31% und 81,3% nachweisbar.

Tiere mit dem MHC-Allel *MamuA\*01* überleben länger und sind in der Lage, die Viruslast zu reduzieren (Mühl et al., 2002). Um festzustellen, ob es bei *MamuA\*01*-Tieren einen Unterschied im Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den nicht *MamuA\*01*-Tieren gibt, wurde deren prozentualer Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (n=6) separat berechnet (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied von *MamuA\*01*-Tiere zu den Tieren festgestellt werden, die das Allel nicht aufweisen (siehe Tab. 4.10).

Tab. 4.11 Berechnung des prozentualen CD4-Verlustes in Blut und allen untersuchten mukosalen Geweben

|   | Blut | NALT | Duodenum | Jejunum | Heum | Colon | Vagina | Cervix | Uterus |
|---|------|------|----------|---------|------|-------|--------|--------|--------|
| CD4<br>uninfiziert <sup>1</sup>             | 61,3 | 64,2 | 27,3     | 21,7    | 27,4 | 36,1  | 41,7   | 27,4   | 29,8   |
| CD4<br>Infiziert <sup>2</sup>               | 40   | 40,6 | 4,7      | 1,2     | 7,5  | 12,1  | 10,0   | 5,1    | 8,0    |
| Verlust an CD4 in % alle Tiere <sup>3</sup> | 34,8 | 36,9 | 82,7     | 94,7    | 72,8 | 66,5  | 76,0   | 81,3   | 73,3   |
| nur<br>A01-Tiere <sup>4</sup>               | 30,7 | 38,2 | 86,8     | 96,5    | 75,3 | 65,7  | 74,1   | 76,5   | 78,1   |

<sup>1,</sup> Mittelwerte der relativen Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen (% von CD3<sup>+</sup> T-Zellen) der uninfizierten Tiere

<sup>2,</sup> Mittelwerte der relativen Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen (% von CD3<sup>+</sup> T-Zellen) der SIV-infizierten Tiere

<sup>3,</sup> prozentualer Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen der SIV-infizierten Tiere (berechneter aus den Mittelwerten der uninfizierten und infizierten Tiere)

<sup>4,</sup> prozentualer Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen der A01-Tiere (separat berechnet)

# 4.13.2 Bestimmung der relativen Anteile an virusspezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> TZellen in den verschiedenen mukosalen Geweben mit Hilfe der TetramerTechnik

Die mit Hilfe der Tetramer-Technik nachweisbaren, virusspezifischen zytotoxischen T-Zellen gehen in *MamuA\*01*-Tieren in der Endphase der Infektion verloren (Marcondes, et al., 2008). Bei den sechs hier untersuchten *MamuA\*01*-Rhesusaffen (zwei weiblich, vier männlich) wurde in allen Geweben die relative Anteil der SIV-spezifischen CTLs zum Zeitpunkt der Sektion bestimmt.

Die Ergebnisse sind für jedes Tier einzeln in Abb. 4.34 dargestellt. Auffällig sind die beiden weiblichen Tiere 2188 und 2191, die aufgrund AIDS-ähnlicher Symptome euthanasiert wurden.

In Vagina und Cervix konnten bis zu 3,3% SIV-spezifische CTLs nachgewiesen werden, wohingegen in allen anderen untersuchten Organen nur noch weniger als 0,5% dieser T-Zellenpopulation vorhanden war. Bei Betrachtung der übrigen vier Tiere wird deutlich, dass im Colon und Ileum die Anteile der CTLs höher waren als in Duodenum und Jejunum.

Daher wurden aus diesen Ergebnissen die durchschnittlichen relativen Anteile der SIV-spezifischen CTLs in allen untersuchten Organen berechnet (siehe Tab. 4.12). Der Tabelle ist zu entnehmen, dass beim Vergleich der vier Darmabschnitte im Jejunum mit 0,37% der geringste Anteile an virusspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen festzustellen war. Im Colon liegt mit 1,49% der höchste Wert vor. Da nur zwei *MamuA\*01*-Weibchen analysiert werden konnten, sind die Daten der Gewebeanalysen aus dem weiblichen Genitaltrakt als Trend zu bewerten. Es konnten in Vagina und Cervix mit jeweils über 2% die höchsten Anteile an SIV-spezifischen CTL festgestellt werden.

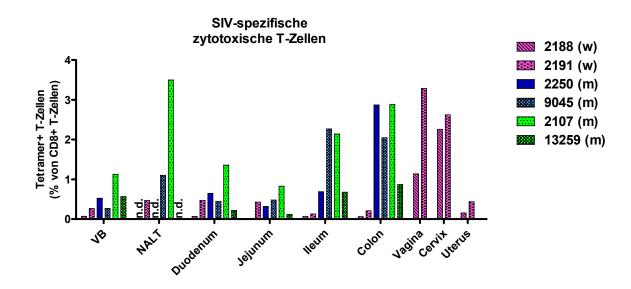


Abb. 4.36 Prozentuale Anteile der virusspezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Blut und verschiedenen mukosalen Geweben zum Zeitpunkt der Sektion. Tiere die aufgrund AIDS-ähnlicher Symptomen euthanasiert wurden, sind in rosa (2188,2191) und blau (2250,9045) dargestellt, klinisch noch unauffällig waren 2107 und 13259 (grün). n.d.=nicht durchgeführt

Tab. 4.12 Durchschnitt der prozentualen Anteile an virusspezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Blut und allen mukosalen Geweben zum Zeitpunkt der Sektion

|           | Blut | NALT | Duodenum | Jejunum | Heum | Colon | Vagina | Cervix | Uterus |
|-----------|------|------|----------|---------|------|-------|--------|--------|--------|
| Tetramere | 0,5  | 1,7  | 0,5      | 0,4     | 1,0  | 1,5   | 2,2    | 2,4    | 0,3    |

### 4.13.3 Analyse des Zusammenhangs zwischen dem CD4-Verlust und den relativen Anteilen an virusspezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die durchschnittlichen Anteile an SIV-spezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen der unterschiedlichen mukosalen Organe (aus Tab. 4.11) wurden mit dem jeweiligen prozentualen Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen der *MamuA\*01*-Tiere (aus Tab. 4.10) ins Verhältnis gesetzt (Abb. 4.35). Es ergab sich eine Korrelation zwischen dem CD4-Verlust und den Anteilen an CTLs in den vier Darmabschnitten (Abb. 4.3.6).

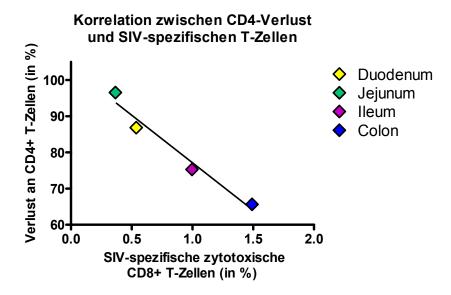


Abb. 4.37 Korrelation des durchschnittlichen relativen Anteils an SIV spezifischen CTL mit dem durchschnittlichen prozentualen Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den vier Darmabschnitten von sechs *MamuA\*01*-Tieren.

Mit Hilfe der Tetramer-Technik lassen sich nur SIV-spezifische T-Zellen von *MamuA\*01*-Tieren untersuchen, die Unterschiede im CD4-Verlust in den vier Darmabschnitten ist jedoch in allen Tieren gleich. Dies ist ein Hinweis darauf, dass grundsätzlich eine unterschiedliche ausgeprägte, virusspezifische Immunantwort in den einzelnen Darmabschnitten vorliegt.

#### 5. Diskussion

Die bisherige Erforschung der HIV-Infektion hat bereits grundlegende Informationen zu ihrer Übertragung und dem Krankheitsverlauf geliefert. Dabei ist die Untersuchung der mukosalen Gewebe in der HIV-Forschung aus zwei Gründen von zentraler Bedeutung. Der erste Aspekt ist neben der Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut während der akuten Phase der HIV-Infektion die massive, fast ausschließlich irreversible Depletion an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im gesamten Gastrointestinaltrakt (Brenchley et al., 2004; Schneider et al., 1995; Mehandru et al., 2004). Da sich allein im Darm etwa 60% der körpereigenen T-Zellen befinden (Guy-Grand et al., 1993; Mowat et al., 1997), ist das Ausmaß der immunologischen Schädigung unverkennbar. Ein ebenso starker Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte in der Lunge von chronisch infizierten HIV-Patienten beschrieben werden (Brenchley et al., 2008), jedoch wurde die dafür verantwortliche initiale Depletion in der akuten Phase der Infektion bisher nur anhand des SIV-Modells belegt (Nishimura et al., 2007; Douek et al., 2003). Zudem kommt es während der HIV-Infektion unabhängig von opportunistischen Infektionen zu morphologischen Veränderungen des Darmgewebes (Enteropathie) und interstitiellen Pneumonien (Zeitz et al., 1998; Fishback et al., 1996; De Leon et al., 1995). Durch die massive Schädigung des Darms leiden die meisten HIV-Patienten an chronischer Diarrhoe und Gewichtsverlust (Chui et al., 1994; Keusch et al., 1993) sowie aufgrund der Immundefizite im Endstadium der Erkrankung unter pulmonalen und gastrointestinalen opportunistischen Infektionen (Chui et al., 1994; Wallace et al., 1998). Einige experimentelle Vakzineansätze zielen daher darauf ab, eine systemische und mukosale Immunantwort zu induzieren, die im Falle der Infektion zumindest eine Reduktion der Spitzenvirämie und vor allem die massive Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Darm verhindert (Mattapallil et al., 2006).

Der zweite wichtige Aspekt der mukosalen Gewebe in der HIV-Forschung besteht hauptsächlich in der sexuellen Übertragung von HIV über die Mukosa-assoziierten Gewebe des weiblichen Genitaltrakts (Wilkinson et al., 2006) und des Rektums (Voeller, 1991). Frauen sind einem höheren Infektionsrisiko ausgesetzt, da die Übertragungsrate des Virus von einem infizierten Mann auf eine Frau fünffach höher ist als umgekehrt (Padian et al., 1991). Da bei Männern das Virus vor allem über die Vorhaut eindringt, kann das Infektionsrisiko durch eine Beschneidung um weitere 60% verringert werden (Gray et al., 2008; Byakika-Tusiime, 2008).

Experimentelle Studien mit HIV-Patienten sind aufschlussreich, jedoch auch in wesentlichen Punkten limitiert. Daher ist das SIV-Makaken-Modell für AIDS hinsichtlich bestimmter Fragestellungen in der Impfstoffentwicklung und weiteren Erforschung der HIV-Infektion von großer Bedeutung. Das Tiermodell bietet vor allem die Möglichkeit, die Infektionsroute und die Virusdosis zu bestimmen sowie den gesamten Infektionsverlauf detailliert zu analysieren. Auch der unmittelbare Zugriff auf Organe sofort nach der Sektion der Tiere macht beispielsweise die Analyse aller Darmabschnitte und der Gewebe des weiblichen Genitaltraktes möglich. Eine *post mortem* Analyse von humanen Organen ist vereinzelt zwar möglich, aber mit vielen Schwierigkeiten verbunden.

Vor allem erst der detaillierte Vergleich im Tiermodell zwischen uninfizierten und SIVinfizierten Rhesusaffen in unterschiedlichen Krankheitsstadien und die Analyse aller
daraus gewonnenen Daten im Kontext lässt Rückschlüsse auf die komplizierten Vorgänge
der Infektion ziehen. Viele Erkenntnisse, die aus Analysen von primärem Zellmaterial aus
dem Tiermodell gewonnen werden, sind Voraussetzung für weitere *in vitro* Experimente
und gezielte Impfstoffentwicklung.

Ein Impfstoff, der eine sterile Immunität vermittelt, ist noch nicht in Sicht. Daher liegt der Fokus der Forschung zunehmend auf der Entwicklung eines potenten Mikrobizides, welches die heterosexuelle Übertragungsrate von HIV weiter reduzieren könnte. Andere Studien der Impfstoffentwicklung zielen darauf ab, eine Vakzine zu entwickeln, die eine schützende lokale mukosale Immunität induziert (Demberg et al., 2009). Auch das wäre ein großer Fortschritt zur Bekämpfung und Reduktion der weiteren Ausbreitung von HIV. Aus diesen Gründen sind grundlegende detaillierte Kenntnisse über die verschiedenen mukosalen Kompartimente und die Erforschung von HIV anhand des Tiermodells essentiell.

Eine wesentliche Schwäche in einer Reihe von Veröffentlichungen besteht darin, dass von einem mukosalen Gewebe auf alle übrigen geschlossen wird. So wird in vielen Vakzineund Pathogenesestudien in der HIV/SIV-Infektionsforschung oft nur ein Darmabschnitt
untersucht, welcher als repräsentativ für alle mukosalen Gewebe angesehen wird
(Schneider et al., 1995; Mehandru et al., 2004). Daher lag der Schwerpunkt dieser Arbeit
hinsichtlich verschiedener Fragestellungen vor allem auf der vergleichenden Analyse
unterschiedlicher mukosaler Gewebe. Es sollte erstmals eine detaillierte Charakterisierung
bezüglich prinzipieller und infektionsbedingter Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede der
mukosalen Organe untereinander und zum Blut durchgeführt werden. Diese Arbeit hat in
mehreren wesentlichen Punkten gezeigt, dass eine Generalisierung der verschiedenen
mukosalen Gewebe und speziell auch der vier Darmabschnitte, Duodenum, Jejuum, Ileum
und Colon nicht möglich ist.

# 5.1 Starke Unterschiede hinsichtlich der erzielten Zellausbeuten aus verschiedenen Geweben

Eine wesentliche Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, Zellisolierungen für verschiedene mukosale Gewebeproben ex vivo und post mortem für duchflusszytometrische Analysen zu etablieren. Die Isolierung mononukleärer Zellen aus Darmresektaten zum Zeitpunkt der Sektion lieferte aufgrund der großen Gewebestücke aus diesem lymphozytenreichen Organ durchgehend hohen Zellausbeuten bis zu 85x10<sup>6</sup> Zellen. Durch die Modifikation eines vorliegenden Protokolls in wesentlichen Schritten konnte der Reinheitsgrad der isolierten mononukleären Zellen erheblich verbessert werden. Für die ex vivo Zellisolation aus Darmbiopsien konnten ausreichend Proben von uninfizierten Tieren genommen werden, um auch hier ein bereits vorhandenes Protokoll weiter zu optimieren. Jedoch sind aufgrund der eingeschränkten Zellausbeuten von durchschnittlich 5,7-6,9x10<sup>5</sup> mononukleären Zellen aus Colon- und Duodenumbiopsien von Rhesusaffen keine umfangreichen funktionellen Analysen mit intestinalen Lymphozyten möglich, was von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt wurde (Biag et al., 2002). Diese Untersuchungen sind wiederum mit HIV-Patienten möglich, da beim Menschen mit größeren Biopsiezangen gearbeitet werden kann und eine höhere Anzahl an Biopsien pro Darmabschnitt möglich ist (Shacklett et al., 2003). Neben der bereits angeführten Generalisierung verschiedener mukosaler Gewebe finden sich in der Literatur weitere analytische Schwächen anderer Arbeitsgruppen. Um die Zellausbeuten zu erhöhen, werden Biopsien aus zwei unterschiedlichen Darmabschnitten entnommen und für die weitere durchflusszytometrische Analyse vereinigt (Veazy et al., 2001). Die vorliegende Arbeit belegt durch mehrere voneinander unabhängige Experimente, dass es zwischen allen vier Darmabschnitten vielfältige Unterschiede gibt. Dies spiegelte sich in den Analysen des physiologischen Zustands sowie in den infektionsbedingten Veränderungen der Lymphozytenpopulationen wieder. Daher ist für die wissenschaftliche Untersuchung mukosaler Organe in der HIV/SIV-Forschung eine derartige Vorgehensweise in keinster Weise vertretbar.

Die *ex vivo* Gewinnung der BAL war erst im Laufe dieser Arbeit für die Charakterisierung der verschiedener Tiergruppen verfügbar. Jedoch konnte die Methode nach der Etablierung hinsichtlich der Zellausbeuten noch weiter verbessert werden und lieferte im Durchschnitt etwa  $4x10^6$  mononukleäre Zellen.

Die Isolation von Lymphozyten aus den Geweben des weiblichen Genitaltrakts gestaltete sich hingegen weitaus schwieriger. Vor allem Vagina und Cervix sind sehr dichte, bindegewebsreiche Organe und teils hochgradig keratinisiert, was die Isolierung der mononukleären Zellen erschwerte und sehr langwierig machte.

Alle experimentell verwendeten Tiere stammen aus Zuchtkolonien, bei welchen vorwiegend die Männchen zu Forschungszwecken herausgenommen werden und die Weibchen für die weitere Zucht in der Gruppe belassen werden. Daher werden vor allem männliche Rhesusaffen verwendet, wenn es für das entsprechende Experiment nicht zwingend weiblicher Tiere bedarf. Vor allem aus diesem Grund waren wenige Möglichkeiten gegeben, die Zellausbeuten aus dem weiblichen Genitaltrakt weiter zu verbessern. Hier lagen die Zellausbeuten bei den Geweben Vagina, Cervix und Uterus von gesunden Rhesusaffen durchschnittlich nur bei 4-6x10<sup>6</sup> Zellen.

Das Nasen-assoziierte lymphatische Gewebe (NALT) ist bei Menschen (Debertin et al., 2003) und Mäusen (Rodrigues et al., 2007) bereits ansatzweise charakterisiert worden. Das NALT ist für therapeutische und immunologische Aspekte in verschiedenen Erkrankungen von Bedeutung (siehe Kapitel 5.5). Dieses wurde speziell im Rhesusaffen bislang nicht beschrieben. Die Entdeckung und die ersten Charakterisierungen wurden von J. Knips mittels immunhistologischer Analysen durchgeführt (Arbeitsgruppe von Prof. Ràcz, Bernhard-Nocht Institut, Hamburg; nicht publizierte Daten). Im Rahmen einer Kooperation ergab sich im Laufe dieser Arbeit die Möglichkeit, die Technik der NALT-Präparation zu übernehmen. Es wurde für die Isolation mononukleärer Zellen aus diesem Gewebe ein neues Protokoll entworfen mit dem durchschnittliche Zellausbeuten von 5x10<sup>6</sup> Zellen erzielt wurden. Dies ermöglichte eine erstmalige durchflusszytometrische Untersuchung und Charakterisierung des NALTs als weiteres mukosales Gewebe. Die Ergebnisse aller NALT-Analysen werden separat in Kapitel 5.5 diskutiert.

# 5.2 Bedingte Vergleichbarkeit durchflusszytometrischer Analysen von Biopsie- und Resektatproben

In der Literatur finden sich weiterhin durchflusszytometrische Analysen von Biopsie- und Resektatmaterial, die gleichwertig miteinander verglichen wurden (Veazey et al., 2000). Bisher wurde aber keine detaillierte Analyse der unterschiedlich gewonnenen Gewebeproben hinsichtlich ihrer Vergleichbarkeit durchgeführt. Für eine exakte Beurteilung dieser Frage müssten Zellisolationen von Biopsie- und Resektatmaterial von demselben Tier zeitgleich analysiert werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit aus logistischen Gründen nicht möglich. Es wurden daher Daten von Sektions- und Biopsiematerial von unterschiedlichen uninfizierten Tieren gegenübergestellt und

hinsichtlich der für die HIV/SIV-Forschung relevanten T-Zellpopulationen analysiert. Dies zeigte, dass die Anteile an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Zellisolationen von Duodenumbiopsien und -resektaten weitgehend vergleichbar sind. In Colonbiopsien waren die Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen etwas niedriger und die der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zum Resektat etwas höher. Die Anteile der Gedächtniszellen beider T-Zellpopulationen waren in den Biopsien beider Darmabschnitte höher im Vergleich zum Resektat. Da bei den Biopsien nur ein Teile der oberen Mukosa entnommen wird und beim Resektat eine Zellisolation aus dem gesamten Gewebe erfolgt, ist es leicht nachvollziehbar, dass sich zwischen diesen beiden Gewebeproben Unterschiede der prozentualen Verhältnisse in verschiedenen Lymphozytenpopulation ergeben. Auch ein höherer Anteil an Gedächtniszellen in den oberen Schichten der Mukosa ist durch den erhöhten Kontakt mit Pathogenen plausibel erklärbar. So machten diese Ergebnisse aber deutlich, dass nicht von einer prinzipiellen Vergleichbarkeit von unterschiedlich gewonnenem Probenmaterial desselben Organs ausgegangen werden kann. Daher wurde in dieser Arbeit nur gleichwertiges Probenmaterial miteinander verglichen.

# 5.3 Physiologische Unterschiede der verschiedenen mukosalen Gewebe hinsichtlich mehrerer Lymphozytenpopulationen

Für die umfangreiche Untersuchung vieler verschiedener Organe und vor allem für eine vergleichende Charakterisierung des physiologischen Normalzustandes war die Analyse von Organen gesunder Rhesusaffen eine wesentliche Voraussetzung. Des Weiteren waren diese Daten essentiell für den späteren Vergleich infektionsbedingter Veränderungen bei SIV bzw. RT-SHIV-infizierten Rhesusaffen. Dies machte eine Euthanasie gesunder Tiere nötig. Da dies ethisch schwer vertretbar ist, wurde die Tierzahl so gering wie möglich gehalten und die Sektionen in Kooperation mit mehreren Arbeitsgruppen aufgrund verschiedener Fragestellungen organisiert.

In dieser Arbeit wurde eine durchflusszytometrische Zellanalyse von bis zu acht mukosalen Organen von jedem unfizierten Tier durchgeführt. Diese Analyse wurden mit zusätzlichen Untersuchungen von *ex vivo* gewonnener bronchoalveolärer Lavage von uninfizierten Rhesusaffen ergänzt. Somit wurde hier erstmals eine umfangreiche vergleichende durchflusszytometrische Charakterisierung von neun verschiedenen mukosalen Kompartimenten in uninfizierten Rhesusaffen vorgenommen. Eine derartige Untersuchung ist in der Literatur noch nicht beschrieben und kann demnach auch anderen Arbeitsgruppen als Vergleich für ihre Infektionsforschung an Rhesusaffen dienen.

Die Zusammensetzung von Lymphozytenpopulationen ist stark vom Alter der Tiere abhängig (Sopper et al., 1997; Pitcher et al., 2002). Es wurde daher in dieser Arbeit darauf geachtet, dass zum Datenvergleich nur gesunde Tiere verwendet wurden, die ungefähr im gleichen Alter waren wie die SIV-infizierten Rhesusaffen. Außerdem wurden nicht benötigte isolierte Zellen aus den mukosalen Geweben kryokonserviert, um für spätere Fragestellungen und Analysen zur Verfügung zu stehen.

Wie bereits erwähnt, wird bei Studien mit SIV-infizierten Tieren häufig nur ein Darmabschnitt untersucht, der als repräsentativ für alle mukosale Kompartimente angesehen wird. Im Allgemeinen ist bekannt, dass sich Mukosa-assoziierte Gewebe vor allem durch höhere Anteile an Gedächtniszellen vom Blut unterscheiden (Zeitz et al., 1991).

Die vergleichende durchflusszytometrische Charakterisierung der neun verschiedenen mukosalen Kompartimente in uninfizierten Rhesusaffen ergab, dass sich die untersuchten Gewebe hinsichtlich ihrer Lymphozytenzusammensetzung nicht nur vom Blut unterscheiden, sondern auch teils stark untereinander variieren. Das Jejunum wies beispielsweise neben anderen Geweben wie Vagina und Cervix einen signifikant höheren Anteil an T-Zellen im Vergleich zum Blut, sowie zu den Darmabschnitten Colon und Duodenum auf. Des Weiteren sind im Jejunum signifikant weniger B-Zellen im Vergleich zu allen anderen Darmabschnitten zu finden. Im BAL konnten ähnliche Verhältnisse hinsichtlich der prozentualen Anteile an B- und T-Zellen wie im Jejunum festgestellt werden. Nennswert ist auch der relativ hohe Anteil an NK-Zellen in der Cervix gegenüber allen anderen Kompartimenten.

Die nächste wichtige Analyse bestand im Vergleich der verschiedenen mukosalen Organe hinsichtlich ihrer prozentualen Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Von dieser Population sollten speziell die CCR5-exprimierenden Zellen bestimmt werden, da diese primäre Zielzellen von SIV darstellen (Chen et al., 1997). Dieser Chemokinrezeptor wird von Gedächtnis T-Zellen exprimiert und ist somit auf einem Großteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Darm, Lunge und der Vagina zu finden. In der akuten Phase der SIV-Infektion kommt zu einer massiven Depletion dieser Zellpopulation (Mattapalil et al., 2005; Nishimura et al., 2004; Veazey et al., 2003).

In den Untersuchungen dieser Arbeit zeigten alle mukosalen Gewebe (mit Ausnahme des NALT) signifikant niedrigere Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zum Blut, dagegen liegen höhere prozentuale Anteile an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber auch CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen

(anteilig an CD4<sup>+</sup> T-Zellen) vor. Von allen Kompartimenten wies das Jejunum den niedrigsten Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf und unter den Darmabschnitten den höchsten Prozentsatz an CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen. Bei beiden T-Zellpopulationen ergab sich ein signifikanter Unterschied zum Colon.

Bemerkenswert ist auch der sehr hohe Anteil von ca. 60% an CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen im BAL im Vergleich zu 23–38% dieser Zellen in den Darmabschnitten und dem weiblichen Genitaltrakt. Ebenso konnte in fast allen Geweben ein signifikant höherer Protzentsatz an CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> und CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> Gedächtniszellen festgestellt werden. Alle hier untersuchten Organe haben ständigen Kontakt mit verschiedensten Pathogenen. Daher es ist nicht überraschend, dass tendenziell ein höherer Anteil an zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und allgemein an Gedächtniszellen vorliegt.

Eine wichtige Feststellung war hier, dass sich die verschiedenen mukosalen Gewebe grundlegend hinsichtlich mehrerer T-Zellpopulationen voneinander unterscheiden. Vor allem die vier Darmabschnitte wiesen auch untereinander erhebliche Unterschiede auf, was in den drei Geweben des weiblichen Genitaltrakts dagegen nicht festzustellen war. So ist davon auszugehen, dass sich auch während einer SIV-Infektion in den mukosalen Geweben verschiedene Situationen darstellen. Dies ist einerseits schon durch die unterschiedlichen Anteile an SIV-Zielzellen abzusehen. Andererseits ist auch durch die unterschiedliche Lymphozytenzusammensetzung zu erwarten, dass in den verschiedenen mukosalen Organen nicht dieselbe immunologische Reaktion auf eine SIV-Infektion induziert wird.

# 5.4 Unterschiedlich ausgeprägter prozentualer Verlust an CD4<sup>+</sup> TZellen in verschiedenen mukosalen Geweben

### 5.4.1 Höchste Reduktion an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Jejunum von SIV-infizierten Tieren im Endstadium der Krankheit

Es gibt eine Reihe von Publikationen, die den massiven CD4-Verlust bei SIV-infizierten Rhesusaffen in unterschiedlichen Darmabschnitten (Mattapallil et al., 2005; Veazey et al, 1998) sowie im weiblichen Genitaltrakt beschreiben (Veazey et al., 2003). Bisher wurde jedoch noch keine Analyse durchgeführt, die die Höhe der CD4-Depletion in verschiedenen Organen miteinander vergleicht. Hier wurde anhand von elf SIV-infizierten Tieren mit hoher Viruslast und teils schon AIDS-ähnlichen Symptomen erstmals eine

detaillierte Analyse zu den Unterschieden im CD4-Verlust in acht verschiedenen mukosalen Geweben durchgeführt.

Der wichtigste Befund hierbei war die unterschiedlich stark ausgeprägte Depletion an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den vier Darmabschnitten. So war in allen Dünndarmabschnitten, Duodenum, Jejunum und Ileum, ein stärkerer CD4-Verlust als im Colon zu beobachten. In dem längsten Darmabschnitt, dem Jejunum, der die wichtigste Rolle hinsichtlich der Nährstoffresorption spielt, wurde die höchste Depletion an CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 95% festgestellt.

Pathologische Untersuchungen an SIV-infizierten Rhesusaffen zeigten vor allem im Jejunum das Auftreten abnormaler morphologischer Strukturen (SIV-Enteropathie), eingeschränkte Aktivität verschiedener Verdauungsenzyme und Defekte im Reifungsprozess proliferierender Epithelzellen ohne das Vorhandensein opportunistischer Infektionen (Heise et al., 1993; Stone et al., 1994). Dies bestätigt bereits, dass die Schädigungen des Dünndarms, speziell des Jejunums, eine zentrale Rolle bei der SIV/HIV-Krankheitssymptomatik bezüglich chronischen Durchfalls und Malabsorption spielen. In dieser Arbeit zeigte sich, dass dies auch mit einer massiveren Reduktion an CD4<sup>+</sup> T-Zellen als bei den übrigen Darmabschnitten assoziiert ist, was zusätzlich die Manifestation opportunistischer Infektionen stark begünstigt.

Es wird davon ausgegangen, dass die massive Virusreplikation in den intestinalen Lymphozyten die Entwicklung und die Funktion der absorptiven Epithelzellen stört und so die Dysfunktion des Dünndarms verursacht (Heise et al., 1992). Es wurde bisher jedoch in keiner Studie detailliert untersucht, welche molekularen Vorgänge den CD4-Verlust und die generellen Symptome der Enteropathie verbinden.

Der stärkere Verlust im Jejunum ist wahrscheinlich begünstigt durch die allgemein höheren Anteile an T-Zellen und speziell auch der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> Zellen gegenüber den anderen Darmabschnitten, was bei der Analyse der uninfizierten Rhesusaffen festgestellt wurde. Auch in der eher apathogen verlaufenden RT-SHIV-Infektion konnte im Jejunum ein stärkerer CD4-Verlust als im Duodenum und Colon beobachtet werden (siehe auch Kapitel 4.6 und 5.6.3).

# 5.4.2 Korrelation zwischen dem prozentualen Verlust CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der Menge an CTLs in den vier Darmabschnitten

Unter den elf SIV-infizierten Tieren befanden sich sechs *Mamu\*A01*-Tiere, bei welchen die prozentualen Anteile der virusspezifischen zytotoxischen T-Zellen (CTL) mittels

Tetramer-Technik in allen mukosalen Geweben bestimmt wurden. Es zeigte sich, dass die durchschnittlichen Anteile der CTLs mit dem prozentualen Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den vier Darmabschnitten korrelierten.

Zwischen den sechs *Mamu\*A01*-Tiere und den fünf Tieren, die das Allel nicht aufwiesen, konnte in allen untersuchten Kompartimenten kein Unterschied im prozentualen Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass in den einzelnen Geweben eine grundlegend unterschiedlich starke virusspezifische Immunantwort während der Infektion induziert wird, die in den vier Darmabschnitten mit dem Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen korreliert und nicht vom genetischen Hintergrund der Tiere abhängt.

In der Literatur wird zwar das Vorhandensein virusspezifischer T-Zellen im Darm beschrieben (Baig et al., 2002; Veazy et al., 2001), jedoch findet sich keine vergleichende Analyse aller Darmabschnitte oder eine Korrelation zu den intestinalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

## 5.4.3 Starke Depletion an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im weiblichen Genitaltrakt trotz hoher Anteile an CTLs

Da in den Versuchsreihen wegen der besseren Verfügbarkeit vorwiegend männliche Tiere verwendet werden, konnten leider nur drei SIV-infizierte Weibchen bezüglich des CD4-Verlusts im weiblichen Genitaltrakt untersucht werden. Die Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen lag hier zwischen 73% und 81% und war somit ähnlich ausgeprägt wie im Darm. Diese Befunde bestätigen Studien anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine starke Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Vagina und Cervix von infizierten Rhesusaffen beschrieben haben (Veazey et al., 2003). Weiterhin ist bekannt, dass der Verlust der CTLs im Blut auf einen fortschreitenden Krankheitsverlauf hindeutet (Marcondes et al., 2008). Daher waren die relativ hohen prozentualen Anteile an viruspezifischen CTLs in Vagina und Cervix der beiden *Mamu\*A01*-Weibchen 2191 und 2188 überraschend. Hier lag der Anteil der virusspezifischen T-Zellen noch über 3%, wohingegen in allen anderen mukosalen Geweben und im Blut der Anteil der CTLs unter 0,5% lag.

Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete ebenfalls hohe Anteile an Tetramer-positiven Zellen im weiblichen Genitaltrakt im Vergleich zu anderen Organen in infizierten Tieren. Allerdings befanden sich deren Tiere in der chronischen Phase der Infektion (Stevceva et al., 2002). Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Tiere hatten bereits AIDS-ähnliche Symptome und wiesen einen fast kompletten Verlust der CTLs im Blut und im Darm auf. Im Gegensatz dazu waren die Anteile der CTLs in Vagina und Cervix noch verhältnismäßig hoch. Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten weiblichen Tiere

ergab sich hier keine direkter Zusammenhang zwischen dem CD4-Verlust und den CTLs. Die Ergebnisse dieser Rhesusaffen geben jedoch bereits einen Hinweis darauf, dass die virus-spezifische Immunantwort in Vagina und Cervix während der Infektion länger und in höherem Maße aufrechterhalten werden kann als im Blut und anderen mukosalen Geweben.

#### 5.4.4 Hohe Prozentsätze an CTLs in drei potentiellen Viruseintrittspforten

Beim Vergleich aller *Mamu\*A01*-Tiere zeigten sich im Colon, Vagina und Cervix von allen Kompartimenten die höchsten durchschnittlichen Anteile an CTLs (siehe Tab. 4.11). Diese drei Gewebe repräsentieren die entscheidenden Viruseintrittspforten in der sexuellen Übertragung von HIV, wobei eine detaillierte Analyse bezüglich der Vergleichbarkeit der Darmabschnitte Colon und Rektum noch aussteht. Trotzdem sind diese Ergebnisse ein wichtiger Hinweis darauf, dass diese Gewebe ein höheres Potential zur virusspezifischen Immunantwort während der SIV-Infektion besitzen. Genauere Analysen dieser speziellen Zellpopulation und weiterer SIV-spezifischer Immunantworten in Colon bzw. Rektum und dem weiblichen Genitaltrakt wären sinnvoll. Genauere Kenntnisse über das allgemeine Potential dieser Gewebe zur virusspezifischen Immunabwehr ist Voraussetzung für die Entwicklung einer mukosalen Vakzine.

#### **5.5** NALT

Das NALT ist ein mukosales Gewebe, das bereits im Menschen (Debertin et al., 2003) und in Mäusen (Rodriguez-Monroy et al., 2007) ansatzweise charakterisiert wurde. Die Nähe zur Blut-Hirn-Schranke kann z.B. durch die nasale Applikationen von Therapeutika gegen die HIV-induzierte Demenz zum effektiven Transport ins Gehirn genutzt werden (Hanson et al., 2007). Außerdem spielt das NALT eine zentrale Rolle bei der nasalen Immunisierung, durch die bereits die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen verschiedene Erreger, wie z.B. *Neisseria meningitidis* und *Corynebacterium diphtheriae*, in humanen Studien gezeigt werden konnte (Huo et al., 2005; McNeela er al., 2004). Eine nasale Immunisierung induziert im Gegensatz zu einer intragastrischen allgemein eine frühere und stärker mukosale Immunantwort. Des Weiteren bestätigten bereits Vakzine-Experimente im SIV-Rheususaffenmodell eine starke Induktion SIV-spezifischer humoraler Immunantworten im Blut, Rektum und im weiblichen Genitaltrakt nach nasaler Immunisierung (Buge et al., 1997; Imaoka et al., 1998)

Über die prozentualen Verhältnisse verschiedener Lymphozytenpopulationen im NALT von Rhesusaffen ist bislang nichts bekannt. Diese ersten durchflusszytometrischen Analysen von uninfizierten Tieren in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass dieses Gewebe eine ähnliche Zusammensetzung an Lymphozyten aufweist wie das Blut und sich deutlich von den anderen mukosalen Geweben unterscheidet. Die prozentualen Anteile an CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> T-Zellen im NALT ergaben keinen Unterschied zum Blut. Das NALT zeigte jedoch als einziges mukosales Gewebe niedrigere Anteile an T-Zellen, dafür aber einen höheren Prozentsatz an B-Zellen als das Blut und alle andere untersuchten Organe.

Ebenso wurde bei der durchflusszytometrischen Analyse der SIV-infizierten Tiere im letzten Teil der Arbeit beobachtet, dass es im NALT, ähnlich wie im Blut, zu einem CD4-Verlust von ca. 35% kommt. Dieser ist im Gegensatz zu allen anderen mukosalen Geweben, die einen prozentualen CD4-Verlust zwischen 66,5% und 94,7 % zeigen, relativ schwach ausgeprägt. Die Analysen von SIV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe der Tetramer-Technik konnte bisher nur bei drei Tieren durchgeführt werden. Daraus ergab sich durchschnittlich ein höherer prozentualer Anteil an CTLs im Vergleich zum Blut. Diesbezüglich sind jedoch weitere Analysen nötig, um einen eventuellen signifikanten Unterschied zu bestätigen und die Charakterisierung der virusspezifischen Immunantwort zu erweitern.

Trotz der geringen Anzahl an Proben machen die Analysen aber bereits deutlich, dass das NALT hinsichtlich der Lymphozytenzusammensetzung und der prozentualen Reduktion an CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Sonderstellung unter den mukosalen Geweben einnimmt.

Welche Bedeutung dieses Kompartiment für mögliche nasale oder orale Immunisierungen in der HIV/SIV-Forschung haben könnte, ist aufgrund der wenigen Kenntnisse noch unklar. Unter Berücksichtigung der unmittelbaren Nähe zur Blut-Hirnschranke ist die Verwendung viraler replikationsfähiger Kontrukte, z.B. rekombinanter Adenoviren, eventuell ungeeignet. Jedoch sollte das bereits erwähnte prinzipielle Potential dieses Gewebes zur Induktion starker virusspezifischer Immunantworten in verschiedenen Organen für künftige Vakzine-Experimente verstärk berücksichtigt und genutzt werden.

### 5.6 Aufbau eines geeigneten Makaken-Modells zur Wirksamkeitsüberprüfung eines neuen Mikrobizides

Da noch kein wirksamer Impfstoff gegen HIV in Aussicht ist, stellt die Entwicklung eines potenten Mikrobizids derzeit eine der erfolgversprechendsten Möglichkeiten dar, vor allem die Zahl der heterosexuellen HIV-Übertragungen zu reduzieren (Wilson et al., 2008). Da beim Geschlechtsverkehr die Wahrscheinlichkeit der HIV-Übertragung vom Mann auf die Frau höher ist als umgekehrt, sind Frauen von vorneherein einem höheren Infektionsrisiko ausgesetzt (Padian et al., 1991). Die Verwendung von Kondomen stellt für viele Frauen aus sozialen oder kulturellen Gegebenheiten gerade in den Schwellen- und Entwicklungsländern ein großes Problem dar (Moscicki, et al., 2008; Brouwers et al., 2008). Ebenso können v.a. auch Prostituierte in diesen Ländern nicht immer auf die Benutzung von Kondomen bestehen. Ein wirksames Mikrobizid wäre daher für viele Frauen eine hilfreiche Alternative sich zu schützen, ohne dass der Sexualpartner davon Kenntnis erlangt.

In dieser Arbeit wurde in einem zweistufigen Experiment der antivirale Wirkstoff MC1220 in zwei verschiedenen Gelformulierungen getestet. MC1220 ist ein NNRTI, der zu einer neuen Klasse von Wirkstoffen gehört, die trotz hoher Konzentrationen *in vitro* keine Anzeichen von Toxizität hervorrufen. Für die Belastungsinfektion wurde das HIV/SIV-Hybridvirus RT-SHIV verwendet, welches derzeit die einzige Möglichkeit bietet, HIV-NNRT-Inhibitoren im Rhesusaffenmodell zu untersuchen (Balzarini et al., 1995).

RT-SHIV basiert auf dem Virusstamm SIVmac239 und induziert *in vitro* einen weniger ausgeprägten zytopathischen Effekt (CPE, engl. *cytopathic effect*) als SIVmac239 (persönliche Mitteilung Dr. Christiane Stahl-Hennig). Jedoch verläuft die RT-SHIV-Infektion in indischen Rhesusaffen ähnlich wie bei SIVmac239 (Überla et al., 1995). Wegen der zunehmenden Knappheit an indischen Rhesusaffen auf dem Weltmarkt waren für dieses Experiment nur weibliche Tiere chinesischer Herkunft verfügbar. Es gab bisher jedoch keinerlei Studien, die die RT-SHIV-Infektion in chinesischen Rhesusaffen untersuchten. Es ist lediglich bekannt, dass chinesische Tiere im Vergleich zu Tieren indischen Ursprungs einen milderen Krankheitsverlauf nach experimenteller SIVmac239 Infektion aufweisen (Ling et al., 2002; Trichel et al., 2002).

In einem Vorexperiment mit wenigen Rhesusaffen wurde die optimale Infektionsdosis für die vaginale Infektion mit RT-SHIV ermittelt. Dabei konnten im Verlauf der RT-SHIV-Infektion niedrigere Viruslasten und kaum Veränderungen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut der chinesischen Versuchstiere beobachtet werden (persönliche Mitteilung Dr. Stahl-Hennig).

Da RT-SHIV bisher noch nie in chinesischen Rhesusaffen verwendet wurde, sollte die Infektion im Verlauf und vor allem im Hinblick auf Veränderungen der Lymphozytenzusammensetzung in verschiedenen mukosalen Kompartimenten im Rahmen des SHIVA-Experiments detaillierter untersucht werden.

Eine HIV-Übertragung über die Vaginalschleimhaut hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab und kann im Tiermodell nur begrenzt nachgestellt werden. Um einer natürlichen HIV-Exposition mit einem hohen Infektionsrisiko im Tiermodell möglichst nahe zu kommen, wurden in diesem Experiment drei Maßnahmen ergriffen. (i) Die Dicke des Vaginalepithels variiert während des hormonellen Zyklus und ist während der Lutealphase am dünnsten. Daher ist das Epithel zu diesem Zeitpunkt für die HIV-Infektion besonders empfänglich (Sodora er al., 1998; Poonia et al., 2006). Durch eine Progesteronbehandlung wurde der hormonelle Zyklus der Tiere synchronisiert und die Dicke des Epithels verringert. Dadurch war gewährleistet, dass die Belastungsinfektion für alle Tiere in der Phase stattfand, bei der die Suszeptibilität der Vagina für SIV/HIV am höchsten ist (Marx et al., 1996; Mingjia et al., 2002). (ii) Da auch die Viruslast im Sperma mit der im Blut korreliert, geht ein erhöhtes Ansteckungsrisiko von HIV-infizierten Männern in der akuten Phase und im Endstadium der Erkrankung aus (Dulioust et al., 1998). Daher wurde die Belastungsinfektion mit einer hohen Virusdosis von 8x10<sup>5</sup> TCDI<sub>50</sub> durchgeführt. (iii) Das Virusinokulum enthielt zusätzlich 50% humanes Seminalplasma, um dem natürlichen Milieu während des Geschlechtsverkehrs möglichst nahe zu kommen. In einer aktuellen Publikation wurde berichtet, dass das PAP-Protein (engl. prostastic acid phosphatase) im Sperma durch Fibrillenbildung die Infektionseffizienz von HIV erheblich erhöht (Münch et al., 2007), was die Bedeutsamkeit dieses Aspekts unterstreicht.

### 5.6.1 Partieller Schutz eines NNRTI-Mikrobizides vor vaginaler RT-SHIV-Infektion

In dem Experiment SHIVA-1 zeigten die Gruppen, die mit dem "Einfachen Gel" oder dem "Komplexen Gel" je versetzt mit 0,1% des Wirkstoffs MC1220 behandelt wurden, eine vergleichbare Anzahl an infizierten Tieren und keinen Unterschied zu den jeweiligen Kontrollgruppen. Nur in der Gruppe mit dem "Komplexen Gel" und der höheren Wirkstoffkonzentration von 0,5% MC1220 waren drei von fünf Tieren vor einer systemischen RT-SHIV Infektion geschützt. Daraus ergab sich eine eindeutige dosisabgängige Schutzrate von 60%.

Die Wirksamkeit des "Komplexen Gels" mit 0,5% MC1220 wurde im Experiment SHIVA-2 nochmals überprüft und konnte mit einer vergleichbaren Schutzrate von 50% (zwei von vier Tieren geschützt) bestätigt werden. Zusätzlich wurde versucht, einen verbesserten Schutz vor Infektion zu erzielen, indem die Wirkstoffkonzentration im "Komplexen Gel" für eine weitere Tiergruppe auf 1,5% MC1220 erhöht wurde. Da drei von fünf Tieren (Schutzrate 40%) infiziert waren, ergab sich daraus kein erhöhter Schutzeffekt. Anscheinend führte die erhöhte Konzentration im Gel nicht zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes MC1220 im Vagina- und Cervixgewebe. Demzufolge wird derzeit daran gearbeitet, die Gelformulierungen so zu modifizieren, um eine höhere Wirkstoffkonzentration und -freisetzung zu ermöglichen.

### 5.6.2 Virusspezifische Immunantwort in den iliakalen Lymphknoten bei geschützten Tieren

Die zum Zeitpunkt der Sektion erhobenen Daten mittels ELISPOT nach virusspezifischer Antigen-Stimulation zeigten in vier von sechs geschützten Tieren eine virusspezifische INFy-Sekretion in den iliakalen (3/6) oder in axillären Lymphknoten (1/6). Die Induktion einer virusspezifischen Immunantwort in den Lymphknoten könnte zwei mögliche Ursachen haben. Trotz der intrazellulären Inhibition der Virusreplikation könnte es zu einer ausreichenden Antigenpräsentation gekommen sein, da eine hohe Anzahl an infektiösen Viruspartikeln (8x10<sup>5</sup> TCDI<sub>50</sub>) zur Belastungsinfektion verwendet wurde. Weiterhin wäre es denkbar, dass es kurzfristig zu einer sehr geringen lokalen Virusreplikation gekommen ist, die sich jedoch aufgrund der Reaktionen der angeborenen Immunantwort systemisch nicht manifestieren konnte. Bei allen Tieren, bei denen während des Versuchsverlaufs keine systemische virale RNA im Plasma nachgewiesen wurde, konnte ebenfalls kein Virus aus den Lymphknoten oder anderen Organen zum Zeitpunkt der Sektion reisoliert werden. Aufgrund der relativ geringen Zellausbeuten war eine Analyse der virusspezifischen Immunantwort von vaginalen Lymphozyten nicht möglich. Des Weiteren konnte nicht untersucht werden, ob eine lokale RT-SHIV-Infektion im weiblichen Genitaltrakt bei den geschützten und den infizierten Tieren vorlag. Eine Virusreisolierung aus diesen Zellen war vor allem wegen der mikrobiellen Kontamination nicht erfolgreich und die Methode zur quantitativen Analyse der RNA- und DNA-Viruslast aus Zellen bzw. Gewebe war zu diesem Zeitpunkt noch nicht etabliert. Jedoch ist nicht davon auszugehen, dass die virusspezifische Immunantwort in den iliakalen Lymphknoten auf einer permanenten lokalen Virusreplikation im weiblichen Genitaltrakt basiert.

In der Literatur gibt es mehrere Beispiele, vor allem von Prostituierten in Entwicklungsländern, die trotz mehrfacher Exposition mit HIV keine systemische Infektion aufweisen. Bei diesen Frauen konnte in der Cervix und teils auch systemisch eine HIV-spezifische zelluläre Immunantwort nachgewiesen werden (Alimonti et al., 2006; Fowke et al., 2000; Kaul et al., 2000). Dieses beim Menschen beobachtete Phänomen ähnelt der hier in diesem Experiment festgestellten Situation in einigen geschützten Tieren. Die Induktion eines Immunisierungseffekts durch die Verwendung des Mikrobizides war nicht völlig über-raschend. In einer anderen Mikrobizid-Studie wurde nach rektaler Belastungsinfektion eine lokale virusspezifische Immunantwort festgestellt (Cranage et al., 2008).

Auch die Verwendung eines Mikobizides mit einer experimentellen Schutzrate von "nur" 60% könnte in der Praxis schon einen deutlich höheren Schutzeffekt vermitteln, da die meisten Kontakte mit HIV-infizierten Personen erfolgen, die sich in der chronischen Phase der Infektion befinden. Wie bereits erwähnt, korreliert die RNA-Viruslast im Sperma mit der Viruslast im Blut, und die höchste Ansteckungsgefahr geht vor allem von HIV-Infizierten in der akuten Phase aus (Quinn et al., 2000; Dulioust et al., 1998). Die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit einer Ansteckung mit HIV bei einem einmaligen ungeschützten heterosexuellen Sexualkontakt liegt bei 1:500-1000 (De Vincenzi 1994). Neben der Infektion über das Vaginalepithel kann HIV vor allem auch über CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen oder dendritische Zellen in der Cervix in den Körper eindringen. Die Cervix besitzt im Gegensatz zur Vagina nur ein einschichtiges Plattenepithel und dort vorhandene inflammatorische Zellen begünstigen die HIV-Infektion (Pomerantz, 1988). Studien haben gezeigt, dass der Gebrauch eines Diaphragmas nachweislich das Risiko einer Infektion mindert (van der Straten et al., 2005). So könnte anstelle eines Kondoms eine kombinierte Verwendung von Diaphragma und Mikrobizid bereits einen deutlichen Schutz vor HIV bieten.

Des Weiteren hat unter Verwendung des Mikrobizids die virale Exposition bei einigen systemisch geschützten Tieren zu einer lokalen virusspezifischen Immunantwort in den iliakalen Lymphknoten geführt. Dieser positive Nebeneffekt könnte ebenfalls einen entscheidenden Beitrag dazu leisten, Frauen bei wiederholter Exposition mit HIV vor einer Infektion zu schützen. Im Rhesusaffenmodell konnte gezeigt werden, dass 18 Stunden nach vaginaler SIV-Infektion die ersten infizierten Zellen im Genitaltrakt und auch bereits in den iliakalen Lymphknoten zu finden sind (Hu et al., 2000). Falls es zu einem Eindringen von HIV-Partikeln über das Vaginalepithel kommt, könnte eine dortige

virusspezifische Immunantwort die nachfolgende Virusvermehrung in den Lymphknoten und die systemische Ausbreitung des Virus verhindern.

Des Weiteren ist hier zu berücksichtigen, dass die Schutzeffekte für die erste Abschätzung der Wirksamkeit auf einer sehr geringen Anzahl von Tieren basiert. Nächste Schritte wären die Verbesserung der Gelformulierung, gezielte weiterführende Untersuchungen in einer größeren Tierkohorte oder in einer klinischen Studie. Eine sinnvolle Erweiterung des hier untersuchten Mikrobizides bestände in der Kombination mit weiteren antiviralen Wirkstoffen, z.B. Protease- und/oder Fusionsinhibitoren aus der HAART-Therapie, um dadurch den Schutzeffekt zu erhöhen.

## 5.6.3 Apathogen verlaufende RT-SHIV-Infektion in Rhesusaffen chinesischer Herkunft mit starker Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Jejunum

In dem Mikrobizid-Experiment konnte außerdem beobachtet werden, dass RT-SHIV im Gegensatz zu SIV *in vitro* einen sehr schwachen zytopathischen Effekt induziert. Dies deutete bereits darauf hin, dass RT-SHIV grundsätzlich eine geringere Replikations-kompetenz besitzt als SIVmac. *In vivo* lag zudem die Spitzenviruslast meist nur im Bereich von 10<sup>5</sup> viralen RNA-Kopien pro ml Plasma. Eine SIVmac239-Infektion induziert im Gegensatz dazu etwa 10<sup>7</sup> virale Kopien während der akuten Phase (Suh et al., 2008). Dies und die zum Zeitpunkt der Sektion erhobenen Daten wiesen darauf hin, dass sich die RT-SHIV-Infektion in Rhesusaffen chinesischer Herkunft anders verhält als eine SIV-Infektion oder die RT-SHIV-Infektion in Tieren indischen Ursprungs (Überla et al., 1995). So war beispielsweise bei den Tieren 13567, 13569, 13328, 13091 und 13100 aus dem SHIVA-1-Experiment und R03 und R14 aus SHIVA-2 zum Zeitpunkt der Sektion keine virale RNA-Viruslast mehr im Plasma nachweisbar. Bei zwei Tieren aus dieser Gruppe (13567, R14) konnte zudem auch kein Virus mehr aus den untersuchten Organen reisoliert werden.

Um den Verlauf der RT-SHIV Infektion in Rhesusaffen chinesischer Herkunft näher zu analysieren, wurden die Tiere von SHIVA-1 und SHIVA-2 retrospektiv, aufgrund der Ergebnisse beider Virusnachweismethoden, in jeweils zwei Gruppen eingeteilt; die eine bestehend aus den infizierten, die andere bestehend aus den geschützten Tieren.

Die durchflusszytometrische Analyse der T-Lymphozyten im Verlauf der RT-SHIV Infektion ergab, dass die infizierten Tiere in SHIVA-1 eine signifikante Abnahme der prozentualen Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Woche 4, 6, 8 und in SHIVA-2 nur zu Woche 6

nach Belastungsinfektion zeigten. Gleichzeitig wurde ein Anstieg der CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt. Es konnte jedoch kein ausgeprägter Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Phase der Spitzenvirämie, der für die SIV-Infektion in Rhesusaffen typisch ist, beobachtet werden (Schulte et al., 2009). Es ist nicht eindeutig klar, ob hier bei der RT-SHIV-Infektion eine schwache Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorliegt oder die Veränderung der beiden T-Zellpopulationen aus einer infektionsbedingten Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen resultiert. Bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestand in beiden Experimenten zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen.

Eine Depletion der CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> Gedächtniszellen im Blut ist charakteristisch für die akute Phase der SIV-Infektion (Sopper et al., 2000). Bei der Analyse dieser T-Zellpopulation konnte dies jedoch in beiden SHIVA-Experimenten nicht beobachtet werden. Es zeigte sich im gesamten Beobachtungszeitraum nach der Belastungsinfektion mit RT-SHIV kein Unterschied zwischen den infizierten und den geschützten Tieren.

Ähnliche Zusammenhänge wurden in der Studie mit HIV-Patienten beschrieben. HIV-Varianten, die *in vitro* einen schwächeren CPE zeigen, induzieren im Patienten ebenfalls eine niedrigere Viruslast und einen schwächeren CD4-Verlust im Blut als Virusvarianten mit einem höheren CPE (Koot et al., 1993).

Bei der Sektion der Tiere wurden die Auswirkungen der RT-SHIV-Infektion auf drei verschiedene Darmabschnitte und auf die Gewebe des weiblichen Genitaltrakts untersucht. Vor allem im Jejunum war eine signifikante Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den infizierten Tieren zu beobachten. Auch im Duodenum und Colon wurde eine leichte Reduktion festgestellt, eine statistische Signifikanz war allerdings nicht gegeben. Die Ergebnisse zu den systemischen CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Verlauf und der Virusisolation zum Zeitpunkt der Sektion zeigen bereits, dass die RT-SHIV Infektion in chinesischen Rhesusaffen eher apathogen verläuft.

Auch in Vagina, Cervix und Uterus wurde eine Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und eine Erhöhung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den infizierten Tieren festgestellt. Die etwas niedrigeren Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im weiblichen Genitaltrakt der geschützten Tiere im Vergleich zu den uninfizierten Tieren spricht dafür, dass es hier möglicherweise nur zu einer lokalen transienten Virusreplikation gekommen ist, die eine leichte Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzierte. Eine andere Erklärung wäre, dass der Antigenstimulus durch inhibiertes Virus bzw. Antigenpräsentation allein eine lokale Immunantwort verbunden mit einer

Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierte, die die prozentualen Veränderungen der beiden T-Zellpopulationen erklärt.

Aus den Ergebnissen des Mikrobizid-Experiments und den weiteren Untersuchungen zum Verlauf der RT-SHIV-Infektion wurde deutlich, dass diese Infektion in chinesischen Rhesusaffen eher apathogen verläuft. Es wurden einige Unterschiede zu einer pathogenen SIV-Infektion festgestellt. Jedoch ist dies trotzdem ein geeignetes Modell zur Wirksamkeitsüberprüfung von Mikrobiziden, die auf NNRT-Inhibitoren gegen HIV basieren.

# 5.7 Virusspezifische T-Zellen und physiologische Anteile an CD4+ T-Zellen in mukosalen Geweben von LTNPs

Eine Analyse von LTNPs, die sich vor allem durch die natürliche effektive Kontrolle der Viruslast auszeichnen, ist im Tiermodell oft schwierig, da der Prozentsatz der Tiere, die sich zu LTNPs entwickeln, relativ gering ist. Innerhalb des ersten Jahres nach Infektion mit SIV entwickeln 70% der Rhesusaffen AIDS-ähnliche Symptome (Kestler et al., 1990). Vor allem bei Rhesusaffen indischer Herkunft entwickeln sich in der Regel schneller Krankheitssymptome als bei Tieren chinesischer Herkunft (Ling et al., 2002; Trichel et al., 2002).

In dieser Arbeit ergab sich jedoch die einmalige Chance eine große Kohorte von LTNPs indischen Ursprungs detailliert zu analysieren. Diese LTNPs stammen aus verschiedenen Impfstoffexperimenten und wurden mit Tieren, die einen fortschreitenden Krankheitsverlauf aufwiesen, verglichen. Der mögliche Einfluss vorangegangener Immunisierungen wurde daher retrospektiv analysiert. In der Gruppe der LTNPs und der Progressoren wurden jeweils die immunisierten und nicht immunisierten Tiere miteinander verglichen. In beiden Kohorten konnte jeweils nur eine Reduktion der Spitzenviruslast in den immunisierten Tieren festgestellt werden (Schulte et al., 2009). Es zeigte sich jedoch kein Unterschied im weiteren Verlauf der Infektion. Dies schließt eindeutig einen Einfluss vorher erfolgter Immunisierungen auf den hier untersuchten LTNP-Status dieser Rhesusaffen aus und macht die Besonderheit dieser Tiere deutlich.

Die Untersuchung von LTNPs, die auf natürliche Weise und ohne therapeutische Maßnahmen in der Lage sind, die Viruslast effektiv zu reduzieren, ist ein sehr wichtiger Aspekt in der HIV-Forschung. Detaillierte Kenntnisse über die natürliche Kontrolle der

Viruslast sind Voraussetzungen für eine zukünftige Verbesserung und Weiterentwicklung neuer Ansätze der Impfstoffentwicklung.

Ein zentrales Problem in der HIV-Infektion besteht in der massiven Schädigung der mukosalen Gewebe vor allem während der frühen Phase der Infektion und der Manifestation vieler opportunistischer Infektionen in Darm und Lunge im Endstadium der Krankheit (Wallace, 1998; Chui et al., 1994). Daher wurden in dieser Arbeit detaillierte Analysen verschiedener mukosaler Organe von LTNPs durchgeführt und mit denen von Progressoren verglichen. Dies erlaubt Rückschlüsse, welche Unterschiede zwischen diesen Tiergruppen bestehen und welche immunologischen Aspekte mit der Krankheitsentstehung assoziiert sind. Daneben ist bei der Charakterisierung der LTNPs der Vergleich zu uninfizierten Tieren entscheidend. Dies zeigt, welche möglichen mukosalen Defizite oder andere Unterschiede, die LTNPs infektionsbedingt aufweisen, die jedoch nicht zur Krankheitsentwicklung führen.

Der Übergang vom LTNP-Status zum Progressor ist darüber hinaus ein sehr interessanter, jedoch oft schwer zu erfassender Vorgang. Um diese Phase der Krankheit exakt zu charakterisieren oder einen möglichen prognostischen Marker zu identifizieren, ist eine alleinige regelmäßige Analyse der Viruslast nicht ausreichend. Interessant sind die immunologischen Vorgänge, die unmittelbar mit dem Anstieg der Viruslast assoziiert sind oder unmittelbar vorher vonstatten gehen. Um diesen Vorgang experimentell zu erfassen, ist eine regelmäßige Analyse aller LTNPs nötig, da im Voraus nicht klar ist, wann ein Tier den Status des LTNP verliert.

Genauere Kenntnisse über immunologische Aspekte von LTNPs können auch als Grundlage für die Weiterentwicklung therapeutischer Vakzinen dienen. Das Ziel dabei ist, die natürliche Immunantwort gegen HIV gezielt zu verstärken und eine Regeneration des geschädigten Immunsystems zu induzieren (Lu et al., 2002 und 2004). Hierdurch könnte die chronische Phase der Infektion verlängert und das Eintreten des AIDS-Stadiums auf natürliche Weise hinausgezögert werden. Dies wäre eine sinnvolle Alternative zur teuren und mit zahlreichen schweren Nebenwirkungen verbundenen HAART.

# 5.7.1 Physiologische Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, hohe Anteile der virusspezifischen T-Zellen und geringer Immunaktivierung in mukosalen Geweben von LTNPs Die Depletion der CD4<sup>+</sup> und speziell auch der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen in mukosalen

Geweben von SIVmac239 oder SIVmac251 infizierten Rhesusaffen während der akuten

Phase der Infektion ist hinreichend veröffentlicht und oft als irreversibel beschrieben worden (Li et al., 2005; Mattapallil et al., 2005; Veazey et al., 1998).

In dieser Arbeit wurden Blut, BAL und die beiden Darmabschnitte Colon und Duodenum von 14 LTNPs im Vergleich zu Progressoren und uninfizierten Tieren analysiert. Die Kohorte der LTNPs wies im BAL und Colon normale Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf, und es zeigten sich in allen Kompartimenten signifikant höhere Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu Progressoren. Da sich die Spitzenviruslasten der LTNPs in der akuten Phase nicht von denen der Progressoren unterschied (siehe Kapitel 4.7.1 Abb. 4.13), kann deswegen und aufgrund aller bisherigen Publikationen von einer initialen Depletion dieser T-Zellpopulation bei den hier untersuchten LTNPs ausgegangen werden. Gleichzeitig belegen wenige neuere Publikationen bei SIV-infizierten Rhesusaffen chinesischer Herkunft, dass während der akuten Phase der Infektion zwischen LTNPs und Progressoren kein Unterschied in der initialen Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Jejunum und BAL bestand (Ling et al., 2007; Nishimura et al., 2006). Jedoch war in beiden Studien die Repopulation der mukosalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur in Tieren festzustellen, die anschließend die Viruslast kontrollierten. Dies war somit eindeutig mit einem längeren Überleben der Rhesusaffen assoziiert. Auch bei HIV-Patienten, die eine natürlich Kontrolle der Viruslast aufwiesen, konnten bisher zumindest für einen Darmabschnitt (Jejunum) normale prozentuale Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden (Guadalupe et al., 2003). In der natürlichen und apathogen verlaufenden Infektion von Grünen Meerkatzen mit SIVagm konnte ebenfalls eine initiale Depletion und eine anschließende Repopulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Darm festgestellt werden (Pandrea et al., 2007).

Die im Vergleich zu Progressoren signifikant höheren, sich teils im physiologischen Bereich bewegenden Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in drei mukosalen Geweben der hier untersuchten LTNPs sind somit sehr wahrscheinlich auf Repopulation zurückzuführen. Eine derartige Beobachtung in LTNPs indischer Herkunft ist bisher nicht beschrieben worden.

Die in Tab. 4.7 zusammengefassten Ergebnisse zeigen für die Progressoren, die eine hohe RNA-Viruslast im Plasma aufwiesen, eine Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Blut, BAL, Duodenum und Colon. Gleichzeitig besitzt die Population der CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen erhöhten Anteil an aktivierten Zellen, was über die Oberflächenexpression von HLA-DR analysiert wurde. Des Weiteren waren die Anteile der virusspezifischen zytotoxischen T-Zellen in allen Kompartimenten niedriger als in den LTNPs.

Bei Betrachtung der LTNPs ist festzustellen, dass sich die Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen in Colon und BAL nicht von den uninfizierten Tieren unterschieden. Im Blut und Duodenum dagegen war eine Depletion an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und gleichzeitig eine erhöhte HLA-DR-Expression zu beobachten. Interessanterweise wiesen auch Blut und Duodenum niedrigere prozentuale Anteile an CTLs auf als BAL und Colon. Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass die Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer erhöhten Aktivierung dieser Zellpopulation und niedrigeren Anteilen an CTLs assoziiert ist, was für alle untersuchten Organe von Tieren im fortgeschrittenen Krankheitsstadium gilt. Außerdem bestand dieser Zusammenhang in geringerer Ausprägung aller Parameter auch bei LTNPs in den Komparimenten Blut und Duodenum.

Bei der Immunaktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte ein ähnlicher Trend wie bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden, jedoch war dieser sowohl zwischen den einzelnen Tiergruppen als auch bei den unterschiedlichen Organen weniger stark ausgeprägt.

Die stärkere Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen hat jedoch eine entscheidende Bedeutung während der Infektion. Im SIV-Modell wurde belegt, dass aktivierte CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen in verschieden Organen die fünffache Menge an viralen RNA-Kopien produzieren (Zhang et al., 1999). Bei HIV-Patienten konnte nur im Blut bestätigt werden, dass ein erhöhter Aktivierungsstatus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer erhöhten Virusreplikation und einer zunehmenden CD4-Deletion einhergeht (Leng et al., 2001). Dagegen weisen natürlich infizierte Rußmangaben, die keine AIDS-Symptome entwickeln, trotz hoher Viruslast normale Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und keine erhöhte Immunaktivierung oder Zellproliferation auf (Silvestri et al., 2003; Chakrabarti et al., 2000). Dadurch kommt es nicht zur Erschöpfung des Immunsystems, was in der pathogenen HIV- bzw. SIV-Infektion durch den permanenten Aktivierungszustand und massiven T-Zellumsatz in der Regel zu beobachten ist (Sachenberg et al., 2003; Silvestri et al., 2003; Kaur et al., 2000). So scheint in der pathogenen SIV-Infektion von Rhesusaffen eine Kontrolle der Viruslast, virusspezifische CTLs und höchstens eine leichte Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Voraussetzung für weitgehend physiologische Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Blut und den mukosalen Geweben zu sein. Dies sind anscheinend alles wesentliche Voraussetzungen für den LTNP-Status und dessen langfristige Aufrechterhaltung.

#### 5.7.2 Niedrigere CCR5 Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Darm von LTNPs

Bei der Analyse der primären SIV-Zielzellen konnte in Blut und BAL von LTNPs im Gegensatz zu den beiden Darmabschnitten Duodenum und Colon keine Depletion der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden. Aufgrund des extrem hohen physiologischen Prozentsatzes der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen (ca. 60%) im BAL, der bei der Analyse der uninfizierten Rhesusaffen festgestellt wurde, war dies ein überraschendes Ergebnis.

Darm exprimieren alle CD4<sup>+</sup> T-Zellen den Chemokinrezeptor CCR5 in unterschiedlicher Stärke auf ihrer Oberfläche (Mattapallil et al., 2005). Die hier untersuchte Zellpopulation stellt daher nur die CD4<sup>+</sup>CCR5 hoch positiven Zellen dar. Bei allen übrigen Zellen ist die Expression von CCR5 auf der Oberfläche zu gering, um sie durchflusszytometrisch als CCR5 positiv identifizieren zu können. Die LTNPs wiesen nur im Colon und Duodenum signifikant geringere Anteile an CD4<sup>+</sup>CCR5 hoch positiven Zellen auf. Dies spricht dafür, dass einerseits speziell im Duodenum keine vollständige Repopulation dieser Zellpopulation stattgefunden hat, da zudem ein niedriger Prozentsatz der CD4<sup>+</sup> Gesamtpopulation festgestellt wurde. Im Colon konnten ebenfalls niedrigere Anteile der CD4<sup>+</sup>CCR5 hoch positiven T-Zellen beobachtet werden. Es lag jedoch ein normaler Prozentsatz an CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es nach der initialen Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in beiden Darmabschnitten hauptsächlich zu einer Einwanderung von CCR5 niedrig positiven Zellen kam. Da aber alle CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Darm suszeptibel für das Chemokin sind, scheint eine vollständige Repopulation speziell dieser CD4<sup>+</sup>CCR5 hoch positiven T-Zellen für ein intaktes lokales Immunsystem und für den Gesundheitszustand der Tiere nicht nötig zu sein. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob sich diese Zellpopulation aufgrund weiterer Oberflächenantigene von den übrigen Zellen unterscheidet.

Ein ähnliches Phänomen konnte durch experimentelle SIV-Infektion von den natürlichen Wirten, Sooty Mangabys, Mandrills, Grünen Meerkatzen u.a. beobachtet werden (Veazey et al., 2003; Pandrea et al., 2007). Hier wurde nach der Infektion eine niedrigere Expression von CCR5 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut, Lymphknoten und mukosalem Gewebe nachgewiesen, jedoch kein Unterschied in der Gesamtpopulation an CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Veazey et al., 2003). Möglicherweise kann die Reduktion der primären SIV-Zielzellen sowohl in der natürlichen wie auch in der pathogenen SIV-Infektion einen Beitrag zur Reduktion der Virusreplikation und klinischen Gesundheit der Tiere leisten.

## 5.7.3 Korrelation zwischen der RNA-Viruslast im Plasma und den Anteile an CD4<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen im Blut und den mukosalen Geweben

Unter Einbeziehung aller infizierten Tiere errechnete sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen der RNA-Viruslast im Plasma zu den prozentualen Anteilen an CD4<sup>+</sup> und der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen in allen Kompartimenten. Bei dieser Analyse wird jedoch der bereits bestehende Verlust beider Zellpopulationen im Vergleich zu uninfizierten Tieren nicht mit einbezogen. Hieraus wird aber deutlich, dass eine steigende Viruslast eine steigende Depletion von CD4<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen in Blut, BAL, Duodenum und Colon zur Folge hat. Die Korrelation zwischen der Viruslast und der Depletion der CD4<sup>+</sup> bzw. der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen ist für das Blut in der SIV- und HIV-Infektion hinreichend beschrieben (Jiao et al., 2006; Duoek et al., 2003). Keine Puplikation beschreibt eine direkte Korrelation zwischen der sytemsichen Viruslast und der Depletion an mukosalen T-Zellen in einzelnen Organen.

Hier wurde in einer großen Gruppe von SIV-infizierten Tieren eine Korrelation der RNA-Viruslast im Plasma mit der Depletion an CD4<sup>+</sup> bzw. der CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen in Blut und drei verschiedenen mukosalen Geweben bestätigt. Diese Ergebnisse sind bereits ein deutlicher Hinweis, dass eine steigende Viruslast im Blut sehr wahrscheinlich mit einer steigenden Virusreplikation in den mukosalen Geweben assoziiert ist.

# 5.7.4 Langfristige Kontrolle der RNA-Viruslast im Plasma und konstante Anteile an CD4+ T-Zellen in Blut und den mukosalen Organen bei LTNPs

Diese Arbeit ermöglichte eine Langzeitanalyse der LTNPs, die bei einigen Tieren schon etwa zu Woche 70 nach Infektion begonnen wurde. Zu diesem Zeitpunkt lag definitionsgemäß noch kein LTNP-Status vor, jedoch zeichneten sich diese Tiere bereits durch ihre niedrige Viruslast aus.

Die Analysen über zwei Jahre lieferten wichtige Informationen zu verschiedenen Parametern über einen langen Zeitraum der Infektion. Bei den meisten Tieren konnte parallel zu einer stabilen Kontrolle der Viruslast gleich bleibende Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Blut, BAL, Duodenum und Colon festgestellt werden. Bei einzelnen Tieren konnten Schwankungen der prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Duodenum und Colon, beispielsweise bei dem Tier 2139, beobachtet werden (siehe Kapitel 4.8 Abb. 4.21). Diese Unterschiede gingen einerseits nicht mit einer gleichzeitigen Veränderung dieser T-Zellpopulationen im BAL einher und waren zudem nicht bei allen Tieren zu beobachten. Beide Aspekte sprechen dafür, dass diese Schwankungen auf technischen Variablen bei der Entnahme der Biopsien beruhen. Denn beim Bioptieren kann die Anzahl an Lymphfollikeln in den entnommenen Geweben nicht beeinflusst werden, und zudem kann die Tiefe der Biopsieentnahme aus dem Darmgewebe variieren. So kann man aber trotz einiger Schwankungen von relativ konstanten Anteilen der untersuchten T-Zell-

populationen ausgehen. Die Biopsieentnahme sollte aber in Zukunft unbedingt weiter verbessert und standardisiert werden.

Die starke Zunahme der CTLs im Colon bei dem Tier 2153 konnte bei keinem anderen Rhesusaffen beobachtet werden (Abb. 4.21 B) und ist nicht durch die Variabilität der Biopsieentnahme allein zu erklären. Mit der hier verwendeten Tetramer-Technik können nur CTLs detektiert werden, die spezifisch das CM9-Peptid von SIV-Gag erkennen. Möglich wäre hier in diesem speziellen Fall das lokale Auftreten einer Virus-Mutante, die nicht die Sequenz des CM9-Peptids betrifft. Die erhöhte Virusreplikation könnte eine Erhöhung der CTL-Anteile induziert haben. Die Entwicklung von Virus-Mutanten begrenzt auf einzelne Organe konnte im SIV-Modell bereits beobachtet werden (Moniuszko et al., 2005)

## 5.7.5 Generalisierter Verlust an CTLs und der Anstieg der infektiösen Zellen als Charakteristikum für den Verlust des LTNP-Status

Im Laufe der Langzeitanalyse dieser LTNPs konnte anhand von zwei Tieren (2191, 12536) beobachtet werden, dass ein starker Verlust der CTL in Blut und den mukosalen Geweben parallel vonstatten geht und mit einem Anstieg der viralen RNA-Viruslast assoziiert war (siehe Kapitel 4.8.1 Abb. 4.21). Der wesentliche Unterschied der beiden Rhesusaffen bestand darin, dass das Tier 2191 einen kompletten Verlust der CTLs sowie einen gleichzeitigen Anstieg der infektiösen Zellen im Blut aufwies und AIDS-ähnliche Symptome entwickelte. Dagegen zeigte das Tier 12536 ebenfalls einen starken Verlust an CTLs, die Werte fielen jedoch zwischen Woche 104 zu 163 nach Belastungsinfektion von 5-18,5% nur auf 0,7-1,8% (% von CD8<sup>+</sup> T-Zellen) ab. Dies entspricht noch prozentualen Verhältnissen von anderen LTNPs (12671, 2151). Zudem konnte bei diesem Rhesusaffen kein Anstieg der infektiösen Zellen im Blut beobachtet werden (siehe Kapitel 4.8.2 Abb. 4.22).

Es ist bekannt, dass bei HIV-Patienten im Plasma die Anzahl an infektiösen Viruspartikeln tausendfach niedriger sein kann als die mittels qRT-PCR festgestellte RNA-Viruslast, zudem kann dieses Verhältnis individuell variieren (Rusert et al., 2004; Piatak et al., 1993). Jedoch wurde hier keine Langzeitanalyse durchgeführt sondern nur eine Querschnittsstudie.

Die Ergebnisse des Tieres 12536 zeigten, dass trotz kontinuierlichem Anstieg an viralen RNA-Kopien im Plasma (von Woche 104 bis 163 nach Belastungsinfektion) keine ansteigende Anzahl an infektiösen Zellen im Blut festzustellen war. Daraus geht klar hervor,

dass ein Anstieg der RNA-Viruslast nicht unbedingt mit einen Anstieg an infektiösen Zellen bzw. einer erhöhten Produktion an infektiösen Viruspartikeln einhergeht. Zudem macht dies deutlich, dass die individuelle Betrachtung der Tiere unter Berücksichtigung mehrerer viraler und immunologischer Parameter erforderlich ist, um eine Erklärung für das Auftreten klinischer Symptome zu finden. So kann die alleinige Betrachtung der RNA-Viruslast und der systemischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Kriterium für therapeutische Maßnahmen bei HIV-Patienten durchaus irreführend sein. Der leichte Anstieg der RNA-Viruslast im Plasma von 2,6x10<sup>3</sup> auf 4,5x10<sup>3</sup> (zwischen Woche 102 und 154 nach Belastungsinfektion) bei dem Tier 2191 war nicht mit einer Reduktion an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut assoziiert, jedoch entwickelten sich kurz darauf AIDS-ähnliche Symptome. Dagegen war bei dem Tier 12536 der Anstieg der Viruslast von 1x10<sup>2</sup> auf 3,0x10<sup>3</sup> RNA Kopien pro ml Plasma (zwischen Woche 104 und 163 nach Belastungsinfektion) ebenfalls nicht mit einer Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, aber vor allem nicht mit einer erhöhten Anzahl an infektiösen mononukleären Zellen assoziiert. Überdies ist dieses Tier weiterhin klinisch unauffällig.

Hier zeigte sich, dass die wesentliche Ursache für die Entstehung AIDS-ähnlicher Symptome im kompletten Verlust der CTLs mit gleichzeitigem Anstieg der infektiösen Zellen liegt. Beide Parameter sind möglicherweise als zusätzliche prognostische Marker für einen progredienten Krankheitsverlauf in der HIV-Infektion besser geeignet als die RNA-Viruslast und die Depletion der CD4-Zellen im Blut als alleinige Kriterien.

Ein Auftreten von CM9-Virus-Mutanten ist mit geringen Anteilen an Tetramer-positiven Zellen assoziiert (Moniuszko et al., 2005). Dieser Zusammenhang könnte den Verlust der CTLs mit gleichzeitigem Anstieg an infektiösen Zellen und der RNA-Viruslast im Plasma bei dem Tier 2191 erklären. Dies könnte für das Tier 12536 möglicherweise auch zutreffen, jedoch müsste ein Großteil der Mutanten nicht mehr infektiös sein. Dieser Aspekt wird unter Kapitel 5.10 ausführlicher diskutiert.

# 5.8 Ausgeglichene zelluläre und humorale Gag-spezifische Immunantwort im Blut von LTNPs

Der Nachweis einer virusspezifischen zellulären Immunantwort erfolgte zunächst zeitgleich zur Oberflächenanalyse mit Hilfe der Tetramer-Technik. Dies ermöglichte allerdings nur bei *MamuA01\**-Tieren die Bestimmung virusspezifischer CTLs, die gegen das CM9-Epitop von SIV-Gag gerichtet sind. Deshalb wurde dann eine Untersuchung der humoralen und zellulären Immunantwort aller LTNPs und Progressoren mittels ELISA und

ELISPOT durchgeführt. Dies ergab, dass die meisten Tiere eine zelluläre und humorale virusspezifische Immunantwort besitzen. Ausnahmen bildeten die Tiere 12535 und 12671, welche beide keine zelluläre Immunantwort und 12671 zusätzlich nur eine sehr schwache humorale Antwort aufwiesen.

In einer Studie mit HIV-Patienten, die ohne HAART eine niedrige Viruslast im Plasma aufwiesen, wurde eine multifaktorielle Kontrolle der Viruslast festgestellt. Außerdem konnte belegt werden, dass ein geringer Antigenstimulus ausreichte, um eine virusspezifische Immunantwort aufrecht zu erhalten (Kloosterboer et al., 2005). Andererseits führte eine Reduktion der RNA-Viruslast im Plasma nach Beginn der HAART-Therapie in HIV-Patienten zu einem Rückgang der zellulären virusspezifischen Immunantwort (Gray et al., 1999; Kalams et al., 1999). Möglicherweise gibt es bei den LTNPs Unterschiede in der Effektivität der Kontrolle der Virusreplikation, die mit der routinemäßig bestimmten RNA-Viruslast im Plasma nicht differenziert werden kann. Offenbar fehlt bei einigen Tieren ein ausreichender Antigenstimulus, der zur Aufrechterhaltung der virusspezifischen Immunantwort nötig ist.

Vor allem aber der Vergleich der hier untersuchten Immunantworten zwischen LTNPs und Progressoren sollte einen Hinweis auf die prinzipiellen Unterschiede der beiden Tiergruppen liefern. Bei der humoralen Immunantwort konnte eine signifikant höhere Menge an Gag-spezifischen Antikörpern festgestellt werden. Ein Unterschied zwischen LTNPs und Progressoren in der Antikörperantwort gegen das virale Oberflächenprotein gp130 war jedoch nicht zu beobachten. Eine anti-Gag Antikörperantwort ist von prognostischer Bedeutung in der HIV-Infektion. So zeigen HIV-Patienten ohne Gagspezifische Antikörper einen schnelleren Krankheitsverlauf, dagegen konnten bei den Antikörper-Titern gegen das Hüllprotein von HIV keine Korrelation zum Krankheitsverlauf festgestellt werden (Binley et al., 1997).

Außerdem ergab diese Analyse in LTNPs signifikant höhere Anteile an INFγ–sezernierenden Zellen nach Gag-Stimulation im Vergleich zu Progressoren. Bei der hierzu verwendeten ELISPOT-Technik ist nur der alleinige Nachweis von INFγ-sezernierenden Zellen möglich und keine weitere Differenzierung zwischen verschiedenen T-Zell-populationen. Da gerade die zelluläre Immunantwort eine entscheidende Bedeutung in der Kontrolle der Viruslast spielt (Betts et al., 2006; Sun et al., 2006; Jin et al., 1999), wurde anschließend eine detailliertere Analyse der T-Zellpopulationen hinsichtlich ihrer

Zytokinproduktion mit Hilfe des polyfunktionalen ICS (engl. *intracellular cytokine staining*) durchgeführt.

#### 5.9 Hohes Potential zur Polyfunktionalität bei BAL-Zellen

# 5.9.1 Höhere Anteile polyfunktionaler T-Zellen nach polyklonaler Stimulation im BAL im Vergleich zum Blut von uninfizierten Rhesusaffen

Eine wesentliche Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, eine funktionelle Analyse von *ex vivo* gewonnenen mukosalen Lymphozyten bei LTNPs zu etablieren und mit der systemischen Immunantwort zu vergleichen. Aufgrund der hohen Zellausbeuten bot die Analyse von BAL-Zellen mit Hilfe des polyfunktionalen ICS die Möglichkeit einer umfangreichen Charakterisierung der zellulären Immunantwort in der Lunge. Außerdem vermeidet man hier die enzymbasierte Isolierung der mononukleären mukosalen Zellen aus dem Gewebe, die bei Darmbiopsien nötig ist (siehe Kapitel 3.7.3) und einen möglichen Einfluss auf die anschließende Stimulation der Zellen haben könnte. Die Untersuchung der BAL-Zellen erfolgte immer im Vergleich zu PBMC.

Da die Gedächtnis-T-Zellen eine entscheidende Rolle in der HIV/SIV-Infektion spielen (Sun et al., 2006; Hess et al., 2004), wurden hier die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> Gedächtniszellen hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion (INFγ, TNFα und IL2) untersucht.

Die Ergebnisse der polyklonalen Stimulation von BAL-Zellen und PBMC von uninfizierten Rhesusaffen ergab, dass in der Lunge die Anzahl an einfach positiven und vor allem polyfunktionalen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen signifikant höher ist als im Blut. Außerdem war der Anteil der polyfunktionalen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im BAL signifikant höher im Vergleich zum jeweiligen Anteil der einfach positiven Zellen. Dies zeigt bereits, dass in der Lunge *per se* einerseits mehr Zytokin-produzierende Zellen vorhanden sind und andererseits diese zusätzlich noch ein höheres Potential zur Polyfunktionalität besitzen.

# 5.9.2 Höhere Anteile an polyfunktionalen Zytokin-sezernierenden T-Zellen im BAL von LTNPs nach polyklonaler und virusspezifischer Stimulation im Vergleich zu Progressoren

Der Vergleich der Ergebnisse von uninfizierten Tieren mit LTNPs und Progressoren sollte eine grundlegende Auskunft darüber geben, wie sich das Potential an Zellen zur Zytokinsekretion nach polyklonaler Stimulation in den beiden SIV-infizierten Tiergruppen verhält.

Die Analyse ergab, dass die LTNPs sowohl bei den CD4<sup>+</sup> als auch bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut über höhere Anteile an Zytokin-produzierenden Zellen als die uninfizierten Tiere verfügten. Im BAL dagegen waren die Anteile auf ähnlichem Niveau wie bei den nicht infizierten Tieren. Die Zellpopulation der polyfunktionalen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in den LTNPs kleiner als bei den uninfizierten Tieren, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Hieraus wird jedoch bereits deutlich, dass es, bedingt durch die Infektion, im Blut und BAL zu unterschiedlichen Veränderungen der Anteile an Zytokin-produzierenden Zellen kommt. Ursache dafür ist vermutlich die massivere initiale Schädigung des mukosalen Immunsystems während der akuten Phase der Infektion im Vergleich zum Blut. In der Lunge scheint ein prozentualer Anstieg an Zytokinproduzierenden T-Zellen, der sich dagegen teilweise im Blut zeigte, nicht möglich zu sein. Weitaus wichtigere Ergebisse ergaben sich jedoch erst beim Vergleich der uninfizierten Tiere, LTNPs und Progressoren nach polyklonaler Stimulation. Hier konnte in allen untersuchten Zellpopulationen im Blut der Progressoren kein Unterschied zu den beiden anderen Tiergruppen festgestellt werden. Dagegen hatten die Progressoren im BAL vor allem signifikant niedrigere Anteile an polyfunktionalen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im BAL von Progressoren lagen durchschnittlich bei nur noch 5%, und deren funktionelle Analyse war daher schwierig. Offensichtlich ist jedoch, dass bei den Progressoren durch die massive Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im BAL auch die Zytokin-sezernierenden Zellen verloren gehen und fast keine CD4-T-Zellhilfe mehr vorhanden ist. Weiterhin weisen die signifikant niedrigeren Anteile an Zytokinproduzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen im BAL von Progressoren darauf hin, wie ausgeprägt die Immunschwäche im mukosalen Gewebe im Vergleich zum Blut ist. Dieser Aspekt unterstreicht, dass sich LTNPs und Progressoren hinsichtlich des allgemeinen prozentualen Anteils an Zytokin produzierenden Zellen im Blut kaum unterscheiden. Jedoch treten weitaus massivere Defizite im fortgeschrittenen Stadium der Infektion in der Lunge auf.

Durch Stimulation von BAL-Zellen und PBMC mit viralen Gag-Peptiden wurde die virusspezifische Immunantwort mittels des polyfunktionalen ICS analysiert. Nach dieser Stimulation konnte weder im BAL noch im Blut ein signifikanter Unterschied zwischen LTNPs und Progressoren hinsichtlich der CD4-vermittelten Zytokinsekretion festgestellt werden. LTNPs wiesen jedoch nach Gag-Stimulation im BAL signifikant mehr CD8<sup>+</sup> einfach positive und polyfunktionale T-Zellen im Vergleich zu den Progressoren auf.

Interessanterweise konnten nach Gag-Stimulation im BAL von LTNPs signifikant mehr polyfunktionale CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden als im Blut.

Durch diese Analyse wird deutlich, dass die LTNPs im Vergleich zu Progressoren sowohl eine höhere systemische wie auch eine mukosale virusspezifische CD8-vermittelte Zytokinsekretion besitzen. Des Weiteren war in LTNPs diese mukosale Immunantwort im BAL wesentlich ausgeprägter als im Blut.

Zusammen mit den Ergebnissen der polyklonalen Stimulation wird klar, dass Progressoren im BAL deutlichere Immundefizite aufweisen als im Blut. So ist offensichtlich, dass vor allem die mukosale Immunantwort einen wesentlichen Beitrag zur Kontrolle der Viruslast und zur Stabilisierung des Gesundheitszustandes leistet. Die Analysen der Progressoren belegen zudem, wie derartige massive Depletionen mehrerer funktionaler Zellpopulationen im mukosalen Immunsystem die Manifestation opportunistischer Infektionen ermöglicht. Die zytotoxische und antivirale CD8-Antwort spielt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Viruslast während der HIV/SIV-Infektion (Saksena et al., 2008; Hess et al., 2004; Jin et al., 1999). Jedoch konnte bisher nur in einer Studie mit HIV-Patienten belegt werden, dass polyfunktionale T-Zellen im BAL mit einem Erhalt der mukosalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert ist (Brenchley et al., 2008). Die Durchführung der bronchoalveolären Lavage ist ein nichtinvasiver Eingriff, und aufgrund der hohen Zellausbeuten sind damit umfangreiche Analysen möglich. In Zukunft könnte die funktionelle Untersuchung der BAL-Zellen bei HIV-Patienten als ein prognostischer Marker für die Krankheitsentstehung, vor allem hinsichtlich des Immunstatus in der Lunge und pulmonaler opportunistischer Infektionen, umfangreicher genutzt werden.

#### 5.10 Effektive Kontrolle der mukosalen Viruslast in den LTNPs

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen machten deutlich, dass die LTNPs neben einer effektiven Reduktion der Viruslast im Plasma über weitgehend normale Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen mukosalen Kompartimenten verfügten. Hinzu kam eine deutlich höhere virusspezifische Immunantwort in der Lunge im Vergleich zum Blut. Als nächstes wurde die Frage geklärt, wie sich die mukosale Viruslast der LTNPs zu der von Progressoren verhält.

Mittels Nachweis von viralen RNA-Genomkopien konnte dargestellt werden, dass LTNPs eine effektive Reduktion der mukosalen RNA-Viruslast in Duodenum, Colon und BAL im Vergleich zu Progressoren aufweisen. Sechs der elf untersuchten LTNPs hatten zum ent-

sprechenden Zeitpunkt eine geringe nachweisbare RNA-Viruslast im Plasma und bei nur vier Tieren konnte in einzelnen mukosalen Geweben eine geringe Menge an viralen RNA-Kopien bestimmt werden. Diese lag teilweise unterhalb der Quantifizierungsgrenze von 10 Kopien pro 500 ng Gesamt-RNA. Die Progressoren wiesen im Vergleich zu den LTNPs in allen mukosalen Geweben eine signifikant höhere RNA-Viruslast von bis zu 3,3x10<sup>7</sup> Kopien pro Gramm Darmgewebe auf.

Die Quantifizierung der RNA-Viruslast mittels qRT-PCR gibt keine Auskunft über die tatsächliche Anzahl an infektiösen Partikeln, da nur kleiner Teil des Gag-Gens amplifiziert wird. Es werden somit neben den intakten und vollständigen Viruspartikeln auch beispielsweise defekte Partikel und freie RNA-Genomfragmente detektiert. *In vitro* ist das Verhältnis von infektiösen zu nicht infektiösen SIV-Partikeln etwa 1:100-1:1000 (persönliche Mitteilung Dr. Christiane Stahl-Hennig). Bei HIV-Patienten kann die RNA-Viruslast im Plasma einige tausendfach höher sein als die Anzahl der infektiösen Viruspartikel, jedoch wurde eine signifikante Korrelation dieser festgestellt (Rusert et al., 2004; Piatak et al., 1993). Dies ist *in vivo* vor allem durch die individuelle Immunantwort und die dadurch erhöhte Mutationsrate bedingt, sowie das Vorliegen potentiell infektiöser Partikel in Immunkomplexen (Dianzani et al., 2002). Wie sich das Verhältnis der infektiösen zu den nicht infektiösen Viruspartikeln im Darm verhält ist unklar, jedoch kann man wahrscheinlich davon ausgehen, dass es sich ähnlich darstellt wie im Blut.

Eine Korrelationsanlyse unter Einbeziehung aller SIV-infizierten Tiere zeigte eine hoch signifikante Korrelation der mukosalen RNA-Viruslast in BAL, Duodenum und Colon zu der Anzahl an viralen RNA-Kopien im Plasma. Die in Kapitel 5.7.3 diskutierte Korrelation zwischen der steigenden RNA-Viruslast im Plasma mit den sinkenden prozentualen Anteilen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den mukosalen Geweben deutete bereits auf eine Zusammenhang zwischen systemischer und mukosaler Virusreplikation hin. Dies konnte mit den hier vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden.

Ähnliche Befunde bezüglich einer Korrelation der Viruslast zwischen Blut und einigen Organen wurden im SIV-Rhesusaffen mit Sektionsmaterial beschrieben (Moniuszko et al., 2005). Ob die Viruslast in Blut und mukosalen Geweben während des Infektionsverlaufs auch parallel verläuft, ist jedoch unklar und muss in weiteren Experimenten analysiert werden.

# 5.11 Weniger provirale DNA-Genomkopien in PBMC von LTNPs als bei Progressoren

Die Etablierung der Quantifizierung von proviralen DNA-Genomen mittels qRT-PCR sollte für die weitere Charakterisierung von LTNPs und für zukünftige neue Fragestellungen zur Verfügung stehen. Die effektive Kontrolle der RNA-Viruslast im Plasma und in den mukosalen Geweben bei LTNPs warf die Frage auf, wie sich die Anzahl von integrierten Virusgenomen in PBMC von LTNPs und Progressoren verhält und ob es eine Korrelation zur RNA-Viruslast im Plasma gibt.

In neun von zehn LTNPs konnten provirale DNA-Kopien in PBMC nachgewiesen werden, jedoch war die Anzahl signifikant niedriger als in Progressoren. Bei der Betrachtung aller infizierten Tiere ergab sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen der Menge an proviralen DNA-Genomen und viralen RNA-Kopien im Plasma.

Die Proviruslast in mukosalen Geweben konnte aus logistischen Gründen nur in den BAL-Zellen bestimmt werden. Überraschenderweise war in den BAL-Zellen von nur drei LTNPs provirale DNA nachweisbar. Beim Vergleich der proviralen Genomkopien zwischen PBMC und BAL-Zellen aller infizierten Tiere zeigten sich signifikant höhere Kopienzahlen in PBMC im Vergleich zu BAL-Zellen. Die niedrigen Kopienzahlen im BAL von Progressoren könnten an den extrem niedrigen Anteilen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen liegen. Dies liefert jedoch keine Erklärung für die niedrigen Proviruskopien in BAL-Zellen im Vergleich zu PBMC von LTNPs.

Wie bereits die Ergebnisse in Kapitel 4.7.9 und 4.10.4 belegen, wurde im BAL ein höherer Prozentsatz an **CTLs** sowie eine stärkere virusspezifische CD8-vermittelte Zytokinsekretion im Vergleich zum Blut festgestellt. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass diese ausgeprägte virusspezifische zelluläre Immunabwehr in LTNPs nicht nur zur Reduktion der RNA-Viruslast in BAL-Zellen, sondern auch zu der geringeren Anzahl an proviralen DNA-Genomen in diesen Zellen führt. Möglicherweise findet in der Lunge auch ein höherer T-Zellumsatz statt als im Blut, der zusätzlich einen Beitrag zur Eliminierung latent infizierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter Kontrolle der Viruslast leistet (siehe auch Kapitel 5.12).

In der Literatur werden von einigen Arbeitsgruppen parallele Analysen von RNA-Viruslast im Plasma und Proviruslast in PBMCs beschrieben (Negri et al., 2004) jedoch findet sich keine exakte Korrelationsanalyse dieser beiden Virusnachweismethoden.

Untersuchungen bei HIV-infizierten Patienten zeigten ähnliche Ergebnisse bezüglich der Unterschiede zwischen DNA- und RNA-Viruslast. So war bei Patienten mit fort-

schreitendem Krankheitsverlauf und solchen, die die Viruslast kontrollierten, die Differenz in der RNA-Viruslast größer als bei der Proviruslast (Broström et al., 1999).

### 5.12 Keine generelle Assoziation zwischen einer hohen RNA- bzw. DNA-Viruslast und der Anzahl an infektiösen Zellen im Blut

In dieser Arbeit wurden die drei folgenden Methoden zur Quantifizierung der Viruslast gegenübergestellt: RNA-Viruslast pro ml Plasma, Anzahl an infektiösen Zellen und provirale DNA-Genomkopien jeweils pro 1x10<sup>6</sup> PBMC. Diese drei Methoden liefern unterschiedliche Aussagen und Informationen über die Infektion. So werden bei der proviralen DNA-Viruslast vor allem integrierte Virusgenome detektiert, die latent oder aktiviert vorliegen können. Da auch hier mittels qRT-PCR nur ein Teil des Gag-Gens detektiert wird, gibt diese Methode keine Auskunft über den aktuellen viralen Aktivierungsstatus, die Vollständigkeit des Virusgenoms und mögliche letale Mutationen. Dies gilt in ähnlicher Weise auch für den Nachweis viraler RNA-Kopien, jedoch ist hier zweifelsfrei, dass eine aktive Produktion von viraler RNA vorliegt. Unklar bleibt hingegen, wie viele dieser RNA-Kopien wirklich aus infektiösen Partikeln stammen oder nicht infektiös als Immunkomplexe vorliegen (Dianzani et al., 2002). Analysen bei HIV-Patienten ergaben individuell große Differenzen zwischen der RNA-Viruslast und den infektiösen Viruspartikeln im Plasma (Rusert et al., 2004)

Die Bestimmung der zellassoziierten Viruslast mittels Virusreisolierung gibt Auskunft über die Anzahl an PBMC, die in der Lage sind, replikationsfähiges Virus zu produzieren. Hier erfolgt eine Kokultivierung von PBMC mit einer Indikatorzelllinie über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen mit anschließendem Nachweis infizierter Zellen. In der Vergangenheit zeigten Analysen, die vor allem in der frühen Phase der Infektion durchgeführt wurden, dass die Anzahl an infektiösen Zellen mit der Anzahl an viralen RNA-Kopien im Plasma korreliert (Kuate et al., 2006; Stahl-Hennig et al., 2007; Suh et al., 2008).

In einer Querschnittsanalyse wurde die Quantifizierung der SIV-Viruslast mit Hilfe aller drei Methoden von zehn LTNPs und fünf Progressoren gegenübergestellt. Wie bereits erwähnt, wurden in neun von zehn LTNPs, trotz effektiver Kontrolle der RNA-Viruslast im Plasma zwischen  $1x10^2$  und  $1x10^3$  provirale Genome pro  $1x10^6$  PBMC festgestellt.

Beim Vergleich aller infizierten Tiere ergab sich eine hoch signifikante Korrelation der Proviruslast in PBMC mit der RNA-Viruslast im Plasma. Zudem konnten signifikant mehr provirale DNA-Genomkopien als infektiöse Einheiten pro 1x10<sup>6</sup> PBMC festgestellt

werden. Beide Ergebnisse sind leicht zu erklären, da für das Vorhandensein bzw. die Aufrechterhaltung einer hohen RNA-Viruslast im Plasma auch eine große Anzahl an infizierten (Provirus-positiven) Zellen vorliegen muss. Andererseits wird bei der Quantifizierung der Proviruslast mittels qRT-PCR ebenfalls nur ein Teil der Gag-Sequenz amplifiziert, so dass man durchaus davon ausgehen kann, dass ein Teil der detektierten Provirusgenome replikationsinkompetent ist oder latent vorliegt. In HIV-Patienten wurde festgestellt, dass die Zahl an replikationskompetenten integrierten Provirusgenomen geringer ist als die Gesamtanzahl an nachweisbaren viralen DNA-Genomen in ruhenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Chun et al., 1998).

Bereits in der akuten Infektion wird ein Reservoir an latent infizierten ruhenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen gebildet und die Halbwertszeit dieser Zellen liegt bei ca. 44 Monaten (Finzi et al., 1999). Dies macht klar, dass eine vollständige Eliminierung infizierter Zellen trotz Kontrolle der Viruslast sehr unwahrscheinlich ist. Wie bereits in Kapitel 5.11 erwähnt, wäre aber in Verbindung mit einem natürlich erhöhten T-Zellumsatz in einzelnen Organen im Vergleich zum Blut eine stärkere lokale Reduktion der latent infizierten Zellen denkbar. Das latente Vorliegen replikationsfähiger integrierter Provirusgenome kann beispielsweise über Methylierung der DNA erfolgen (Bednarik et al., 1987). Eine gezielte Stimulation von PBMC zur Aktivierung der Virusreplikation würde hier weitere Hinweise liefern, wie viele der hier nachgewiesenen proviralen DNA-Genome überhaupt noch replikationsfähig sind.

Bei der individuellen Betrachtung einzelner Tiere wurde in diesem Zusammenhang ein interessantes Phänomen entdeckt. Bei den Tieren 2118 und 13251 konnten trotz hoher RNA-Viruslast und hoher Anzahl an Provirus-Kopien nur zwei infektiöse Zellen pro 1x10<sup>6</sup> PBMC nachgewiesen werde. Auch bei drei LTNPs konnte Provirus und virale RNA-Kopien im Plasma gemessen werden, jedoch nur bei einem Tier (9794) vier infektiöse Zellen pro 1x10<sup>6</sup> PBMC. Bei 2118, 13251 und besonders auch bei dem LTNP 12536 zeigt dies, dass eine hohe RNA-Viruslast im Plasma meist mit einer hohen Proviruslast assoziiert ist, jedoch nicht unbedingt mit einer hohen Anzahl an infektiösen Zellen. (Die hohe RNA-Viruslast im Plasma und die niedrige Anzahl von infektiösen Zellen im Blut wurde bei dem Tier 12536 bereits in Kapitel 5.7.5 diskutiert.)

Ein Fehler bei der routinemäßig im Labor durchgeführten Virusreisolierung mit der humanen Indikatorzelllinie (C8166) ist nach Beurteilung der Ergebnisse im Infektionsverlauf dieser Tiere und im Vergleich zu anderen Rhesusaffen ausgeschlossen. Ein

Wechsel des Korerezeptors von CCR5 auf CXCR4 wurde für SIV noch nicht beschrieben. Jedoch können auch CXCR4-trophe Virusstämme in C8166 Zellen replizieren, da diese ebenfalls den CXCR4-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Somit ist dies ebenfalls keine Erklärung für dieses Phänomen. Es wäre trotzdem sinnvoll, die Ergebnisse dieser Rhesusaffen auf einer anderen Zelllinie oder mit primären Affen-PBMC eines nicht infizierten Tieres zu bestätigen.

Diese Ergebnisse sprechen alle dafür, dass die Tiere 12536, 2118 und 13251 vor allem nicht infektiöse bzw. nicht replikationsfähige Viruspartikel produzieren. Dies kann verschiedene Ursachen haben.

Ein Defekt in der viralen Protease oder der Reversen Transkriptase würde eine Erklärung für dieses Phänomen liefern. Die Reifung der Viruspartikel erfolgt erst nach der Freisetzung aus der Zelle durch proteolytische Prozessierung der Gag-Vorläuferproteine (Cann et al., 1989). Erst dann sind die Viruspartikel in der Lage, eine andere Zelle zu infizieren. Eine defekte virale Protease hätte somit keinen Einfluss auf die Anzahl der produzierten Partikel, sondern nur auf deren Infektiösität. Durch gezielte Deletionen im Virusgenom konnte bestätigt werden, welche unterschiedlichen Mutationen zur Bildung nicht infektiöser Partikel führen (Young et al., 2006). Läge dagegen eine fehlerhafte Reverse Transkriptase vor, wären die Viruspartikel noch in der Lage, neue Zielzellen zu infizieren. Jedoch wäre eine weitere Replikation in den neuen Zielzellen nicht mehr möglich, da die RNA nicht in DNA umgeschrieben werden kann. Ein Defekt in diesen beiden viralen Enzymen würde das Vorhandensein der hohen RNA-Viruslast im Plasma zusammen mit der niedrigen Anzahl an infektiösen Zellen erklären und könnte durch eine Überprüfung der Funktionalität beider Enzyme bestätigt werden. Des Weiteren könnte eine hohe APOBEC (engl. apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide) Expression ebenfalls einen Beitrag zu dieser Situation leisten. APOBEC gehört zu den viralen Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems und wird durch die Interaktion mit dem viralen Gag-Vorläuferprotein in die Viruspartikel mit eingebaut (Luo et al., 2004). In der neuen Zielzelle kommt es durch APOBEC dann zu hohen Mutationsraten im viralen DNA-Genom (Zhang et al., 2003; Zheng et al., 2004) und zu replikationsinkompetenten integrierten Proviren (Mangeat et al., 2003).

Es ist eher unwahrscheinlich, dass die Viruspartikel in den Lymphknoten oder anderen lymphatischen Organen produziert werden und von dort ins Blut gelangen. Denn die erhöhte Präsenz von replikationsfähigen Viren würde zwangsläufig zu einer erhöhten Infektion und Virusreplikation in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Blutes führen.

#### 5.13 Abschließende Bewertung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert grundlegende Erkenntnisse über verschiedene mukosale Gewebe hinsichtlich ihrer physiologischen Lymphozytenzusammensetzung und deren infektionsbedingter Veränderungen in SIV-infizierten Rhesusaffen. In den untersuchten Geweben, die als Viruseintrittspforten dienen können, wurde eine grundsätzlich höhere und länger anhaltende virusspezifische Immunantwort während der SIV-Infektion festgestellt.

Weiterhin belegen die Analysen an LTNPs, dass eine starke mukosale Immunantwort eine wesentliche Voraussetzung für eine effektive Kontrolle der Viruslast und eine Regeneration des mukosalen Immunsystems ist. Um den mukosalen Immunstatus von Rhesusaffen in Impfstoff- und Pathogenesestudien besser beurteilen zu können, ist die Analyse der bronchoalveolären Lavage eine aussagekräftige und wenig invasive Methode. Generell sollte das natürliche Potential der mukosalen Immunabwehr in der HIV-Impfstoffentwicklung durch Strategien zur Induktion einer virusspezifischen lokalen Immunantwort besser genutzt werden. Ob ein Impfstoff dafür mukosal verabreicht werden muss, gilt es noch zu untersuchen. Ein Impfstoff, der wirksame Immunantworten an der Viruseintrittspforte induziert, könnte die sexuelle Übertragungsrate von HIV herabsetzen. Maßnahmen zur Stärkung und Regeneration des mukosalen Immunsystems könnten das Eintreten des AIDS-Stadiums hinauszögern und als Alternative zur teuren und mit zahlreichen schweren Nebenwirkungen verbundenen HAART dienen.

Weiterhin gab es in dieser Arbeit deutliche Hinweise darauf, dass die alleinige Betrachtung der RNA-Viruslast für prognostische Aussagen hinsichtlich des Krankheitsverlaufs irreführend sein kann. Daher sollten für HIV-Patienten weitere Parameter, wie Anteile der CTLs und Anzahl der infektiösen Viruspartikel als prognostischer Marker berücksichtigt werden.

Eine erste Studie zu Überprüfung der Wirksamkeit eines neuen Mikrobizides ergab einen deutlichen Schutz vor vaginaler Infektion. Um den Schutzeffekt weiter zu verbessern, wird derzeit an einer Modifikation der Gelformulierung gearbeitet, um eine erhöhte lokale Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes MC1220 zu erzielen.

Die in dieser Arbeit etablierten *ex vivo* Analysen mukosaler Gewebe hinsichtlich Lymphozytenzusammensetzung, Viruslast und zellulärer virusspezifischer Immunantworten dienen als Grundlage für weitere Studien an LTNPs. Zudem werden die Methoden künftig für Langzeitanalysen der mukosalen Gewebe in Impfstoffexperimenten vor und während der Immunisierung eingesetzt.

Da ein potenter Impfstoff gegen HIV in naher Zukunft nicht verfügbar sein wird, sollte vor allem der Schutz vor sexueller Übertragung durch die Entwicklung verschiedener präventiver Maßnahmen, sowie alternativer prognostischer und therapeutischer Ansätze für HIV-Patienten, stärker im Vordergrund der Forschung stehen.

#### 6. Zusammenfassung

Die massive infektionsbedingte Schädigung der mukosalen Gewebe sowie die vorwiegend sexuelle Übertragung von HIV über mukosa-assoziierte Gewebe erfordern genauere Kenntnisse dieser Organe.

Die vergleichende durchflusszytometrische Analyse neun verschiedener mukosaler Organe in nicht infizierten Rhesusaffen wies hinsichtlich mehrerer Lymphozytenpopulationen wesentliche Unterschiede der Gewebe untereinander und im Vergleich zum Blut auf sowie ein unterschiedlich ausgeprägter Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und virusspezifischer Immunantwort während der SIV-Infektion.

Die umfangreiche Analyse einer großen Kohorte von LTNPs ergab, dass die Besonderheit dieser klinisch unauffälligen SIV-infizierten Tiere in der langfristigen systemischen und mukosalen Kontrolle der Viruslast liegt. Dies geht einher mit physiologischen Anteilen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und einer geringen Immunaktivierung in Blut und verschiedenen mukosalen Geweben. Zudem leistet offensichtlich eine starke virusspezifische polyfunktionale mukosale Immunantwort einen wesentlichen Beitrag zur Aufrechterhaltung des LTNP-Status und zur Repopulation der mukosalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Die Langzeitanalyse SIV-infizierter Rhesusaffen lieferte deutliche Hinweise, dass ein Anstieg der RNA-Viruslast nicht zwangsläufig mit der Entstehung von AIDS-ähnlichen Symptomen assoziiert ist. Vor allem der komplette Verlust systemischer und mukosaler virusspezifischer T-Zellen sowie der Anstieg an Zellen, die infektiöse Partikel produzieren, sind offensichtlich von größerer prognostischer Bedeutung.

Mit Hilfe des RT-SHIV-Infektionsmodells unter Verwendung chinesischer Rhesusaffen fand die erste Wirksamkeitsüberprüfung zur Entwicklung eines neuen potenten Mikrobizides in Form eines Vaginalgels basierend auf einem NNRTI gegen HIV statt. Es konnte mit einer Wirkstoffkonzentration von 0,5% ein Schutz vor vaginaler RT-SHIV-Infektion in 50-60% der damit vorbehandelten Tiere festgestellt werden.

Da durch zahlreiche Impfstoff-Experimente eine sterile Immunität gegen HIV in den letzten 25 Jahren nicht möglich war, sollte gerade ein Schutz vor sexueller Übertragung zukünftig weiter im Vordergrund stehen. Dies sollte durch die Weiterentwicklung potenter Mikrobizide erfolgen. Weiterhin sollten künftige präventive und therapeutische Vakzinen unbedingt darauf abzielen, das hier festgestellte natürliche Potential der mukosalen Gewebe zur virusspezifischen Immunantwort zu stimulieren, um so die mukosale Übertragung von HIV zu reduzieren und die Sterberate bei HIV-Patienten zu senken.

#### 7. Literaturverzeichnis

- Ahmed, R. K., Biberfeld, G., and Thorstensson, R. (2005). Innate immunity in experimental SIV infection and vaccination. *Mol Immunol* **42**(2), 251-8.
- Akbar, A. N., Terry, L., Timms, A., Beverley, P. C., and Janossy, G. (1988). Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* **140**(7), 2171-8.
- Alimonti, J. B., Kimani, J., Matu, L., Wachihi, C., Kaul, R., Plummer, F. A., and Fowke, K. R. (2006). Characterization of CD8 T-cell responses in HIV-1-exposed seronegative commercial sex workers from Nairobi, Kenya. *Immunol Cell Biol* **84**(5), 482-5.
- Alizon, M., and Montagnier, L. (1987). Genetic variability in human immunodeficiency viruses. *Ann N Y Acad Sci* **511**, 376-84.
- Allen, T. M., Vogel, T. U., Fuller, D. H., Mothe, B. R., Steffen, S., Boyson, J. E., Shipley, T., Fuller, J., Hanke, T., Sette, A., Altman, J. D., Moss, B., McMichael, A. J., and Watkins, D. I. (2000). Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *J Immunol* **164**(9), 4968-78.
- Alter, H. J., Eichberg, J. W., Masur, H., Saxinger, W. C., Gallo, R., Macher, A. M., Lane, H. C., and Fauci, A. S. (1984). Transmission of HTLV-III infection from human plasma to chimpanzees: an animal model for AIDS. *Science* **226**(4674), 549-52.
- Ancelle, R., Bletry, O., Baglin, A. C., Brun-Vezinet, F., Rey, M. A., and Godeau, P. (1987). Long incubation period for HIV-2 infection. *Lancet* 1(8534), 688-9.
- Baig, J., Levy, D. B., McKay, P. F., Schmitz, J. E., Santra, S., Subbramanian, R. A., Kuroda, M. J., Lifton, M. A., Gorgone, D. A., Wyatt, L. S., Moss, B., Huang, Y., Chakrabarti, B. K., Xu, L., Kong, W. P., Yang, Z. Y., Mascola, J. R., Nabel, G. J., Carville, A., Lackner, A. A., Veazey, R. S., and Letvin, N. L. (2002). Elicitation of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mucosal compartments of rhesus monkeys by systemic vaccination. *J Virol* 76(22), 11484-90.
- Balzarini, J., Weeger, M., Camarasa, M. J., De Clercq, E., and Uberla, K. (1995). Sensitivity/resistance profile of a simian immunodeficiency virus containing the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) toward the HIV-1-specific non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **211**(3), 850-6.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**(4599), 868-71.
- Bebenek, K., Abbotts, J., Wilson, S. H., and Kunkel, T. A. (1993). Error-prone polymerization by HIV-1 reverse transcriptase. Contribution of template-primer misalignment, miscoding, and termination probability to mutational hot spots. *J Biol Chem* **268**(14), 10324-34.
- Bednarik, D. P., Mosca, J. D., and Raj, N. B. (1987). Methylation as a modulator of expression of human immunodeficiency virus. *J Virol* **61**(4), 1253-7.
- Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., Lederman, M. M., Benito, J. M., Goepfert, P. A., Connors, M., Roederer, M., and Koup, R. A. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* **107**(12), 4781-9.

- Binley, J. M., Klasse, P. J., Cao, Y., Jones, I., Markowitz, M., Ho, D. D., and Moore, J. P. (1997). Differential regulation of the antibody responses to Gag and Env proteins of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **71**(4), 2799-809.
- Bjorndal, A., Deng, H., Jansson, M., Fiore, J. R., Colognesi, C., Karlsson, A., Albert, J., Scarlatti, G., Littman, D. R., and Fenyo, E. M. (1997). Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* **71**(10), 7478-87.
- Bomsel, M., Heyman, M., Hocini, H., Lagaye, S., Belec, L., Dupont, C., and Desgranges, C. (1998). Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* **9**(2), 277-87.
- Bourinbaiar, A. S., and Phillips, D. M. (1991). Transmission of human immunodeficiency virus from monocytes to epithelia. *J Acquir Immune Defic Syndr* **4**(1), 56-63.
- Brostrom, C., Visco-Comandini, U., Yun, Z., and Sonnerborg, A. (1999). Longitudinal quantification of human immunodeficiency virus type 1 DNA and RNA in long-term nonprogressors. *J Infect Dis* **179**(6), 1542-8.
- Brouwers, J., Vermeire, K., Schols, D., and Augustijns, P. (2008). Development and in vitro evaluation of chloroquine gels as microbicides against HIV-1 infection. *Virology* **378**(2), 306-10.
- Buchbinder, S. P., Katz, M. H., Hessol, N. A., O'Malley, P. M., and Holmberg, S. D. (1994). Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* **8**(8), 1123-8.
- Buge, S. L., Richardson, E., Alipanah, S., Markham, P., Cheng, S., Kalyan, N., Miller, C. J., Lubeck, M., Udem, S., Eldridge, J., and Robert-Guroff, M. (1997). An adenovirus-simian immunodeficiency virus env vaccine elicits humoral, cellular, and mucosal immune responses in rhesus macaques and decreases viral burden following vaginal challenge. *J Virol* 71(11), 8531-41.
- Byakika-Tusiime, J. (2008). Circumcision and HIV infection: assessment of causality. *AIDS Behav* **12**(6), 835-41.
- Cann, A. J., and Karn, J. (1989). Molecular biology of HIV: new insights into the virus life-cycle. *AIDS* **3** Suppl **1**, S19-34.
- Catalfamo, M., Karpova, T., McNally, J., Costes, S. V., Lockett, S. J., Bos, E., Peters, P. J., and Henkart, P. A. (2004). Human CD8+ T cells store RANTES in a unique secretory compartment and release it rapidly after TcR stimulation. *Immunity* **20**(2), 219-30.
- Caufour, P., Le Grand, R., Cheret, A., Neildez, O., Theodoro, F., Boson, B., Vaslin, B., and Dormont, D. (1999). Secretion of beta-chemokines by bronchoalveolar lavage cells during primary infection of macaques inoculated with attenuated nef-deleted or pathogenic simian immunodeficiency virus strain mac251. *J Gen Virol* 80 ( Pt 3), 767-76.
- Chaisson, R. E., Gallant, J. E., Keruly, J. C., and Moore, R. D. (1998). Impact of opportunistic disease on survival in patients with HIV infection. *AIDS* **12**(1), 29-33.
- Chakrabarti, L. A. (2004). The paradox of simian immunodeficiency virus infection in sooty mangabeys: active viral replication without disease progression. *Front Biosci* **9,** 521-39.
- Cheret, A., Le Grand, R., Caufour, P., Neildez, O., Matheux, F., Theodoro, F., Vaslin, B., and Dormont, D. (1999). RANTES, IFN-gamma, CCR1, and CCR5 mRNA expression in peripheral blood, lymph node, and bronchoalveolar lavage mononuclear cells during primary simian immunodeficiency virus infection of macaques. *Virology* **255**(2), 285-93.
- Chiasson, M. A., Ellerbrock, T. V., Bush, T. J., Sun, X. W., and Wright, T. C., Jr. (1997). Increased prevalence of vulvovaginal condyloma and vulvar intraepithelial

- neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol* **89**(5 Pt 1), 690-4.
- Chui, D. W., and Owen, R. L. (1994). AIDS and the gut. *J Gastroenterol Hepatol* **9**(3), 291-303.
- Chun, T. W., Engel, D., Berrey, M. M., Shea, T., Corey, L., and Fauci, A. S. (1998). Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15), 8869-73.
- Clavel, F., Brun-Vezinet, F., Guetard, D., Chamaret, S., Laurent, A., Rouzioux, C., Rey, M., Katlama, C., Rey, F., Champelinaud, J. L., and et al. (1986). [LAV type II: a second retrovirus associated with AIDS in West Africa]. *C R Acad Sci III* **302**(13), 485-8.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., and et al. (1986 (Pdf fehlt)). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**(4761), 343-6.
- Colebunders, R., Kapita, B., Nekwei, W., Bahwe, Y., Lebughe, I., Oxtoby, M., and Ryder, R. (1988). Breastfeeding and transmission of HIV. *Lancet* **2**(8626-8627), 1487.
- Cranage, M., Sharpe, S., Herrera, C., Cope, A., Dennis, M., Berry, N., Ham, C., Heeney, J., Rezk, N., Kashuba, A., Anton, P., McGowan, I., and Shattock, R. (2008). Prevention of SIV rectal transmission and priming of T cell responses in macaques after local pre-exposure application of tenofovir gel. *PLoS Med* **5**(8), e157; discussion e157.
- Croix, D. A., Board, K., Capuano, S., 3rd, Murphey-Corb, M., Haidaris, C. G., Flynn, J. L., Reinhart, T., and Norris, K. A. (2002). Alterations in T lymphocyte profiles of bronchoalveolar lavage fluid from SIV- and Pneumocystis carinii-coinfected rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**(5), 391-401.
- Dahl, K. M., Keath, E. J., Fraser, V. J., and Powderly, W. G. (1997). Molecular epidemiology of mucosal candidiasis in HIV-positive women. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**(6), 485-91.
- Daniel, M. D., Letvin, N. L., King, N. W., Kannagi, M., Sehgal, P. K., Hunt, R. D., Kanki, P. J., Essex, M., and Desrosiers, R. C. (1985 (Pdf fehlt)). Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* **228**(4704), 1201-4.
- Davies, J. F., 2nd, Hostomska, Z., Hostomsky, Z., Jordan, S. R., and Matthews, D. A. (1991). Crystal structure of the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **252**(5002), 88-95.
- de Vincenzi, I. (1994). A longitudinal study of human immunodeficiency virus transmission by heterosexual partners. European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV. *N Engl J Med* **331**(6), 341-6.
- Debertin, A. S., Tschernig, T., Tonjes, H., Kleemann, W. J., Troger, H. D., and Pabst, R. (2003). Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children. *Clin Exp Immunol* **134**(3), 503-7.
- del Romero, J., Marincovich, B., Castilla, J., Garcia, S., Campo, J., Hernando, V., and Rodriguez, C. (2002). Evaluating the risk of HIV transmission through unprotected orogenital sex. *AIDS* **16**(9), 1296-7.
- Demberg, T., and Robert-Guroff, M. (2009). Mucosal immunity and protection against HIV/SIV infection: strategies and challenges for vaccine design. *Int Rev Immunol* **28**(1), 20-48.
- Des Jarlais, D. C., and Hopkins, W. (1985). "Free" needles for intravenous drug users at risk for AIDS: current developments in New York City. *N Engl J Med* **313**(23), 1476.

- Dianzani, F., Antonelli, G., Riva, E., Turriziani, O., Antonelli, L., Tyring, S., Carrasco, D. A., Lee, H., Nguyen, D., Pan, J., Poast, J., Cloyd, M., and Baron, S. (2002). Is human immunodeficiency virus RNA load composed of neutralized immune complexes? *J Infect Dis* **185**(8), 1051-4.
- Douek, D. C., Picker, L. J., and Koup, R. A. (2003). T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* **21,** 265-304.
- Dulioust, E., Tachet, A., De Almeida, M., Finkielsztejn, L., Rivalland, S., Salmon, D., Sicard, D., Rouzioux, C., and Jouannet, P. (1998). Detection of HIV-1 in seminal plasma and seminal cells of HIV-1 seropositive men. *J Reprod Immunol* **41**(1-2), 27-40.
- Dunn, D. T., Newell, M. L., Ades, A. E., and Peckham, C. S. (1992). Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breastfeeding. *Lancet* **340**(8819), 585-8.
- Fehniger, T. A., Herbein, G., Yu, H., Para, M. I., Bernstein, Z. P., O'Brien, W. A., and Caligiuri, M. A. (1998). Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection. *J Immunol* **161**(11), 6433-8.
- Fishback, N., and Koss, M. (1996). Update on lymphoid interstitial pneumonitis. *Curr Opin Pulm Med* **2**(5), 429-33.
- Fotopoulos, G., Harari, A., Michetti, P., Trono, D., Pantaleo, G., and Kraehenbuhl, J. P. (2002). Transepithelial transport of HIV-1 by M cells is receptor-mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14), 9410-4.
- Fowke, K. R., Kaul, R., Rosenthal, K. L., Oyugi, J., Kimani, J., Rutherford, W. J., Nagelkerke, N. J., Ball, T. B., Bwayo, J. J., Simonsen, J. N., Shearer, G. M., and Plummer, F. A. (2000). HIV-1-specific cellular immune responses among HIV-1-resistant sex workers. *Immunol Cell Biol* **78**(6), 586-95.
- Freed, E. O., Delwart, E. L., Buchschacher, G. L., Jr., and Panganiban, A. T. (1992). A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(1), 70-4.
- Fultz, P. N. (1993). Nonhuman primate models for AIDS. *Clin Infect Dis* **17 Suppl 1**, S230-5.
- Fultz, P. N., McClure, H. M., Anderson, D. C., Swenson, R. B., Anand, R., and Srinivasan, A. (1986). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (Cercocebus atys). *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(14), 5286-90.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* **397**(6718), 436-41.
- Gatignol, A., Kumar, A., Rabson, A., and Jeang, K. T. (1989). Identification of cellular proteins that bind to the human immunodeficiency virus type 1 trans-activation-responsive TAR element RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(20), 7828-32.
- Gelderblom, H., Reupke, H., Winkel, T., Kunze, R., and Pauli, G. (1987 (Pdf fehlt)). MHC-antigens: constituents of the envelopes of human and simian immunodeficiency viruses. *Z Naturforsch [C]* **42**(11-12), 1328-34.
- Gelderblom, H. R. (1991). Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **5**(6), 617-37.
- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., and Saxon, A. (1981 (Pdf fehlt)). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**(24), 1425-31.

- Gottlinger, H. G., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(15), 5781-5.
- Grant, R. M., Hamer, D., Hope, T., Johnston, R., Lange, J., Lederman, M. M., Lieberman, J., Miller, C. J., Moore, J. P., Mosier, D. E., Richman, D. D., Schooley, R. T., Springer, M. S., Veazey, R. S., and Wainberg, M. A. (2008). Whither or wither microbicides? *Science* **321**(5888), 532-4.
- Gray, R. H., Wawer, M. J., Brookmeyer, R., Sewankambo, N. K., Serwadda, D., Wabwire-Mangen, F., Lutalo, T., Li, X., vanCott, T., and Quinn, T. C. (2001). Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet* **357**(9263), 1149-53.
- Gray, R. H., Wawer, M. J., Polis, C. B., Kigozi, G., and Serwadda, D. (2008). Male Circumcision and Prevention of HIV and Sexually Transmitted Infections. *Curr Infect Dis Rep* **10**(2), 121-7.
- Graziosi, C., Gantt, K. R., Vaccarezza, M., Demarest, J. F., Daucher, M., Saag, M. S., Shaw, G. M., Quinn, T. C., Cohen, O. J., Welbon, C. C., Pantaleo, G., and Fauci, A. S. (1996). Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9), 4386-91.
- Greene, W. C. (1991). The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **324**(5), 308-17.
- Guadalupe, M., Sankaran, S., George, M. D., Reay, E., Verhoeven, D., Shacklett, B. L., Flamm, J., Wegelin, J., Prindiville, T., and Dandekar, S. (2006). Viral suppression and immune restoration in the gastrointestinal mucosa of human immunodeficiency virus type 1-infected patients initiating therapy during primary or chronic infection. *J Virol* **80**(16), 8236-47.
- Guy-Grand, D., and Vassalli, P. (1993). Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **5**(2), 247-52.
- Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M., and Sharp, P. M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**(5453), 607-14.
- Hanson, L. R., and Frey, W. H., 2nd (2007). Strategies for intranasal delivery of therapeutics for the prevention and treatment of neuroAIDS. *J Neuroimmune Pharmacol* **2**(1), 81-6.
- Harari, A., Vallelian, F., Meylan, P. R., and Pantaleo, G. (2005). Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* **174**(2), 1037-45.
- Henrard, D. R., Daar, E., Farzadegan, H., Clark, S. J., Phillips, J., Shaw, G. M., and Busch, M. P. (1995). Virologic and immunologic characterization of symptomatic and asymptomatic primary HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **9**(3), 305-10.
- Hess, C., Altfeld, M., Thomas, S. Y., Addo, M. M., Rosenberg, E. S., Allen, T. M., Draenert, R., Eldrige, R. L., van Lunzen, J., Stellbrink, H. J., Walker, B. D., and Luster, A. D. (2004). HIV-1 specific CD8+ T cells with an effector phenotype and control of viral replication. *Lancet* **363**(9412), 863-6.
- Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H., and Johnson, P. R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**(6223), 389-92.
- Ho, D. D. (1995). HIV-1 dynamics in vivo. J Biol Regul Homeost Agents 9(3), 76-7.
- Hocini, H., Becquart, P., Bouhlal, H., Chomont, N., Ancuta, P., Kazatchkine, M. D., and Belec, L. (2001). Active and selective transcytosis of cell-free human immunodeficiency virus through a tight polarized monolayer of human endometrial cells. *J Virol* **75**(11), 5370-4.

- Hrdy, D. B. (1987). Cultural practices contributing to the transmission of human immunodeficiency virus in Africa. *Rev Infect Dis* **9**(6), 1109-19.
- Hu, J., Gardner, M. B., and Miller, C. J. (2000). Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol* **74**(13), 6087-95.
- Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., and Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**(6273), 356-9.
- Huo, Z., Sinha, R., McNeela, E. A., Borrow, R., Giemza, R., Cosgrove, C., Heath, P. T., Mills, K. H., Rappuoli, R., Griffin, G. E., and Lewis, D. J. (2005). Induction of protective serum meningococcal bactericidal and diphtheria-neutralizing antibodies and mucosal immunoglobulin A in volunteers by nasal insufflations of the Neisseria meningitidis serogroup C polysaccharide-CRM197 conjugate vaccine mixed with chitosan. *Infect Immun* 73(12), 8256-65.
- Hussain, L. A., and Lehner, T. (1995). Comparative investigation of Langerhans' cells and potential receptors for HIV in oral, genitourinary and rectal epithelia. *Immunology* **85**(3), 475-84.
- Imaoka, K., Miller, C. J., Kubota, M., McChesney, M. B., Lohman, B., Yamamoto, M., Fujihashi, K., Someya, K., Honda, M., McGhee, J. R., and Kiyono, H. (1998). Nasal immunization of nonhuman primates with simian immunodeficiency virus p55gag and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissues. *J Immunol* **161**(11), 5952-8.
- Iyasere, C., Tilton, J. C., Johnson, A. J., Younes, S., Yassine-Diab, B., Sekaly, R. P., Kwok, W. W., Migueles, S. A., Laborico, A. C., Shupert, W. L., Hallahan, C. W., Davey, R. T., Jr., Dybul, M., Vogel, S., Metcalf, J., and Connors, M. (2003). Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. *J Virol* 77(20), 10900-9.
- Jacquez, J. A., Koopman, J. S., Simon, C. P., and Longini, I. M., Jr. (1994). Role of the primary infection in epidemics of HIV infection in gay cohorts. *J Acquir Immune Defic Syndr* 7(11), 1169-84.
- Jiao, Y., Xie, J., Li, T., Han, Y., Qiu, Z., Zuo, L., and Wang, A. (2006). Correlation between gag-specific CD8 T-cell responses, viral load, and CD4 count in HIV-1 infection is dependent on disease status. *J Acquir Immune Defic Syndr* **42**(3), 263-8.
- Jin, X., Bauer, D. E., Tuttleton, S. E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C. E., Safrit, J. T., Mittler, J., Weinberger, L., Kostrikis, L. G., Zhang, L., Perelson, A. S., and Ho, D. D. (1999). Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* **189**(6), 991-8.
- Johnson, B. K., Stone, G. A., Godec, M. S., Asher, D. M., Gajdusek, D. C., and Gibbs, C. J., Jr. (1993). Long-term observations of human immunodeficiency virus-infected chimpanzees. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**(4), 375-8.
- Kanki, P. J., Barin, F., M'Boup, S., Allan, J. S., Romet-Lemonne, J. L., Marlink, R., McLane, M. F., Lee, T. H., Arbeille, B., Denis, F., and et al. (1986 (Pdf fehlt)). New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-IIIAGM). *Science* **232**(4747), 238-43.
- Karn, J. (1991). Control of human immunodeficiency virus replication by the tat, rev, nef and protease genes. *Curr Opin Immunol* **3**(4), 526-36.
- Kaul, R., Plummer, F. A., Kimani, J., Dong, T., Kiama, P., Rostron, T., Njagi, E., MacDonald, K. S., Bwayo, J. J., McMichael, A. J., and Rowland-Jones, S. L.

- (2000). HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol* **164**(3), 1602-11.
- Kaup, F. J., Boga, J. A., Bruno, S. F., Didier, A., Hermann, K., Hofmann, P., Matz-Rensing, K., and Stahl-Hennig, C. (2001). Immunohistochemical detection of simian immunodeficiency virus (SIV) in rectal mucosa of experimentally infected rhesus macaques (Macaca mulatta). *Acta Histochem* **103**(1), 79-88.
- Kaup, F. J., Kuhn, E. M., Makoschey, B., and Hunsmann, G. (1994). Cryptosporidiosis of liver and pancreas in rhesus monkeys with experimental SIV infection. *J Med Primatol* **23**(5), 304-8.
- Kaur, A., Rosenzweig, M., and Johnson, R. P. (2000). Immunological memory and acquired immunodeficiency syndrome pathogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**(1395), 381-90.
- Kestler, H., Kodama, T., Ringler, D., Marthas, M., Pedersen, N., Lackner, A., Regier, D., Sehgal, P., Daniel, M., King, N., and et al. (1990). Induction of AIDS in rhesus monkeys by molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *Science* **248**(4959), 1109-12.
- Keusch, G. T., and Thea, D. M. (1993). Malnutrition in AIDS. *Med Clin North Am* 77(4), 795-814.
- Kilby, J. M. (2001). Human immunodeficiency virus pathogenesis: insights from studies of lymphoid cells and tissues. *Clin Infect Dis* **33**(6), 873-84.
- Kim, S. Y., Byrn, R., Groopman, J., and Baltimore, D. (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol* **63**(9), 3708-13.
- Kloosterboer, N., Groeneveld, P. H., Jansen, C. A., van der Vorst, T. J., Koning, F., Winkel, C. N., Duits, A. J., Miedema, F., van Baarle, D., van Rij, R. P., Brinkman, K., and Schuitemaker, H. (2005). Natural controlled HIV infection: preserved HIV-specific immunity despite undetectable replication competent virus. *Virology* 339(1), 70-80.
- Ko, H. S., Fu, S. M., Winchester, R. J., Yu, D. T., and Kunkel, H. G. (1979). Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. Occurrence on mitogen- and antigen-activated T cells. *J Exp Med* **150**(2), 246-55.
- Koot, M., Keet, I. P., Vos, A. H., de Goede, R. E., Roos, M. T., Coutinho, R. A., Miedema, F., Schellekens, P. T., and Tersmette, M. (1993). Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* **118**(9), 681-8.
- Kuate, S., Stahl-Hennig, C., Stoiber, H., Nchinda, G., Floto, A., Franz, M., Sauermann, U., Bredl, S., Deml, L., Ignatius, R., Norley, S., Racz, P., Tenner-Racz, K., Steinman, R. M., Wagner, R., and Uberla, K. (2006). Immunogenicity and efficacy of immunodeficiency virus-like particles pseudotyped with the G protein of vesicular stomatitis virus. *Virology* **351**(1), 133-44.
- Kulaga, H., Folks, T., Rutledge, R., Truckenmiller, M. E., Gugel, E., and Kindt, T. J. (1989). Infection of rabbits with human immunodeficiency virus 1. A small animal model for acquired immunodeficiency syndrome. *J Exp Med* **169**(1), 321-6.
- Kumar, A., Weiss, W., Tine, J. A., Hoffman, S. L., and Rogers, W. O. (2001). ELISPOT assay for detection of peptide specific interferon-gamma secreting cells in rhesus macaques. *J Immunol Methods* **247**(1-2), 49-60.
- Laspia, M. F., Rice, A. P., and Mathews, M. B. (1989). HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* **59**(2), 283-92.
- Le Grand, R., Vogt, G., Vaslin, B., Roques, P., Theodoro, F., Aubertin, A. M., and Dormont, D. (1992). Specific and non-specific immunity and protection of macaques against SIV infection. *Vaccine* **10**(12), 873-9.

- Leavitt, A. D., Rose, R. B., and Varmus, H. E. (1992). Both substrate and target oligonucleotide sequences affect in vitro integration mediated by human immunodeficiency virus type 1 integrase protein produced in Saccharomyces cerevisiae. *J Virol* **66**(4), 2359-68.
- Leng, Q., Borkow, G., Weisman, Z., Stein, M., Kalinkovich, A., and Bentwich, Z. (2001). Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **27**(4), 389-97.
- Letvin, N. L., Daniel, M. D., Sehgal, P. K., Desrosiers, R. C., Hunt, R. D., Waldron, L. M., MacKey, J. J., Schmidt, D. K., Chalifoux, L. V., and King, N. W. (1985 (Pdf fehlt)). Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science* **230**(4721), 71-3.
- Letvin, N. L., and King, N. W. (1990). Immunologic and pathologic manifestations of the infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**(11), 1023-40.
- Letvin, N. L., Schmitz, J. E., Jordan, H. L., Seth, A., Hirsch, V. M., Reimann, K. A., and Kuroda, M. J. (1999). Cytotoxic T lymphocytes specific for the simian immunodeficiency virus. *Immunol Rev* **170**, 127-34.
- Levy, J. A., Shimabukuro, J., McHugh, T., Casavant, C., Stites, D., and Oshiro, L. (1985). AIDS-associated retroviruses (ARV) can productively infect other cells besides human T helper cells. *Virology* **147**(2), 441-8.
- Li, Q., Duan, L., Estes, J. D., Ma, Z. M., Rourke, T., Wang, Y., Reilly, C., Carlis, J., Miller, C. J., and Haase, A. T. (2005). Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* **434**(7037), 1148-52
- Lifson, J. D., Rossio, J. L., Piatak, M., Jr., Bess, J., Jr., Chertova, E., Schneider, D. K., Coalter, V. J., Poore, B., Kiser, R. F., Imming, R. J., Scarzello, A. J., Henderson, L. E., Alvord, W. G., Hirsch, V. M., Benveniste, R. E., and Arthur, L. O. (2004). Evaluation of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of whole inactivated simian immunodeficiency virus (SIV) vaccines with conformationally and functionally intact envelope glycoproteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**(7), 772-87.
- Ling, B., Veazey, R. S., Luckay, A., Penedo, C., Xu, K., Lifson, J. D., and Marx, P. A. (2002). SIV(mac) pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans. *AIDS* **16**(11), 1489-96.
- Lu, W., Arraes, L. C., Ferreira, W. T., and Andrieu, J. M. (2004). Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* **10**(12), 1359-65.
- Lu, W., Wu, X., Lu, Y., Guo, W., and Andrieu, J. M. (2003). Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS. *Nat Med* **9**(1), 27-32.
- Lusso, P., Markham, P. D., Ranki, A., Earl, P., Moss, B., Dorner, F., Gallo, R. C., and Krohn, K. J. (1988). Cell-mediated immune response toward viral envelope and core antigens in gibbon apes (Hylobates lar) chronically infected with human immunodeficiency virus-1. *J Immunol* **141**(7), 2467-73.
- Ma, Z., Lu, F. X., Torten, M., and Miller, C. J. (2001). The number and distribution of immune cells in the cervicovaginal mucosa remain constant throughout the menstrual cycle of rhesus macaques. *Clin Immunol* **100**(2), 240-9.
- Makedonas, G., and Betts, M. R. (2006). Polyfunctional analysis of human t cell responses: importance in vaccine immunogenicity and natural infection. *Springer Semin Immunopathol* **28**(3), 209-19.
- Malamud, D., Nagashunmugam, T., Davis, C., Kennedy, S., Abrams, W. R., Kream, R., and Friedman, H. M. (1997). Inhibition of HIV infectivity by human saliva. *Oral Dis* **3** Suppl **1**, S58-63.

- Margolis, L. B., Glushakova, S., Grivel, J. C., and Murphy, P. M. (1998). Blockade of CC chemokine receptor 5 (CCR5)-tropic human immunodeficiency virus-1 replication in human lymphoid tissue by CC chemokines. *J Clin Invest* **101**(9), 1876-80.
- Marx, P. A., Spira, A. I., Gettie, A., Dailey, P. J., Veazey, R. S., Lackner, A. A., Mahoney, C. J., Miller, C. J., Claypool, L. E., Ho, D. D., and Alexander, N. J. (1996). Progesterone implants enhance SIV vaginal transmission and early virus load. *Nat Med* **2**(10), 1084-9.
- Mattapallil, J. J., Douek, D. C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., and Roederer, M. (2005). Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* **434**(7037), 1093-7.
- McKenzie, R., Travis, W. D., Dolan, S. A., Pittaluga, S., Feuerstein, I. M., Shelhamer, J., Yarchoan, R., and Masur, H. (1991). The causes of death in patients with human immunodeficiency virus infection: a clinical and pathologic study with emphasis on the role of pulmonary diseases. *Medicine (Baltimore)* **70**(5), 326-43.
- McNeela, E. A., Jabbal-Gill, I., Illum, L., Pizza, M., Rappuoli, R., Podda, A., Lewis, D. J., and Mills, K. H. (2004). Intranasal immunization with genetically detoxified diphtheria toxin induces T cell responses in humans: enhancement of Th2 responses and toxin-neutralizing antibodies by formulation with chitosan. *Vaccine* 22(8), 909-14.
- Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., Boden, D., Racz, P., and Markowitz, M. (2004). Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **200**(6), 761-70.
- Meng, G., Sellers, M. T., Mosteller-Barnum, M., Rogers, T. S., Shaw, G. M., and Smith, P. D. (2000). Lamina propria lymphocytes, not macrophages, express CCR5 and CXCR4 and are the likely target cell for human immunodeficiency virus type 1 in the intestinal mucosa. *J Infect Dis* **182**(3), 785-91.
- Michie, C. A., McLean, A., Alcock, C., and Beverley, P. C. (1992). Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* **360**(6401), 264-5.
- Milush, J. M., Stefano-Cole, K., Schmidt, K., Durudas, A., Pandrea, I., and Sodora, D. L. (2007). Mucosal innate immune response associated with a timely humoral immune response and slower disease progression after oral transmission of simian immunodeficiency virus to rhesus macaques. *J Virol* 81(12), 6175-86.
- Mingjia, L., and Short, R. (2002). How oestrogen or progesterone might change a woman's susceptibility to HIV-1 infection. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* **42**(5), 472-5.
- Mofenson, L. M., Harris, D. R., Rich, K., Meyer, W. A., 3rd, Read, J. S., Moye, J., Jr., Nugent, R. P., Korelitz, J., Bethel, J., and Pahwa, S. (1999). Serum HIV-1 p24 antibody, HIV-1 RNA copy number and CD4 lymphocyte percentage are independently associated with risk of mortality in HIV-1-infected children. National Institute of Child Health and Human Development Intravenous Immunoglobulin Clinical Trial Study Group. *AIDS* **13**(1), 31-9.
- Moniuszko, M., Bogdan, D., Pal, R., Venzon, D., Stevceva, L., Nacsa, J., Tryniszewska, E., Edghill-Smith, Y., Wolinsky, S. M., and Franchini, G. (2005). Correlation between viral RNA levels but not immune responses in plasma and tissues of macaques with long-standing SIVmac251 infection. *Virology* **333**(1), 159-68.
- Montagnier, L., Chermann, J. C., Barre-Sinoussi, F., Klatzmann, D., Wain-Hobson, S., Alizon, M., Clavel, F., Brun-Vezinet, F., Vilmer, E., Rouzioux, C., and et al. (1984). Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. *Princess Takamatsu Symp* **15**, 319-31.
- Moore, J. P., Cao, Y., Qing, L., Sattentau, Q. J., Pyati, J., Koduri, R., Robinson, J., Barbas, C. F., 3rd, Burton, D. R., and Ho, D. D. (1995). Primary isolates of human

- immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120. *J Virol* **69**(1), 101-9.
- Moscicki, A. B. (2008). Vaginal microbicides: where are we and where are we going? *J Infect Chemother* **14**(5), 337-41.
- Moss, A. R., Vranizan, K., Gorter, R., Bacchetti, P., Watters, J., and Osmond, D. (1994). HIV seroconversion in intravenous drug users in San Francisco, 1985-1990. *AIDS* **8**(2), 223-31.
- Mowat, A. M., and Viney, J. L. (1997). The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* **156**, 145-66.
- Muhl, T., Krawczak, M., Ten Haaft, P., Hunsmann, G., and 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**(6), 3438-46.
- Muller, M. C., and Barre-Sinoussi, F. (2003). SIVagm: genetic and biological features associated with replication. *Front Biosci* **8**, d1170-85.
- Munch, J., Rucker, E., Standker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., Wildum, S., Chinnadurai, R., Rajan, D., Specht, A., Gimenez-Gallego, G., Sanchez, P. C., Fowler, D. M., Koulov, A., Kelly, J. W., Mothes, W., Grivel, J. C., Margolis, L., Keppler, O. T., Forssmann, W. G., and Kirchhoff, F. (2007). Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* **131**(6), 1059-71.
- Murphy, S., Munday, P. E., and Jeffries, D. J. (1990). Rape and subsequent seroconversion to HIV. *BMJ* **300**(6717), 118.
- Nara, P. L., Robey, W. G., Arthur, L. O., Asher, D. M., Wolff, A. V., Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., and Fischinger, P. J. (1987). Persistent infection of chimpanzees with human immunodeficiency virus: serological responses and properties of reisolated viruses. *J Virol* **61**(10), 3173-80.
- Negri, D. R., Baroncelli, S., Catone, S., Comini, A., Michelini, Z., Maggiorella, M. T., Sernicola, L., Crostarosa, F., Belli, R., Mancini, M. G., Farcomeni, S., Fagrouch, Z., Ciccozzi, M., Boros, S., Liljestrom, P., Norley, S., Heeney, J., and Titti, F. (2004). Protective efficacy of a multicomponent vector vaccine in cynomolgus monkeys after intrarectal simian immunodeficiency virus challenge. *J Gen Virol* **85**(Pt 5), 1191-201.
- Nishimura, Y., Igarashi, T., Buckler-White, A., Buckler, C., Imamichi, H., Goeken, R. M., Lee, W. R., Lafont, B. A., Byrum, R., Lane, H. C., Hirsch, V. M., and Martin, M. A. (2007). Loss of naive cells accompanies memory CD4+ T-cell depletion during long-term progression to AIDS in Simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol* 81(2), 893-902.
- Norley, S. G., Lower, J., and Kurth, R. (1993). Insufficient inactivation of HIV-1 in human cryo poor plasma by beta-propiolactone: results from a highly accurate virus detection method. *Biologicals* **21**(3), 251-8.
- North, T. W., Van Rompay, K. K., Higgins, J., Matthews, T. B., Wadford, D. A., Pedersen, N. C., and Schinazi, R. F. (2005). Suppression of virus load by highly active antiretroviral therapy in rhesus macaques infected with a recombinant simian immunodeficiency virus containing reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **79**(12), 7349-54.
- Owen, D. H., Peters, J. J., and Katz, D. F. (2001). Comparison of the rheological properties of Advantage-S and Replens. *Contraception* **64**(6), 393-6.
- Padian, N. S., Shiboski, S. C., and Jewell, N. P. (1991). Female-to-male transmission of human immunodeficiency virus. *JAMA* **266**(12), 1664-7.
- Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J., and Holmberg, S. D. (1998). Declining morbidity and mortality

- among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* **338**(13), 853-60.
- Pani, A., Musiu, C., Loi, A. G., Mai, A., Loddo, R., La Colla, P., and Marongiu, M. E. (2001). DABOs as candidates to prevent mucosal HIV transmission. *Antivir Chem Chemother* **12 Suppl 1**, 51-9.
- Pantaleo, G., and Fauci, A. S. (1996). Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* **50**, 825-54.
- Pantaleo, G., Graziosi, C., and Fauci, A. S. (1993). The role of lymphoid organs in the immunopathogenesis of HIV infection. *AIDS* **7 Suppl 1**, S19-23.
- Pearce-Pratt, R., and Phillips, D. M. (1993). Studies of adhesion of lymphocytic cells: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus. *Biol Reprod* **48**(3), 431-45.
- Peeters, M., Gershy-Damet, G. M., Fransen, K., Koffi, K., Coulibaly, M., Delaporte, E., Piot, P., and van der Groen, G. (1992). Virological and polymerase chain reaction studies of HIV-1/HIV-2 dual infection in Cote d'Ivoire. *Lancet* **340**(8815), 339-40.
- Peeters, M., Honore, C., Huet, T., Bedjabaga, L., Ossari, S., Bussi, P., Cooper, R. W., and Delaporte, E. (1989 (Pdf fehlt)). Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *Aids* 3(10), 625-30.
- Pfeffer, K. (2003 (Pdf fehlt)). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**(3-4), 185-91.
- Phillips, D. M., and Bourinbaiar, A. S. (1992). Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology* **186**(1), 261-73.
- Piatak, M., Jr., Saag, M. S., Yang, L. C., Clark, S. J., Kappes, J. C., Luk, K. C., Hahn, B. H., Shaw, G. M., and Lifson, J. D. (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**(5102), 1749-54.
- Pitcher, C. J., Hagen, S. I., Walker, J. M., Lum, R., Mitchell, B. L., Maino, V. C., Axthelm, M. K., and Picker, L. J. (2002). Development and homeostasis of T cell memory in rhesus macaque. *J Immunol* **168**(1), 29-43.
- Pitcher, C. J., Quittner, C., Peterson, D. M., Connors, M., Koup, R. A., Maino, V. C., and Picker, L. J. (1999). HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med* **5**(5), 518-25.
- Pomerantz, R. J., de la Monte, S. M., Donegan, S. P., Rota, T. R., Vogt, M. W., Craven, D. E., and Hirsch, M. S. (1988). Human immunodeficiency virus (HIV) infection of the uterine cervix. *Ann Intern Med* **108**(3), 321-7.
- Poonia, B., Walter, L., Dufour, J., Harrison, R., Marx, P. A., and Veazey, R. S. (2006). Cyclic changes in the vaginal epithelium of normal rhesus macaques. *J Endocrinol* **190**(3), 829-35.
- Quinn, T. C., Wawer, M. J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., Meehan, M. O., Lutalo, T., and Gray, R. H. (2000). Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* **342**(13), 921-9.
- Regier, D. A., and Desrosiers, R. C. (1990). The complete nucleotide sequence of a pathogenic molecular clone of simian immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**(11), 1221-31.
- Reimann, K. A., Tenner-Racz, K., Racz, P., Montefiori, D. C., Yasutomi, Y., Lin, W., Ransil, B. J., and Letvin, N. L. (1994). Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Virol* **68**(4), 2362-70.

- Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J., and Petropoulos, C. J. (2003). Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7), 4144-9.
- Riecken, E. O., Zeitz, M., and Ullrich, R. (1990). Non-opportunistic causes of diarrhoea in HIV infection. *Baillieres Clin Gastroenterol* **4**(2), 385-403.
- Rodriguez-Jimenez, F. J., Krause, A., Schulz, S., Forssmann, W. G., Conejo-Garcia, J. R., Schreeb, R., and Motzkus, D. (2003). Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics* **81**(2), 175-83.
- Rodriguez-Monroy, M. A., Rojas-Hernandez, S., and Moreno-Fierros, L. (2007). Phenotypic and functional differences between lymphocytes from NALT and nasal passages of mice. *Scand J Immunol* **65**(3), 276-88.
- Royce, R. A., Sena, A., Cates, W., Jr., and Cohen, M. S. (1997). Sexual transmission of HIV. *N Engl J Med* **336**(15), 1072-8.
- Rusert, P., Fischer, M., Joos, B., Leemann, C., Kuster, H., Flepp, M., Bonhoeffer, S., Gunthard, H. F., and Trkola, A. (2004). Quantification of infectious HIV-1 plasma viral load using a boosted in vitro infection protocol. *Virology* **326**(1), 113-29.
- Sachsenberg, N., Perelson, A. S., Yerly, S., Schockmel, G. A., Leduc, D., Hirschel, B., and Perrin, L. (1998). Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *J Exp Med* **187**(8), 1295-303.
- Sakaguchi, K., Zambrano, N., Baldwin, E. T., Shapiro, B. A., Erickson, J. W., Omichinski, J. G., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., and Appella, E. (1993). Identification of a binding site for the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(11), 5219-23.
- Saksena, N. K., Wu, J. Q., Potter, S. J., Wilkinson, J., and Wang, B. (2008). Human immunodeficiency virus interactions with CD8+ T lymphocytes. *Curr HIV Res* **6**(1), 1-9.
- Santiago, M. L., Rodenburg, C. M., Kamenya, S., Bibollet-Ruche, F., Gao, F., Bailes, E., Meleth, S., Soong, S. J., Kilby, J. M., Moldoveanu, Z., Fahey, B., Muller, M. N., Ayouba, A., Nerrienet, E., McClure, H. M., Heeney, J. L., Pusey, A. E., Collins, D. A., Boesch, C., Wrangham, R. W., Goodall, J., Sharp, P. M., Shaw, G. M., and Hahn, B. H. (2002). SIVcpz in wild chimpanzees. *Science* **295**(5554), 465.
- Schmitz, J. E., Kuroda, M. J., Santra, S., Sasseville, V. G., Simon, M. A., Lifton, M. A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B. J., Ghrayeb, J., Forman, M. A., Montefiori, D. C., Rieber, E. P., Letvin, N. L., and Reimann, K. A. (1999). Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+lymphocytes. *Science* **283**(5403), 857-60.
- Schneider, T., Jahn, H. U., Schmidt, W., Riecken, E. O., Zeitz, M., and Ullrich, R. (1995). Loss of CD4 T lymphocytes in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 is more pronounced in the duodenal mucosa than in the peripheral blood. Berlin Diarrhea/Wasting Syndrome Study Group. *Gut* 37(4), 524-9.
- Schreiber, G. B., Busch, M. P., Kleinman, S. H., and Korelitz, J. J. (1996). The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* **334**(26), 1685-90.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., and Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**(2), 163-89.
- Semenzato, G., Agostini, C., Ometto, L., Zambello, R., Trentin, L., Chieco-Bianchi, L., and De Rossi, A. (1995). CD8+ T lymphocytes in the lung of acquired immunodeficiency syndrome patients harbor human immunodeficiency virus type 1. *Blood* **85**(9), 2308-14.

- Shacklett, B. L., Beadle, T. J., Pacheco, P. A., Grendell, J. H., Haslett, P. A., King, A. S., Ogg, G. S., Basuk, P. M., and Nixon, D. F. (2000). Characterization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes expressing the mucosal lymphocyte integrin CD103 in rectal and duodenal lymphoid tissue of HIV-1-infected subjects. *Virology* **270**(2), 317-27.
- Shacklett, B. L., Yang, O., Hausner, M. A., Elliott, J., Hultin, L., Price, C., Fuerst, M., Matud, J., Hultin, P., Cox, C., Ibarrondo, J., Wong, J. T., Nixon, D. F., Anton, P. A., and Jamieson, B. D. (2003). Optimization of methods to assess human mucosal T-cell responses to HIV infection. *J Immunol Methods* **279**(1-2), 17-31.
- Sharp, P. M., Bailes, E., Robertson, D. L., Gao, F., and Hahn, B. H. (1999). Origins and evolution of AIDS viruses. *Biol Bull* **196**(3), 338-42.
- Silvestri, G., and Feinberg, M. B. (2003). Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection. *J Clin Invest* **112**(6), 821-4.
- Smith, P. D., Meng, G., Sellers, M. T., Rogers, T. S., and Shaw, G. M. (2000). Biological parameters of HIV-1 infection in primary intestinal lymphocytes and macrophages. *J Leukoc Biol* **68**(3), 360-5.
- Sodora, D. L., Gettie, A., Miller, C. J., and Marx, P. A. (1998). Vaginal transmission of SIV: assessing infectivity and hormonal influences in macaques inoculated with cell-free and cell-associated viral stocks. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14 Suppl 1**, S119-23.
- Sopper, S., Stahl-Hennig, C., Demuth, M., Johnston, I. C., Dorries, R., and ter Meulen, V. (1997). Lymphocyte subsets and expression of differentiation markers in blood and lymphoid organs of rhesus monkeys. *Cytometry* **29**(4), 351-62.
- Soto-Ramirez, L. E., Renjifo, B., McLane, M. F., Marlink, R., O'Hara, C., Sutthent, R., Wasi, C., Vithayasai, P., Vithayasai, V., Apichartpiyakul, C., Auewarakul, P., Pena Cruz, V., Chui, D. S., Osathanondh, R., Mayer, K., Lee, T. H., and Essex, M. (1996). HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* **271**(5253), 1291-3.
- Stahl-Hennig, C., Steinman, R. M., Tenner-Racz, K., Pope, M., Stolte, N., Matz-Rensing, K., Grobschupff, G., Raschdorff, B., Hunsmann, G., and Racz, P. (1999). Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus. *Science* **285**(5431), 1261-5.
- Stein, B. S., and Engleman, E. G. (1990). Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. *J Biol Chem* **265**(5), 2640-9.
- Stein, M., O'Sullivan, P., Wachtel, T., Fisher, A., Mikolich, D., Sepe, S., Fort, G., Carpenter, C., Skowron, G., and Mayer, K. (1992). Causes of death in persons with human immunodeficiency virus infection. *Am J Med* **93**(4), 387-90.
- Stevceva, L., Kelsall, B., Nacsa, J., Moniuszko, M., Hel, Z., Tryniszewska, E., and Franchini, G. (2002). Cervicovaginal lamina propria lymphocytes: phenotypic characterization and their importance in cytotoxic T-lymphocyte responses to simian immunodeficiency virus SIVmac251. *J Virol* **76**(1), 9-18.
- Stevceva, L., Moniuszko, M., Alvarez, X., Lackner, A. A., and Franchini, G. (2004). Functional simian immunodeficiency virus Gag-specific CD8+ intraepithelial lymphocytes in the mucosae of SIVmac251- or simian-human immunodeficiency virus KU2-infected macaques. *Virology* **319**(2), 190-200.
- Suh, Y. S., Park, K. S., Sauermann, U., Franz, M., Norley, S., Wilfingseder, D., Stoiber, H., Fagrouch, Z., Heeney, J., Hunsmann, G., Stahl-Hennig, C., and Sung, Y. C. (2006). Reduction of viral loads by multigenic DNA priming and adenovirus boosting in the SIVmac-macaque model. *Vaccine* **24**(11), 1811-20.

- Sun, J. C., Williams, M. A., and Bevan, M. J. (2004). CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* **5**(9), 927-33.
- Tanaka, K., and Kasahara, M. (1998). The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev* **163**, 161-76.
- Tindall, B., Barker, S., Donovan, B., Barnes, T., Roberts, J., Kronenberg, C., Gold, J., Penny, R., and Cooper, D. (1988). Characterization of the acute clinical illness associated with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* **148**(4), 945-9.
- Trichel, A. M., Rajakumar, P. A., and Murphey-Corb, M. (2002). Species-specific variation in SIV disease progression between Chinese and Indian subspecies of rhesus macaque. *J Med Primatol* **31**(4-5), 171-8.
- Tsujimoto, H., Cooper, R. W., Kodama, T., Fukasawa, M., Miura, T., Ohta, Y., Ishikawa, K., Nakai, M., Frost, E., Roelants, G. E., and et al. (1988). Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* **62**(11), 4044-50.
- Turner, C. F. (1989). Research on sexual behaviors that transmit HIV: progress and problems. *AIDS* **3 Suppl 1**, S63-9.
- Tyler, D. S., Stanley, S. D., Nastala, C. A., Austin, A. A., Bartlett, J. A., Stine, K. C., Lyerly, H. K., Bolognesi, D. P., and Weinhold, K. J. (1990). Alterations in antibody-dependent cellular cytotoxicity during the course of HIV-1 infection. Humoral and cellular defects. *J Immunol* **144**(9), 3375-84.
- Uberla, K., Stahl-Hennig, C., Bottiger, D., Matz-Rensing, K., Kaup, F. J., Li, J., Haseltine, W. A., Fleckenstein, B., Hunsmann, G., Oberg, B., and et al. (1995). Animal model for the therapy of acquired immunodeficiency syndrome with reverse transcriptase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(18), 8210-4.
- Ullrich, R., Heise, W., Bergs, C., L'Age, M., Riecken, E. O., and Zeitz, M. (1992). Gastrointestinal symptoms in patients infected with human immunodeficiency virus: relevance of infective agents isolated from gastrointestinal tract. *Gut* 33(8), 1080-4.
- Van de Perre, P., Simonon, A., Msellati, P., Hitimana, D. G., Vaira, D., Bazubagira, A., Van Goethem, C., Stevens, A. M., Karita, E., Sondag-Thull, D., and et al. (1991). Postnatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. A prospective cohort study in Kigali, Rwanda. *N Engl J Med* **325**(9), 593-8.
- van der Straten, A., Kang, M. S., Posner, S. F., Kamba, M., Chipato, T., and Padian, N. S. (2005). Predictors of diaphragm use as a potential sexually transmitted disease/HIV prevention method in Zimbabwe. *Sex Transm Dis* **32**(1), 64-71.
- Van Rompay, K. K., Johnson, J. A., Blackwood, E. J., Singh, R. P., Lipscomb, J., Matthews, T. B., Marthas, M. L., Pedersen, N. C., Bischofberger, N., Heneine, W., and North, T. W. (2007). Sequential emergence and clinical implications of viral mutants with K70E and K65R mutation in reverse transcriptase during prolonged tenofovir monotherapy in rhesus macaques with chronic RT-SHIV infection. *Retrovirology* **4,** 25.
- VandeWoude, S., and Apetrei, C. (2006). Going wild: lessons from naturally occurring T-lymphotropic lentiviruses. *Clin Microbiol Rev* **19**(4), 728-62.
- Vardi, Y., Sadeghi-Nejad, H., Pollack, S., Aisuodionoe-Shadrach, O. I., and Sharlip, I. D. (2007). Male circumcision and HIV prevention. *J Sex Med* **4**(4 Pt 1), 838-43.
- Veazey, R. S., DeMaria, M., Chalifoux, L. V., Shvetz, D. E., Pauley, D. R., Knight, H. L., Rosenzweig, M., Johnson, R. P., Desrosiers, R. C., and Lackner, A. A. (1998).

- Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* **280**(5362), 427-31.
- Veazey, R. S., Ketas, T. A., Klasse, P. J., Davison, D. K., Singletary, M., Green, L. C., Greenberg, M. L., and Moore, J. P. (2008). Tropism-independent protection of macaques against vaginal transmission of three SHIVs by the HIV-1 fusion inhibitor T-1249. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(30), 10531-6.
- Veazey, R. S., Marx, P. A., and Lackner, A. A. (2001). The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS. *Trends Immunol* **22**(11), 626-33.
- Veazey, R. S., Marx, P. A., and Lackner, A. A. (2003). Vaginal CD4+ T cells express high levels of CCR5 and are rapidly depleted in simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **187**(5), 769-76.
- Voeller, B. (1991). AIDS and heterosexual anal intercourse. Arch Sex Behav 20(3), 233-76.
- Wagner, L., Yang, O. O., Garcia-Zepeda, E. A., Ge, Y., Kalams, S. A., Walker, B. D., Pasternack, M. S., and Luster, A. D. (1998). Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* **391**(6670), 908-11.
- Wallace, J. M. (1998). HIV and the lung. Curr Opin Pulm Med 4(3), 135-41.
- Wang, W. K., Chen, M. Y., Chuang, C. Y., Jeang, K. T., and Huang, L. M. (2000). Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J Microbiol Immunol Infect* **33**(3), 131-40.
- Watson, A., Ranchalis, J., Travis, B., McClure, J., Sutton, W., Johnson, P. R., Hu, S. L., and Haigwood, N. L. (1997). Plasma viremia in macaques infected with simian immunodeficiency virus: plasma viral load early in infection predicts survival. *J Virol* 71(1), 284-90.
- Weller, S., and Davis, K. (2002). Condom effectiveness in reducing heterosexual HIV transmission. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD003255.
- Wilkinson, J., and Cunningham, A. L. (2006). Mucosal transmission of HIV-1: first stop dendritic cells. *Curr Drug Targets* 7(12), 1563-9.
- Wright, P. F., Kozlowski, P. A., Rybczyk, G. K., Goepfert, P., Staats, H. F., VanCott, T. C., Trabattoni, D., Sannella, E., and Mestecky, J. (2002). Detection of mucosal antibodies in HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**(17), 1291-300.
- Yahi, N., Baghdiguian, S., Moreau, H., and Fantini, J. (1992). Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. *J Virol* **66**(8), 4848-54.
- Yang, O. O., Kalams, S. A., Trocha, A., Cao, H., Luster, A., Johnson, R. P., and Walker,
  B. D. (1997). Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by
  CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J Virol* 71(4), 3120-8.
- Younes, S. A., Yassine-Diab, B., Dumont, A. R., Boulassel, M. R., Grossman, Z., Routy, J. P., and Sekaly, R. P. (2003). HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* **198**(12), 1909-22.
- Young, K. R., McBurney, S. P., Karkhanis, L. U., and Ross, T. M. (2006). Virus-like particles: designing an effective AIDS vaccine. *Methods* **40**(1), 98-117.
- Zeitz, M., Schieferdecker, H. L., Ullrich, R., Jahn, H. U., James, S. P., and Riecken, E. O. (1991). Phenotype and function of lamina propria T lymphocytes. *Immunol Res* **10**(3-4), 199-206.
- Zhang, Z., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgrefe, S., Staskus, K. A., Reimann, K. A., Reinhart, T. A., Rogan, M., Cavert, W., Miller, C. J., Veazey, R. S., Notermans, D., Little, S., Danner, S. A., Richman, D. D., Havlir, D., Wong, J., Jordan, H. L.,

Schacker, T. W., Racz, P., Tenner-Racz, K., Letvin, N. L., Wolinsky, S., and Haase, A. T. (1999). Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science* **286**(5443), 1353-7.

## 8. Anhang

## Abbildungsverzeichnis

| Abb. 1.1  | Schematische Darstellung eines HIV-Partikels  |
|-----------|---|
| Abb. 1.2  | Aufbau des SIVmac-Genoms  |
| Abb. 1.3  | Die Phylogenie der Lentiviren   |
| Abb. 1.4  | Schematische Darstellung des HIV-Replikationszyklus   |
| Abb. 1.5  | Veränderungen der T-Zellpopulationen, der Virämie und der Immunaktivierung nach SIV-Infektion   |
| Abb. 2.1  | Schematische Darstellung der Tetramer-Technik   |
| Abb. 4.1  | Vergleich relativer Anteile von T-Zellpopulationen aus intestinalen Biopsie-<br>und Sektions-material von nicht infizierten Tieren.                             |
| Abb. 4.2  | Relativer Anteil der T-Zellen (A), B-Zellen (B) und NK-Zellen (C) an den Lymphozyten in allen untersuchten mukosalen Geweben                                    |
| Abb. 4.3  | Prozentualer Anteil der CD4+ (A) und CD8+ T-Zellen (B) an den CD3+ T-Lymphozyten in den untersuchten mukosalen Geweben  |
| Abb. 4.4  | Prozentualer Anteil der CD4+ CCR5+ T-Zellen in allen untersuchten mukosalen Geweben   |
| Abb. 4.5  | Prozentuale Anteile der CD45RA negativen Gedächtniszellen an den CD4+(A) und CD8+ T-Zellen (B) in den untersuchten mukosalen Geweben                            |
| Abb. 4.6  | Anzahl der viralen RNA-Kopien pro ml Blutplasma der einzelnen Tiere in allen Versuchs-gruppen im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion                           |
| Abb. 4.7  | Anzahl der viralen RNA-Kopien pro ml Blutplasma für alle Tiere im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion  |
| Abb. 4.8  | Prozentualer Anteil der CD4+ T-Zellen an den T-Lymphozyten im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion als Mittelwert der jeweiligen Gruppe                         |
| Abb. 4.9  | Prozentualer Anteil der CD8+ T-Zellen an den T-Lymphozyten im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion als Mittelwert der jeweiligen Gruppe                         |
| Abb. 4.10 | Prozentualer Anteil der CD4+ CD29 hochpositiven T-Zellen an den CD4+ T-Lymphozyten im Zeitverlauf nach Belastungsinfektion als Mittelwert der jeweiligen Gruppe |
| Abb. 4.11 | Anteil der CD4+ T-Lymphozyten an den T-Zellen der verschiedenen Organe zum Zeitpunkt der Sektion  |
| Abb. 4.12 | Anteil der CD8+ T-Lymphozyten an den T-Zellen der verschiedenen Organe zum Zeitpunkt der Sektion  |
| Abb.4.13  | Viruslast von LTNPs und Progressoren im Zeitverlauf nach<br>Belastungsinfektion   |
| Abb. 4.14 | Relative Anteile der CD4+ T-Zellen in Blut, BAL, Duodenum und Colon von uninfizierten Tieren, LTNPs und Progressoren  |

- Abb. 4.15 Korrelation der viralen Plasma-RNA Beladung mit den prozentualen Anteilen der CD4+ T-Zellen in Blut (A), BAL (B), Duodenum (C) und Colon (D) von allen infizierten Tieren
- Abb. 4.16 Relative Anteile der CCR5 Expression auf CD4+ T-Zellen in Blut (A), BAL (B), Duodenum (C) und Colon (D) von uninfizierten Tieren, LTNPs und Progressoren
- Abb. 4.17 Korrelation der viralen Plasma-RNA mit den prozentualen Anteilen der CCR5 exprimierenden CD4+ T-Zellen in Blut (A), BAL (B), Duodenum (C) und Colon (D) von allen infizierten Tieren.
- Abb. 4.18. Relative Anteile an aktivierten CD4+ T-Zellen in Blut (A), BAL (B), Duodenum (C) und Colon (D) von uninfizierten Tieren, LTNPs und Progressoren
- Abb. 4.19 Relative Anteile an aktivierten CD8+ T-Zellen in Blut (A), BAL (B), Duodenum (C) und Colon (D) von uninfizierten Tieren, LTNPs und Progressoren
- Abb. 4.20 Prozentualer Anteil SIV-spezifischen zytotoxischer CD8+ T-Lymphozyten in LTNPs und Progressoren.
- Abb. 4.21 Relative Anteile der CD4+ T-Zellen (A) und SIV-spezifischen zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten (B) in Blut, BAL, Duodenum und Colon von fünf LTNPs im Verlauf
- Abb. 4.22 Verlauf der viralen RNA-Kopien im Plasma und der infektiösen Zellen von den Tieren 2191 (A) und 12536 (B)
- Abb. 4.23. Humorale und zelluläre SIV-spezifische Immunantwort in LTNPs und Progressoren.
- Abb. 4.24 Anteile der einfach positiven und polyfunktionalen Zytokin produzierenden CD4+ (A) und CD8+ (B) Gedächtnis T-Zellen in PBMC und BAL von uninfizierten Tieren nach SEB-Stimulation
- Abb. 4.25 Anteile der einfach positiven und polyfunktionalen Zytokin produzierenden CD4+ T-Zellen in PBMC und BAL von uninfizierten Tieren, LTNPs und Progressoren nach SEB-Stimulation
- Abb. 4.26 Anteile der einfach positiven und polyfunktionalen Zytokin produzierenden CD8+ T-Zellen in PBMC und BAL von uninfizierten Tieren, LTNPs und Progressoren nach SEB-Stimulation
- Abb. 4.27 Anteile der einfach positiven und polyfunktionalen Zytokin produzierenden CD4+ T-Zellen in PBMC (A) und BAL (B) von LTNPs und Progressoren nach Gag-Stimulation
- Abb. 4.28 Anteile der einfach positiven und polyfunktionalen Zytokin produzierenden CD8+ T-Zellen in PBMC (A) und BAL (B) in LTNPs und Progressoren nach Gag-Stimulation
- Abb. 4.29 Anteile der einfach positiven und polyfunktionalen Zytokin produzierenden CD4+ und CD8+ T-Zellen in PBMC und BAL von LTNPs nach Gag-Stimulation
- Abb. 4.30 Virale RNA-Kopien in Duodenum, Colon, BAL-Zellen und Plasma von LTNPs und Progressoren

| Abb. 4.31 | Korrelationsanalyse der viralen RNA-Kopien in mukosalen Geweben mit der systemischen Viruslast  |  |
|-----------|---|--|
| Abb. 4.32 | Quantifizierung proviraler DNA-Kopien in PBMC und BAL-Zellen von LTNPs und Progressoren   |  |
| Abb. 4.33 | Korrelationsanalyse der proviralen DNA-Genomkopien mit der systemischen RNA-Viruslast   |  |
| Abb. 4.34 | Vergleich der zellassoziierten Viruslast (Provirus und infektiösen Zellen) mit der zellfreien RNA-Viruslast (im Plasma) in LTNPs und Progressoren   |  |
| Abb. 4.35 | Prozentuale Anteile der CD4+ T-Zellen an den CD3+ T-Lymphozyten in Blut und acht verschiedenen mukosalen Geweben in uninfizierten und SIV infizierten Tieren  |  |
| Abb. 4.36 | Prozentuale Anteile der virusspezifischen zytotoxischen CD8+ T-Zellen in Blut und verschiedenen mukosalen Geweben zum Zeitpunkt der Sektion   |  |
| Abb. 4.37 | Korrelation des durchschnittlichen relativen Anteils an SIV spezifischen CTL mit dem durchschnittlichen prozentualen Verlust an CD4+ T-Zellen in den vier Darmabschnitten von sechs MamuA*01-Tieren |  |

#### **Tabellenverzeichnis**

- Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Medien, Inkubationslösungen, Puffer und Dichtegradienten
- Tab. 2.2 Sequenzen der verwendeten Primer und der Tagman-Sonde
- Tab. 2.3 Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, ihre Absorptions- und Emissionsmaxima und die zur Messung im Durchflusszytometer verwendeten Filter und Laser
- Tab. 2.4 Übersicht über die verwendeten murinen Antikörper gerichtet gegen humane Lymphozytenoberflächenproteine
- Tab. 2.5 Zuordnungsnummer und Peptidsequenzen der 16 Peptide des Gag-Peptidpools
- Tab. 2.6 Beschreibung des HCV-Peptidpools mit den entsprechenden Peptidsequenzen und dem Reinheitsgrad
- Tab. 2.7 Verwendete Tiere in Ergebnisteil 4.3-4.5
- Tab. 2.8 Analysierte Tiere in Ergebnisteil 4.1./4.2./4.12.
- Tab. 2.9 Analysierte Tiere in Ergebnisteil 4.1., 4.6-8
- Tab. 3.1 Gruppeneinteilung der Tiere mit den verwendeten Gelformulierungen (SHIVA-1)
- Tab. 3.2 Gruppeneinteilung der Tiere mit den verwendeten Gelformulierungen (SHIVA-2)
- Tab. 3.3 PCR-Bedingungen für die qRT-PCR zur Quantifizierung viraler RNA-Kopien und zur Überprüfung der RNA-Qualität
- Tab. 3.4 Reaktionsansätze für die qRT-PCR
- Tab. 3.5 Reaktionsansätze für die qRT-PCR zur Quantifizierung viraler DNA-Genomkopien
- Tab. 3.6 PCR-Bedingungen für die Quantifizierung viraler DNA-Genomkopien
- Tab. 3.7 Übersicht über die Kombination der verwendeten Fluorochrom-konjugierten Antikörper für die Charakterisierung der T-Zellen in Ergebnisteil 4.6.
- Tab. 3.8 Übersicht über die Kombination der verwendeten Fluorochrom-konjugierten Antikörper für die Charakterisierung der Gesamtlymphozyten und der T-Zellen
- Tab. 4.1 Erzielte Ausbeuten mononukleärer Zellen aus ex vivo und zum Zeitpunkt der Sektion gewonnenen mukosalen Geweben von uninfizierten Rhesusaffen
- Tab. 4.2 Versuchsgruppen mit der verwendeten Gelformulierung und Wirkstoffkonzentration
- Tab. 4.3 Virale und immunologische Parameter aller Versuchstiere aus SHIVA-1 nach vaginaler RT-SHIV Exposition
- Tab. 4.4 Schutzrate der Versuchsgruppen nach vaginaler RT-SHIV Exposition
- Tab. 4.5 Virale und immunologische Parameter aller Versuchstiere aus SHIVA-1 nach vaginaler RT-SHIV Exposition

- Tab. 4.6 Schutzrate der Versuchsgruppen nach vaginaler RT-SHIV Exposition
   Tab. 4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse 4.7.2/4.7.5/4.7.8
- Tab. 4.8 Langzeitanalyse von elf SIV infizierten Tieren

Sektion

- Tab. 4.9 Virale RNA-Kopien von zwei Progressoren pro Gramm Darmgewebe und pro
- 1 x 10<sup>6</sup> BAL-Zellen einschließlich der Viruslast im Plasma.

  Tab. 4.10 Übersicht der chronisch SIV infizierten Tiere für die Analyse des CD4-
- Verlusts

  Tab. 4.11 Berechnung des prozentualen CD4-Verlustes in Blut und allen untersuchten
- mukosalen Geweben

  Tab. 4.12 Durchschnitt der prozentualen Anteile an virusspezifischen zytotoxischen CD8+ T-Zellen in Blut und allen mukosalen Geweben zum Zeitpunkt der

## Abkürzungsverzeichnis

| Abb    | Abhildung  |
|--------|--|
|        | engl. antibody dependent cellular cytotoxicity       |
|        | engl. acquired immunodeficiency syndrome             |
|        | •              |
|        | Allophycocyanin-konjugiert                           |
| APOBEC | engl. apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic |
|        | polypeptide  |
| BSA    | engl. bovine serum albumin                           |
| BAL    |  |
|        |  |
| CCR5   | engl. chemokine receptor 5                           |
| CD     | engl. cluster of differentiation                     |
| CIRMF  | Centre International de Recherches Médicales         |
|        | (Franceville, Gabun)                                 |
| CPE    |  |
|        | engl. cytotoxic T-lymphocyte                         |
| C1L    | engi. cytotoxic 1 tympnocyte                         |
| DNA    | engl. deoxyribonucleic acid                          |
|        | Deutsches Primatenzentrum                            |
|        |  |
| EDTA   | Ethylendiamintetraessigsäure                         |
| ELISA  | engl. enzyme-linked immunosorbent assay              |
|        | engl. enzyme-linked immuno spot technique            |
| engl.  |  |
|        | und andere (lat. et alii bzw. et aliae)              |
| Env    |  |
| Liiv   | ongi. envelope                                       |
|        | engl. fluorescence activated cell sorting            |
| FCS    | engl. fetal calf serum                               |
| FITC   | Fluoresceinisothiocyanat                             |
| FSC    | Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter)           |
| α      | Gramm; Erdbeschleunigung                             |
| •      | ,  |
|        | engl. group-specific antigen                         |
| gp     | Glykoprotein   |
| h      | engl. <i>hour</i>                                    |
|        | engl. highly active antiretroviral therapie          |
| HCV    | • • •  |
|        | engl. human immunodeficiency virus                   |
|        |  |
|        | engl. intracellular cytokine staining                |
| IFN    |  |
| Ig     | Immunglobulin  |
| IL     |  |
| i.m    |  |
| i.v    |  |
|        |  |
| lat    |  |
| LTNP   | engl. long-term non-progressor                       |

| LTRLN                                |   |
|--------------------------------------|---|
| MHC<br>ml<br>MIP1α                   | Abkürzung für <i>Macaca mulatta</i> (Rhesusaffe) engl. <i>major histocompatibility complex</i> Milliliter engl. <i>macrophage inflammatory protein 1α</i> engl. <i>macrophage inflammatory protein 1β</i>   |
| Nef<br>neg<br>NK-Zellen              | . negativ   |
| PBMC PBS PCR PE PerCP PFU pH PMT Pol | engl. prostastic acid phosphataseengl. peripheral blood mononuclear cellsengl. phosphate buffered salineengl. polymerase chain reactionPhycoerythrinPeridinin Chlorophyll a-Proteinengl. plague forming unitlog[H <sup>+</sup> ]engl. photomultiplier tubeeng. polymeraseengl. pattern recognition receptors                    |
| qRT-PCR                              | engl. quantitative real time polymerase chain reaction  |
| RevrpmRPMI                           | engl. regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted engl. regulator of expression of virion proteins engl. ribonucleic acid Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute) Roswell Park Memorial Institute rekombinantes Virus aus SIVmac239 mit der Sequenz der Reversen Transkriptase HIV |
| SEB                                  | subkutan (engl. subcutaneous) Staphylococcus-Enterotoxin B engl. spot forming unit engl. Selection and Development of Microbicides for Mucosal Use to Prevent Sexual HIV Transmission/Acquisition   |
|                                      | . engl. <i>simian immunodeficiency virus</i><br>. Aldrithiol-2 inaktiviertes SIV  |

| SSC    | Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter)         |
|--------|--|
| Tab    | Tabelle  |
| Tat    | engl. trans-activator of transcription           |
|        | engl. 50% tissue culture infectious doses        |
| TNF    | Tumornekrosefaktor                               |
| U      | Aktive Einheit eines Enzyms (engl. <i>unit</i> ) |
| UNAIDS | engl. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS |
| VLP    | engl. <i>virus-like particle</i>                 |
| Vif    | engl. viral infectivity factor                   |
| Vpr    | engl. <i>viral protein R</i>                     |
| Vpu    | engl. viral protein U                            |
| Vpx    |  |
| VS     | lat. versus                                      |
|        | Volumenprozent (engl. volume per volume)         |
| w/v    | Massenprozent (engl. weight per volume)          |
| z.B    | zum Beispiel                                     |

#### **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. G. Hunsmann danke für die Betreuung dieser Doktorarbeit über seine Emeritierung hinaus.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Fritz danke für die Übernahme des Koreferates meiner Arbeit und deren Vertretung im Fachbereich Biologie der Georg-August-Universität Göttingen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Christiane Stahl-Hennig für die Vergabe des Themas dieser Doktorarbeit und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in ihrer Abteilung "Infektionsmodelle" des Deutschen Primatenzentrums. Sie gab mir stets in jeglicher Hinsicht die Gelegenheit und Unterstützung, meine eigenen Ideen in dieser Arbeit zu verwirklichen. Außerdem möchte ich mich ausdrücklich für die vielen Kongressteilnahmen, Fortbildungsmöglichkeiten und den Arbeitsaufenthalt am Centre International de Recheres Médicales (CIRMF) in Franceville, Gabun, bedanken.

Herrn Prof. Dr. M. Kanzanji und allen Mitarbeitern in der Abteilung Virologie am Centre International de Recheres Médicales in Franceville möchte ich danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, in ihrem Labor zu arbeiten. Insbesondere bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Bettina Salle, Dr. Sandrine Souquiere, Dr. Maria Makuwa, Melanie Caron und Nina Jaffre für ihre große Unterstützung im Labor sowie für die wirklich schöne und außergewöhnliche Zeit in Gabun.

Bei Dr. Reiner Schulte möchte ich ganz besonders bedanken für seine Hilfsbereitschaft zu Beginn meiner praktischen Arbeit im Labor und seine große Diskussionsbereitschaft. Er hat meine Arbeit stets mit Interesse verfolgt und mich außerdem beim Anfertigen der schriftlichen Abhandlung dieser Arbeit unterstützt.

Mein herzlichster Dank gilt außerdem Judith Hampe, Sandra Heine und Michaela Suhling für ihre tatkräftige Unterstützung meiner praktischen Arbeiten im Labor und ihre Kollegialität. Außerdem möchte ich mich bei den Tierärzten und Tierpflegern, Dr. Monika Franz, Katharina Bohnhorst, Thorsten Eggers, Peter Müller, Henning Mascher und Gabriele Marschhausen für die zahlreichen Probenentnahmen für meine Doktorarbeit bedanken.

Allen Kollegen aus der Abteilung "Infektionsmodelle" und "Virologie und Immunologie", insbesondere Dr. Ulrike Sauermann, Wiebke Ibing, Dr. Dirk Motzkus und Herrn Priv.-Doz. Dr. Sieghart Sopper danke ich für alle hilfreichen Beiträge im Verlauf meiner gesamten Arbeit.

Speziell Herrn Prof. Dr. Wolfgang Lüke möchte ich für seine ständige Diskussionsbereitschaft und große Unterstützung am Ende meiner Dissertation ganz herzlich danken.

Allen weiteren Kollegen, Doktoranden, Diplomanden und Hiwis danke ich für die Kollegialität und das angenehme Arbeitsklima in der Abteilung.

Meiner ganzen Familie danke ich für ihre große Unterstützung in meinem bisherigen Leben. Von ganzem Herzen möchte ich auch meiner Oma danken, die mich seit meiner frühesten Kindheit liebevoll begleitet hat und vor allem stets an mich geglaubt hat.

#### Lebenslauf

#### Tina Ruth Schultheiß

geboren am 22. September 1978 in Erlangen

Diplom-Biologin

Nationalität: deutsch

seit August 2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung

"Infektionsmodelle" am Deutschen Primatenzentrum GmbH,

Leibniz Institut für Primatenforschung, Göttingen

05/2006 – 07/2009 Doktorandin in der Abteilung "Infektionsmodelle"

am Deutschen Primatenzentrum GmbH,

Leibniz Institut für Primatenforschung, Göttingen

10/2000 - 02/2006 Diplomstudiengang Biologie,

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Diplomarbeit:

"Die Subtypen des Glykoproteins N des humanen Cytomegalovirus:

Komplexbildung mit Glykoprotein M und Herstellung

rekombinanter Viren"

angefertigt am Institut für Klinische und Molekulare Virologie der

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

09/1998 - 07/2000 Ausbildung zur Industriekauffrau bei der Firma Schwan-STABILO,

Schwanhäußer Industrie Holding GmbH & Co., Heroldsberg

09/1989 - 07/1998 Besuch des Emmy-Noether-Gymnasiums, Erlangen

Abschluss: Abitur